

Valutazione dell'efficacia di un protocollo sperimentale per l'isolamento e la propagazione di batteriofagi contro *Staphylococcus aureus*

D'Agostino Krizia, Aprea Giuseppe*, Boni Arianna, Battistelli Noemi, D'Angelantonio Daniela, Pomilio Francesco, Migliorati Giacomo

Reparto di Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo
*Presenting author

Keywords
Batteriofago,
Fago-terapia,
Staphylococcus aureus

Introduzione

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) è l'agente eziologico di molte patologie negli animali e nell'uomo e le tossine prodotte rappresentano una delle principali cause di tossinfezioni alimentari. Il suo ingresso negli ambienti di produzione degli alimenti è associato sia alle materie prime contaminate che a patologie degli operatori come lesioni cutanee e oro-nasali (1). Nelle industrie alimentari, gli stafilococchi producono biofilm che contribuiscono alla persistenza del patogeno nell'ambiente. La problematica principale da affrontare resta comunque la loro capacità di sviluppare resistenza agli antibiotici (2), e risulta pertanto fondamentale l'individuazione di nuovi presidi ad attività antimicrobica.

I batteriofagi (fagi) sono i naturali competitori ambientali dei batteri e riconoscono in essi la loro unica fonte di replicazione. Essi rappresentano una valida alternativa per il contenimento ambientale dei batteri in quanto sono efficaci e considerati sicuri per l'uomo e gli animali (3).

Per l'isolamento di fagi da campioni ambientali è indispensabile eseguire una prima fase di "prearricchimento", che consente di isolare i fagi presenti a titoli bassi oppure indeboliti nell'ambiente, ed una seconda fase di "propagazione", per poter coltivare ed incrementare il titolo del fago.

Lo scopo di questo lavoro è stato di valutare un metodo più semplice e rapido rispetto ai protocolli riportati in letteratura per l'isolamento di fagi contro *S. aureus*, utilizzando il ceppo di *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 19685 ed il batteriofago K (ATCC 19685-B1) come materiali di riferimento. In particolare il fago K (Figura 1) è un batteriofago dotato di un ampio spettro d'ospite, capace di replicare sia in stafilococchi coagulasi positivi che coagulasi negativi, è un membro della famiglia *Myoviridae* ed è uno dei fagi contro *S. aureus* più studiati in letteratura (4).

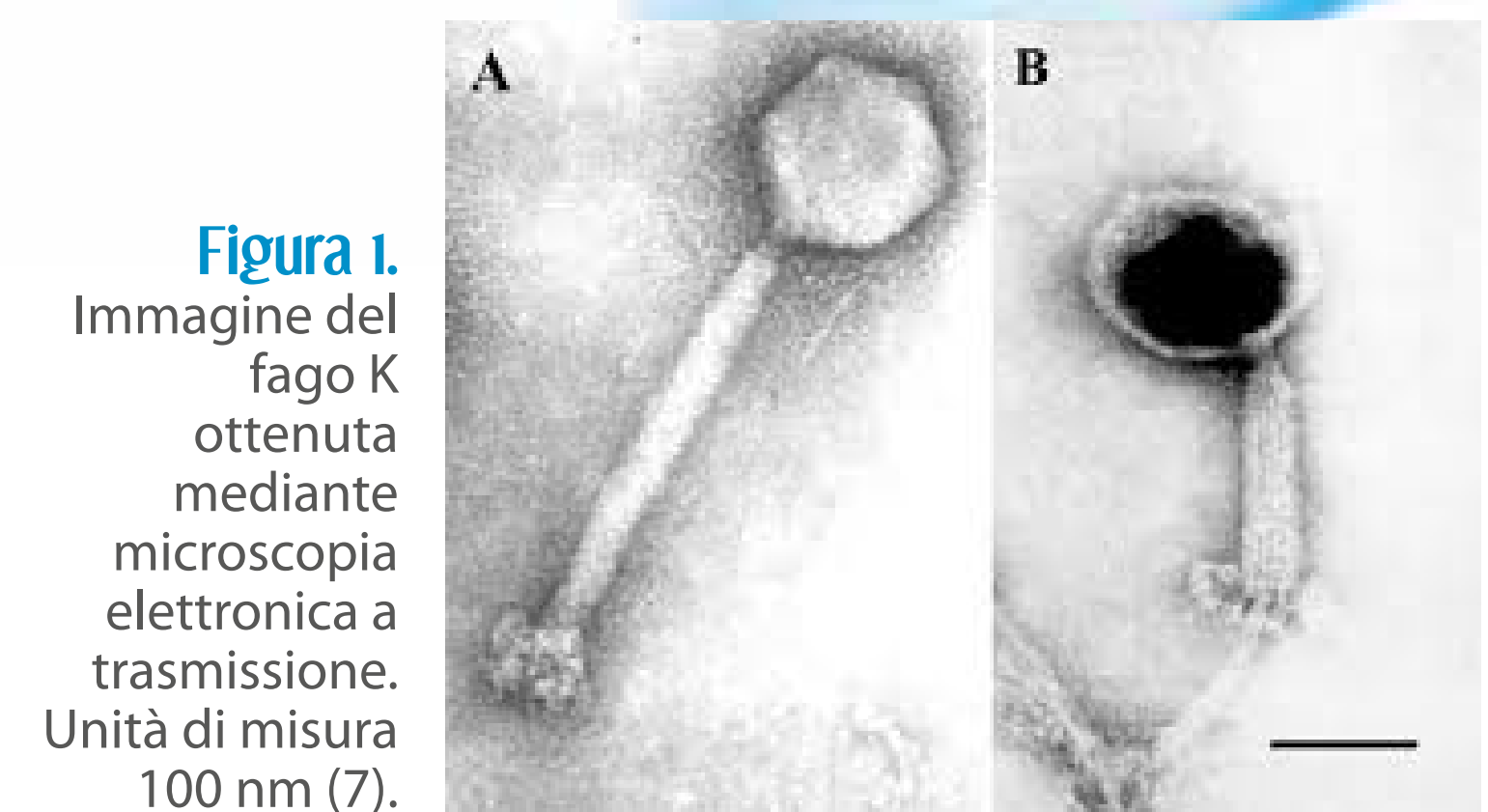


Figura 1. Immagine del fago K ottenuta mediante microscopia elettronica a trasmissione. Unità di misura 100 nm (7).

Materiali e metodi

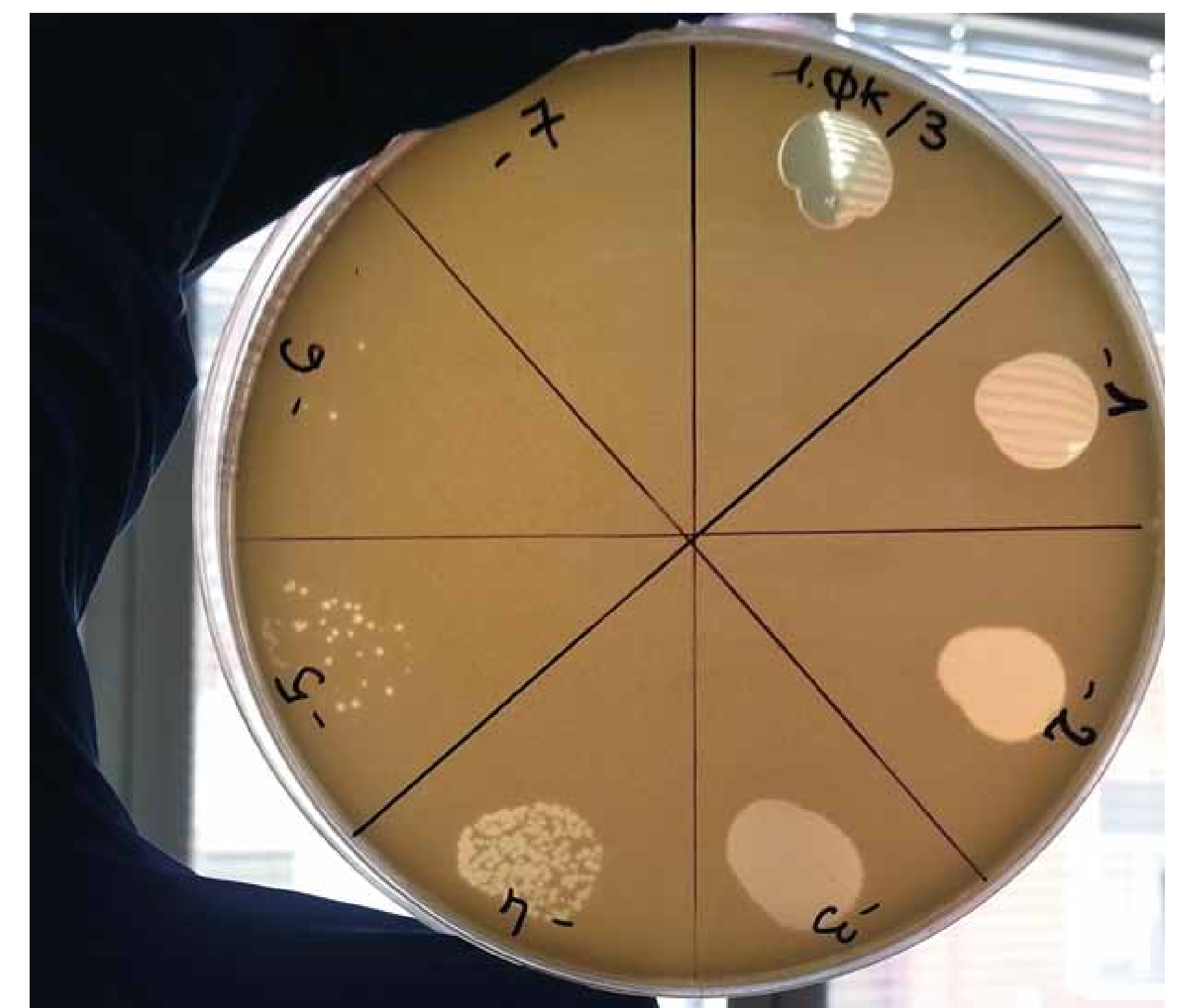
Batteriofago, ceppo batterico, terreni e condizioni di coltura. Il batteriofago K (ATCC19685-B1) ed il suo ospite (*S. aureus* subsp. *aureus*, ATCC19685) sono stati acquistati dall'American Type Culture Collection (ATCC).

Il brodo Brain Heart Infusion (BHI) è stato utilizzato per la crescita di *S. aureus* per 18-24 h a 37 ± 1 °C. Il fago K è stato titolato mediante prove di Spot Assay (Figura 2) e di Plaque Assay, utilizzando agar BHI (brodo BHI + Bacto agar 1,5%) e BHI soft agar (brodo BHI + Bacto agar 0,6%).

Prearricchimento. Il fago K, risospeso direttamente dal suo stato di liofilo, è stato diluito in brodo SM (Tris-HCl con NaCl, MgSO₄ e gelatina 0,01%) e sottoposto a diluizioni scalari in base 10, fino al raggiungimento del titolo di 10² unità formanti placca per ml (ufp/ml). Il fago è stato quindi sottoposto alla prova di prearricchimento: 10 ml di fago 10² ufp/ml sono stati aggiunti a 10 ml di brodo BHI con 100 µl di CaCl₂ 1M e 1 ml di coltura batterica cresciuta 18-24 h a 37 ± 1 °C. Il tutto è stato incubato 18-24 h a 37 ± 1 °C con aggiunta successiva di cloroformio (Sigma-Aldrich) 1 % (v/v), centrifugazione (Eppendorf, Hamburg, Germany) a 4.500 g per 15 min e filtrazione del surnatante con filtri da 0,45 µm. Per un'ulteriore replicazione del fago, 10 ml del filtrato sono stati aggiunti a 10 ml di coltura batterica cresciuta 18-24 h e 100 µl di CaCl₂ 1M, ed incubata nuovamente a 37 ± 1 °C, in agitazione (VWR, USA) a 100 rpm, per 18-24h. Dopo l'incubazione, alla coltura è stato aggiunto cloroformio 1 % e la soluzione è stata sottoposta a centrifugazione (4.500 g per 15 min) ed il surnatante filtrato con filtri da 0,45 µm. Il surnatante è stato sottoposto a diluizioni scalari in base 10 in brodo SM, fino alla diluizione 10⁻¹⁰, e poi a titolazione mediante tecnica di Plaque Assay.

Propagazione. Il fago K ottenuto dalla precedente fase di prearricchimento è stato utilizzato per la successiva fase di propagazione. In particolare è stata utilizzata sia un'aliquota di fago a titolo 10⁸ ufp/ml che un'aliquota di fago diluita con titolo di 10⁴ ufp/ml. Entrambe le aliquote sono state sottoposte separatamente alla seguente fase di propagazione: a 10 ml di brodo BHI sono stati aggiunti 100 µl di CaCl₂ 1M, 100 µl di coltura batterica cresciuta 18-24 h a 37 ± 1 °C e 100 µl di fago. La sospensione è stata incubata 18-24 h a 37 ± 1 °C. Dopo l'incubazione, alla coltura è stato aggiunto cloroformio 1 %, quindi sono state effettuate una ulteriore incubazione in agitazione a 100 rpm, 37 ± 1 °C per 20 min, una centrifugazione (4.500 g per 15 min) ed infine il surnatante è stato filtrato con filtri da 0,45 µm. Il surnatante è stato sottoposto a diluizione in base 10 in brodo SM, fino alla diluizione 10⁻¹⁰, ed è stato sottoposto a titolazione mediante tecnica di Plaque Assay.

Figura 2. Spot Assay di diluizioni scalari del fago K ed identificazione di placche tipiche alle diluizioni 10⁻⁵ e 10⁻⁶.



Risultati e discussione

Partendo da un titolo basso del fago di riferimento (10² ufp/ml), che simula la concentrazione che è possibile rilevare naturalmente nell'ambiente e sottoponendolo al protocollo di prearricchimento sopra descritto, il titolo del batteriofago è aumentato di 6 unità logaritmiche, raggiungendo il valore di 10⁸ ufp/ml (Tabella 1). Molti lavori presenti in letteratura prevedono l'esecuzione di più cicli di prearricchimento (5) per raggiungere titoli elevati a partire da titoli bassi. L'applicazione del protocollo descritto ha permesso invece di raggiungere un titolo di 10⁸ ufp/ml con un solo ciclo di prearricchimento.

Le successive prove di propagazione, partendo da un titolo di fagi elevato (circa 10⁸ ufp/ml), hanno permesso di evidenziare un titolo finale pressoché costante nelle varie sospensioni che si sono susseguite, di circa 10⁸ ufp/ml (Tabella 1).

Sono state inoltre effettuate prove di propagazione anche a partire da un titolo del fago di circa 10⁴ ufp/ml per verificare la capacità di replicazione del fago a titoli di partenza più contenuti, ed è stato possibile verificare un incremento del titolo finale del batteriofago di riferimento di circa 5 logaritmi, raggiungendo un titolo finale di 10⁹ ufp/ml (Tabella 1).

Questo lavoro ha permesso di dimostrare che, mediante l'utilizzo del nostro protocollo di prearricchimento e propagazione, il fago K è stato in grado di replicare attivamente. Tali risultati sono paragonabili a quelli ottenuti in altri lavori (6) ma il metodo applicato è risultato più semplice e di più rapida esecuzione. Il protocollo verrà dunque utilizzato per l'isolamento ambientale di nuovi fagi attivi contro *S. aureus*.

Tabella 1. Risultati relativi al prearricchimento ed alla propagazione del fago K mediante l'utilizzo del ceppo ospite *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC19685.

Test	Titolo di partenza (ufp/ml)	Titolo dopo il test (ufp/ml)	Aumento titolo
Prearricchimento	10 ²	10 ⁸	6 log
Propagazione	10 ⁴	10 ⁹	5 log
Propagazione	10 ⁸	10 ⁸	0*

* La propagazione del fago K è avvenuta comunque con successo, se si considera il fattore di diluizione totale di circa 1:100 a cui il fago è stato sottoposto prima di raggiungere nuovamente il titolo di 10⁸ ufp/ml a conclusione della fase di propagazione stessa.

Bibliografia

- Normanno G., Dambrosio A., Lorusso V., Samoilis G., Di Taranto P. & Parisi A. 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. *Food Microbiology*, **51**, 51-56.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2013 - Antimicrobial resistance surveillance in Europe. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish. *European Food Safety Authority*.
- Alves D.R., Gaudion A., Bean J.E., Esteban P.P., Arnot T.C., Harper D.R., ... & Jenkins A.T.A. 2014. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, **80** (21), 6694-6703.
- Jensen K.C., Hair B.B. & Berges B.K. 2015. Isolation and host range of bacteriophage with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and potential use as a fomite decontaminant. *PLoS One*, **10** (7), e0131714.
- Li L. & Zhang Z. 2014. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*, **41**(9), 5829-5838.
- O'Flaherty S., Ross R.P., Meaney W., Fitzgerald G.F., Elbreki M.F. & Coffey A. 2005. Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus aureus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and environmental microbiology*, **71** (4), 1836-1842.