

---

**I batteriofagi : un valido strumento per  
un vaccino contro l'infezione  
da *Staphylococcus aureus***

---



**Nunzia Nocerino**

**Dottorato in Produzione e Sanità  
degli Alimenti di Origine Animale-XXIV ciclo  
Università degli Studi di Napoli Federico II**

---

**I batteriofagi : un valido strumento per  
un vaccino contro l'infezione  
da *Staphylococcus aureus***

---



Dottorato in Produzione e Sanità  
degli Alimenti di Origine Animale -XXIV ciclo  
Università degli Studi di Napoli Federico II

Dottoranda : Nunzia Nocerino

Relatore : Dr. Gianfranco Cosenza

Coordinatore: Prof.ssa Maria Luisa Cortesi

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 BATTERIOFAGI.....</b>	<b>6</b>
<b>2.TERAPIA FAGICA.....</b>	<b>10</b>
2.1 Storia.....	10
2.2 Vantaggi della terapia fagica.....	11
2.3 Limiti della terapia fagica.....	12
2.4 Il futuro della terapia fagica.....	12
<b>3.TERAPIA FAGICA E IMMUNITA'.....</b>	<b>14</b>
3.1 Trattamento alternativo con i fagi.....	17
3.2 Sicurezza della terapia fagica.....	18
3.3 Preoccupazioni relative all'attività litica.....	18
3.4 Recenti esperimenti sui fagi.....	19
<b>4.FAGO-RESISTENZA.....</b>	<b>21</b>
<b>5.IPOTESI.....</b>	<b>22</b>
<b>6.MATERIALI E METODI.....</b>	<b>23</b>
6.1 Batteri.....	23

6.2 Isolamento fago.....	23
6.3 Topi.....	24
6.4 Prova di neutralizzazione del fago e inibizione dell'attività litica del fago.....	24
6.5 Real-time PCR di trascrizione inversa (RT-PCR).....	25
6.6 Isolamento dei ceppi fago-resistenti.....	25
6.7 Titolazione di anticorpi anti-A172.....	25
6.8 Analisi dei carboidrati e purificazione della capsula polisaccaridica. Cromatografia di affinità con Con A Sepharose.....	26
6.9 Rilevamento di revertanti A172.....	27
Altri metodi.....	28
<b>7.RISULTATI.....</b>	<b>29</b>
<b>8.DISCUSSIONE.....</b>	<b>34</b>
<b>TABELLE.....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURE.....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>

## RIASSUNTO

In presenza di un batteriofago (un virus che uccide il batterio) la resistenza è chiaramente vantaggiosa per i batteri. In tali condizioni, i batteri resistenti emergono rapidamente. Tuttavia, in assenza del fago, batteri resistenti spesso mostrano capacità ridotta, rispetto alle loro controparti sensibili. Il presente studio ha analizzato i costi di fitness, associati alla fago-resistenza, come un'opportunità per isolare un ceppo attenuato di *S. aureus*. Il ceppo fago-sensibile A170, a seguito di crescita in vitro in presenza del fago MSa, ha dato il ceppo fago-resistente A172. I due ceppi hanno origine comune ma mostrano differenze importanti. A170 e A172 differiscono nella loro struttura dell'acido teicoico e per la capacità di secernere polisaccaride capsulare (CP). Gli acidi teicoici di A172 non hanno residui terminali di N-acetilglucosamina (GlcNAc), che i fagi usano spesso per l'adsorbimento sulla parete delle cellule di *S. aureus*. Ancora più importante, GlcNAc e gli acidi teicoici di A170 (A170TA) inibiscono la lisi da parte del fago MSa, mentre il glucosio o gli acidi teicoici di A172 (A172TA) no. Questi risultati suggeriscono che A172 ha acquisito la fago-resistenza perdendo il sito di adsorbimento del fago (GlcNA terminale). Tuttavia, A172 produce anche un polisaccaride capsulare (CP), una strategia che alcuni batteri mettono in atto per mascherare i loro sito di adsorbimento ai fagi. In un modello murino di infezione, A172-HK (ucciso al calore) protegge contro dosi letali del ceppo A170. Una singola dose di A172-HK, senza l'uso di adiuvanti, ha protetto completamente dopo la somministrazione per via intramuscolare o aerosol. Immunizzazione passiva di topi con il siero di topi vaccinati con A172-HK protegge contro una dose letale di *S. aureus* A170. A172-HK era protettivo in vivo, mentre A170-HK non lo era. Questo ha suggerito che A172, insieme alla resistenza al fago MSa, ha acquistato anche la capacità di esprimere una nuova molecola, che agisce come un antigene protettivo. Inoltre, i ceppi fago resistenti (A172, A178, A180, A182), mostrano tutti la

caratteristica di produrre CP. CP sono stabili al calore e possono conferire protezione. Presi insieme, questi elementi, hanno fornito un sufficiente motivo per affermare che l'efficacia protettiva di A172 potrebbe risiedere nel suo CP (CP-A172). Quando confrontati con i topi infettati con A170, gli animali vaccinati con A172-HK mostravano un elevato livello di trascrizione di IL-6. IL-6 è una citochina anti-infiammatoria che controlla l'espressione di citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$ , I1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ). In conclusione, la resistenza ai fagi, a lungo considerata un problema nella lotta contro i batteri viene ad essere qui un'opportunità.

## ABSTRACT

In the presence of a bacteriophage (a bacteria-attacking virus) resistance is clearly beneficial to the bacteria. In such conditions, resistant bacteria emerge rapidly. However, in the absence of the phage, resistant bacteria often display reduced fitness, compared to their sensitive counterparts. The present study explored the fitness cost associated with phage-resistance as an opportunity to isolate an attenuated strain of *S. aureus*. The phage-sensitive strain A170, following growth in vitro in the presence of the MSa phage, yielded the phage-resistant strain A172. The two strains have a common origin but show important differences. A170 and A172 differ in their teichoic acid structure and the capacity to secrete CP. The teichoic acids of A172 lack the terminal GlcNAc residues that phages often use for adsorption on the cell wall of *S. aureus*. More importantly, GlcNAc and the teichoic acids from A170 (A170TA) inhibit lysis by the MSa phage, while glucose or the teichoic acids from A172 (A172TA) do not. These results suggest that A172 gained phage-resistance by losing the phage adsorption site (terminal GlcNA). However, A172 also displays CP production, a strategy that some bacteria put in action to mask their phage adsorption site. In a mouse model of infection, A172-HK (heat-killed) elicited high levels of protection against lethal doses of the A170 strain. A single dose of A172-HK, without use of adjuvant, was fully protective after administration by the intramuscular or aerosol routes. Passive immunization of mice with sera from A172-HK vaccinated mice provided protection against the challenge with a lethal dose of *S. aureus* A170. A172-HK was protective in vivo, while A170-HK was not. This suggested that A172, along with the resistance to the MSa phage, also acquired the capacity to express a new molecule, that acts as a protective antigen. Also, the phage resistant strains (A172, A178, A180, A182) all display the characteristic of secreting CP. CPs are heat stable and can confer protection [45–46]. Taken together, these facts provided sufficient ground to claim that the protective

efficacy of A172 could reside in its CP (CP-A172). When compared with A170 infected mice, A172-HK vaccinated animals displayed an elevated transcription level of IL-6.

IL-6 is an anti-inflammatory cytokine controlling the expression of pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , I1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ).

In conclusion, phage resistance, long considered a problem in the fight against bacteria is shown here to be an opportunity.

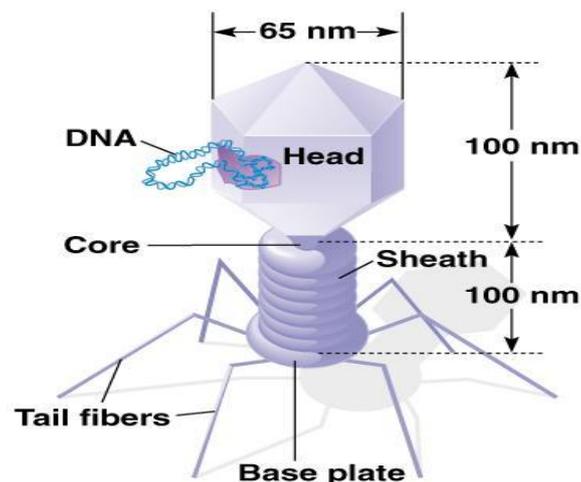
## INTRODUZIONE

L'urgenza di sviluppare nuove classi di antimicrobici deriva dalla diffusione di popolazioni microbiche resistenti ai più comuni antibiotici. Patogeni come *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* in grado di sostenere severe infezioni spesso fatali, hanno sviluppato negli ultimi anni resistenze multiple (MVRSA).

Per terapia fagica si intende l'utilizzo di fagi, virus batterici, per il trattamento e la profilassi di infezioni batteriche. L'impiego in vivo dei fagi richiede che siano prima allontanate eso- ed endotossine dal lisato batterico. I batteriofagi sono molto più specifici degli antibiotici, così da non comportare alcun danno non solo per l'organismo (umano, animale o vegetale), ma anche per altri batteri benefici, come la flora intestinale, riducendo le possibilità di infezioni opportunistiche. In presenza di un antibiotico o di un batteriofago la resistenza è chiaramente vantaggiosa per i batteri. Come ci si potrebbe aspettare, in tali condizioni, emergono velocemente batteri resistenti (1). Tuttavia, in vivo e in vitro, in assenza di antibiotici o fagi, i batteri resistenti mostrano spesso idoneità ridotta rispetto ai batteri antibiotico o fago-sensibili (1,2). Questo costo in termini di fitness è particolarmente elevato nel caso di ceppi batterici fago-resistenti. Per infettare i batteri, i fagi spesso selezionano un componente essenziale della parete cellulare batterica come recettore (2). Per ottenere la resistenza, i batteri devono necessariamente privarsi di quel componente o alterare la sua conformazione (2). Tuttavia, questa strategia risulta particolarmente costosa per i batteri, che spesso diventano meno virulenti o avirulenti. Il costo della fago-resistenza può essere dunque un elemento valido da studiare per isolare ceppi batterici attenuati. I fagi quindi da un lato rappresenterebbero una valida alternativa alla corrente terapia antibiotica per combattere infezioni batteriche in corso, dall'altro, la chiave per la produzione di "specifici prodotti" per prevenire le suddette.

## 1.1 BATTERIOFAGI

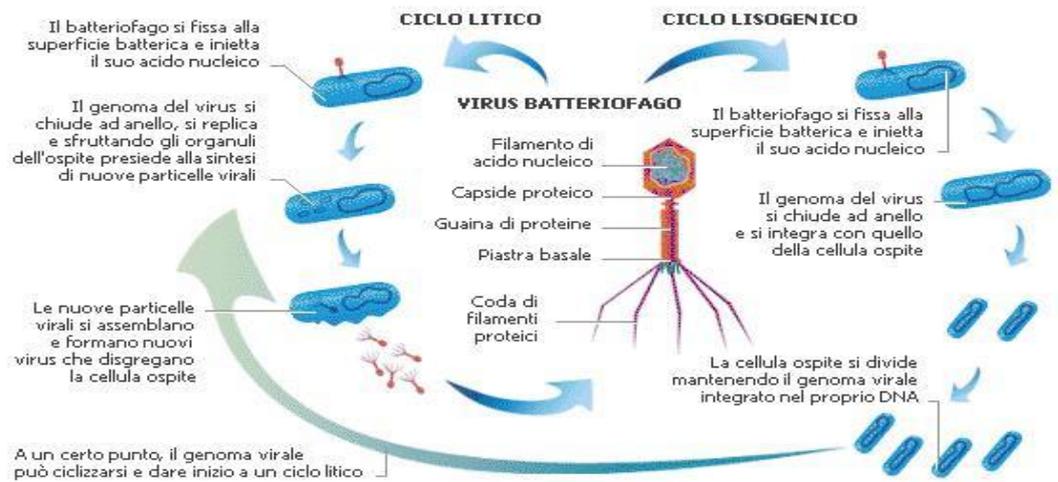
I batteriofagi sono virus capaci di moltiplicarsi solo all'interno di cellule batteriche viventi e sono pertanto parassiti obbligati. Possono essere classificati in base a diverse caratteristiche riguardanti la morfologia, le proprietà del genoma, la presenza dell'anvelope e in base allo spettro di attività antibatterica ovvero l'host range. I fagi possono essere raggruppati in: fagi con coda contrattile e non contrattile, fagi con capsidi ma privo di coda e fagi filamentosi. Il materiale genetico può essere acido nucleico DNA o RNA a doppio o a singolo filamento. La maggior parte dei fagi è costituita da un capsido icosaedrico che contiene DNA, il quale è legato attraverso il colletto ad una coda, formata da un asse cavo circondato da guaina elicoidale e da una placca basale che può avere delle spine e delle fibre. I batteriofagi forniti di coda sono classificati in tre famiglie: Myoviridae, Siphoviridae, e Podoviridae, rispettivamente con coda lunga e contrattile, lunga e corta ma non contrattile.



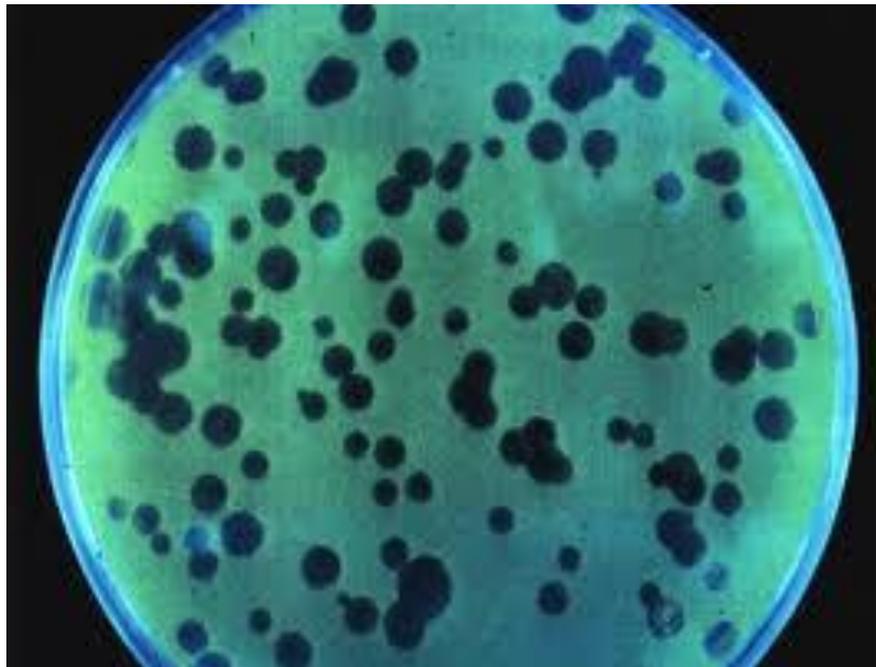
**Batteriofago**

I batteriofagi possono avere due cicli vitali: ciclo litico e ciclo lisogenico. Il ciclo litico prevede diverse fasi: nella fase di adsorbimento e penetrazione i fagi si legano mediante le fibre della coda a recettori (lipopolisaccaridi, lipoproteine, acidi teicoici) situati sulla superficie cellulare batterica e in questo modo la placca basale si adagia sulla membrana batterica, la coda si contrae e iniettano il loro genoma nell'ospite. Successivamente all'interno della cellula ospite vengono prodotte una serie di enzimi e proteine che, sintetizzando nuovo materiale genetico e alcune proteine della struttura del fago, causano la replicazione virale. La fase successiva detta di assemblaggio, prevede l'immagazzinamento dell'acido nucleico all'interno del capsido e la produzione di proteine che compongono la particella fagica quali la placca basale, la coda e le fimbrie. Infine la cellula va incontro a lisi mediante enzimi litici quali lisine, rilasciando le particelle virali assemblate. Nel ciclo lisogenico invece dopo le prime due fasi ovvero di adsorbimento e penetrazione, il genoma del fago è integrato nel cromosoma batterico replicandosi con esso e viene ereditato come i geni batterici. In questo stato il fago viene chiamato profago e conferisce al batterio che lo contiene l'immunità contro fagi dello stesso tipo. La relazione che intercorre tra fago e cellula bersaglio è detta lisogenia, pertanto il fago è detto temperato. Quando si verificano condizioni ambientali sfavorevoli al batterio, il fago nel suo stato di profago abbandona la cellula ospite producendo nuove particelle fagiche ed intraprende il ciclo litico (3). Se un fago litico penetra in un nuovo ospite batterico può riprendere il ciclo oppure entrare nello stato lisogenico. I fagi possono infettare una specie batterica ma anche uno o pochi ceppi di essa. L'azione dei fagi non distrugge la microflora commensale dell'intestino evitando la comparsa di effetti collaterali quali diarrea e le infezioni secondarie opportunistiche. (4). Queste conseguenze sono spesso riscontrate dopo somministrazione prolungata di antibiotico. Ogni specie batterica presenta diversi ceppi patogeni che non sono sempre suscettibili al fago selezionato, pertanto, la specificità rappresenta anche uno svantaggio clinico poiché

impone, da parte del fago, il rapido riconoscimento della cellula batterica e la sua capacità specifica di infettarlo. L'host range dei fagi quindi è ristretto e limitato, ma ciò può essere risolto realizzando una collezione, o pool, costituita da diversi fagi ognuno capace di infettare uno specifico ceppo. Infatti alcune tecniche hanno prodotto fagi modulari che esprimono proteine che permettono ad uno stesso fago di attaccare e lisare varie specie batteriche. I batteriofagi più complessi, come quelli della serie T, hanno una forma a spillo. La testa contiene l'acido nucleico, sotto a questa si trova un collare, seguito da una coda che si sfrangia all'estremità liberando 5 o 6 fibre. Il fago T2 è un batteriofago virulento del genere dei virus di tipo T4 che infetta *Escherichia coli*. Il fago T2 fu uno dei primi ad essere studiato nel dettaglio. Ne furono infatti individuati sette che infettano *Escherichia coli*. In seguito ci si rese conto che T2, T4 e T6 presentano una struttura molto simile (testa poliedrica, struttura specifica della coda e fibre apposite per attaccarsi alla superficie). Il fago T2 è noto per essere stato usato in un celebre esperimento da Alfred Hershey e Martha Chase, che dimostrarono che il DNA dei virus è iniettato all'interno della cellula batterica ed è responsabile della produzione di ulteriori DNA e proteine virali, mentre le proteine, restando all'esterno, non sono ereditate tra le generazioni. Il fago è infatti ricoperto da uno strato protettivo a base proteica ricco in zolfo, che resta all'esterno del batterio in seguito all'iniezione. Il DNA, unica molecola contenente fosforo, fu invece ipotizzato essere responsabile della trasmissione ereditaria dei caratteri. Hershey e Chase utilizzarono infatti fosforo e zolfo marcati ed evidenziarono che solo il fosforo marcato era ereditato dalle generazioni successive.



## Ciclo litico e ciclo lisogenico



Placche di lisi

## 2.TERAPIA FAGICA

### 2.1 Storia

Nel 1896 Hankins notò l'esistenza di "agenti anti-batterici" nei fiumi Gange e Jumna (5, 6). F.W. Twort pubblicò il primo resoconto sui fagi nel 1915(7). I primi esperimenti concreti sui batteriofagi furono però eseguiti da Felix d'Herelle a partire dal 1917, il quale evidenziò la validità dell'attività antibatterica dei batteriofagi su *Shigella dysenteriae* nei conigli e su batteri che causavano il tifo nei polli. Il vantaggio della terapia fagica, ovvero di impiegare fagi come agenti antibatterici, ha assunto notevole importanza con l'aumento di batteri resistenti agli antibiotici e di conseguenza ha ostacolato sensibilmente le terapie tradizionali. Nel 1930 d'Herelle fondò a Tbilisi, in Georgia, l'istituto per lo studio dei batteriofagi, dove da diversi anni si effettuano applicazioni sull'uomo(8). Negli anni successivi si ebbero altri risultati incoraggianti in India dove Morison utilizzò i fagi per il trattamento profilattico di un'epidemia di colera. Negli anni 30' negli USA una compagnia farmaceutica produsse dei preparati fagici contro specie di *Staphilococcus* ma alcuni insuccessi clinici e l'introduzione negli anni 40' degli antibiotici ne ostentarono l'attività produttiva.

Nei paesi dell'Europa dell'est fin dalla scoperta dei fagi, la terapia fagica è stata ben apprezzata e sono stati condotti innumerevoli studi su di essa. In Georgia, i ricercatori mostrarono un tasso di successo dell'80% nei confronti di infezioni causate da enterococchi. In Polonia i medici hanno evidenziato lo stesso successo nei confronti di infezioni causate da altri batteri quali *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e altri (9.)

Nel 1941 la terapia fagica è stata messa da parte. Negli anni 1959 - 1960, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha scartato la terapia fagica a causa del successo della tetraciclina (10). Tuttavia, nel 1970 uno studio fatto in Pakistan e sponsorizzato dal WHO ha scoperto che alte dosi di fagi erano equivalenti agli effetti della

tetraciclina per il controllo clinico del colera(11).Dal 1980 al 1990 si rinnova l'interesse per la terapia fagica. Smith e Huggins lavorano con un fago specifico per *Escherichia coli* chiamato K-1 e scoprono che i fagi sono più efficaci di streptomicina, tetraciclina, ampicillina, e TMP-SMX (10).

## **2.2 Vantaggi della terapia fagica**

I vantaggi offerti dalla terapia fagica dipendono dalle caratteristiche dei batteriofagi che, diversamente dagli antibiotici, non si diluiscono, ma crescono in modo rapido ed esponenziale, pertanto spesso è sufficiente una singola dose di fagi per controllare l'infezione. L'espansione dei fagi in vivo sfrutta la popolazione batterica infettante, aumentando quando la carica microbica è alta e diminuendo quando la concentrazione batterica decresce. La rapida espansione aumenta la possibilità di comparsa di mutanti capaci di svolgere un'attività antibatterica più efficace del ceppo selvatico. I batteriofagi rispondono rapidamente alla selezione (12), la quale è in grado di dare al fago un vantaggio evolutivo che può aumentare la sua capacità antibatterica.

I fagi sono attivi contro i batteri intracellulari. E' stato dimostrato che è possibile usare il *Mycobacterium smegmatis*, un micobatterio avirulento, come vettore per trasferire all'interno dei macrofagi il fago litico TM4. Il metodo è risultato efficace in vitro nel ridurre il numero dei micobatteri *M. avium* o *M. tuberculosis* intracellulari (13).

I fagi non danneggiano la normale flora intestinale e l'ingegneria genetica ha sviluppato fagi modulari (che esprimono non uno, ma diversi recettori) in grado di infettare diverse specie batteriche (8).

L'alta specificità dei fagi è importante perché riduce anche il rischio di sviluppare infezioni secondarie (14). Se somministrati per via endovenosa, i batteriofagi si diffondono rapidamente in tutto il corpo e possono anche moltiplicarsi in vivo, cosa questa importante perché non sono necessarie dosi ripetute. Questa proliferazione di progenie in

vivo contribuirebbe anche in applicazioni topiche, perché sarebbe in grado, più degli antibiotici, di infiltrarsi nelle ferite e raggiungere più velocemente i batteri. I fagi lavorano velocemente. Uno studio su topi infettati con *Enterococcus faecium* vancomicina-resistenti ha mostrato che, se il fago è stato iniettato 45 minuti dopo l'infezione, il 100% dei topi sopravvivono, e dopo un solo giorno quasi tutti erano di nuovo in piena salute (4).

### **2.3 Limiti della terapia fagica**

I limiti della terapia fagica sono rappresentati dal fatto che i batteri sviluppano resistenza contro i fagi. Nonostante ciò il tasso con cui i batteri sviluppano resistenza ai fagi è circa 10 volte più basso del tasso con cui compare la resistenza agli antibiotici (15). Uno dei fattori che potrebbe ostacolare la terapia fagica è la presenza di tossine batteriche nel preparato fagico. Queste ultime possono causare sintomi variabili, dalla ridotta attività fisica fino alla morte a seconda della tossicità e della concentrazione della tossina. Diverse tossine batteriche sono prodotte da fagi : la tossina del *Corynebacterium diphtheriae*, la tossina del *Vibrio cholera*, la tossina Shiga dell'*E. coli*. Gli *Streptococchi* del gruppo A sono molto eterogenei dal punto di vista genetico e della virulenza e gran parte di queste differenze sono dovute alla presenza di batteriofagi.

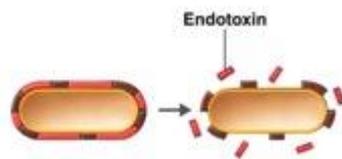
### **2.4 Il futuro della terapia fagica**

I batteriofagi possono essere utilizzati in molte applicazioni correlate alla terapia (14). Per esempio, può essere possibile utilizzare i prodotti di fagi, piuttosto che tutto l'organismo virale. Se si isolassero dai fagi le lisine, che rompono il peptidoglicano nella parete cellulare batterica, allora si potrebbe somministrare la proteina da sola. Un altro possibile utilizzo di batteriofagi è contro i batteri dell' agricoltura e della pesca (14). Nella fase

iniziale, l'applicazione della terapia fagica, probabilmente, sarà quella di controllare l'insorgenza di infezioni batteriche nelle colture. Un'altra applicazione potrebbe essere nel settore della pesca per limitare le infezioni dei pesci, crostacei, ecc. Infatti, il controllo dei patogeni del pesce attraverso la terapia dei fagi è oggi già praticata e ha avuto molto successo. Esiste una società chiamata OmniLytics dedicata alla realizzazione di prodotti fagici che possono essere utilizzati in molti contesti. Prendono di mira i batteri dell'agricoltura, ciò per migliorare la sicurezza degli alimenti e dell'acqua e trattano attrezzature industriali. Questa società è stata in grado di prendere l'idea dei batteriofagi e applicarla a una varietà di aree, portando innovazioni specifiche utili in molti campi. Per esempio, hanno ricevuto il permesso dalla USDA (United States Department of Agriculture) per il trattamento di pollame vivo con prodotti di batteriofagi prima della macellazione per ridurre la contaminazione da *Salmonella*.

### 3. TERAPIA FAGICA E IMMUNITA'

Vi sono prove che l'uso di fagi per il controllo terapeutico delle infezioni batteriche influenza la risposta del sistema immunitario per combattere l'infezione. Oltre al loro ruolo nella clearance diretta dei batteri, molti studi hanno anche documentato i cambiamenti nei livelli di citochine, nel reclutamento dei leucociti, e nella produzione di anticorpi. In un articolo che documenta l'efficacia della terapia dei fagi nell'ospite immunocompromesso, Borysowski e colleghi descrivono due meccanismi principali dell'effetto terapeutico dovuto alla terapia dei fagi (16). Il primo si basa sull'uccisione diretta delle cellule batteriche durante il ciclo litico, mentre l'altro dipende dall'induzione di una risposta immunitaria antibatterica da entrambe le particelle, dei fagi stessi o dai costituenti di cellule batteriche morte, come il lipopolisaccaride (LPS). L'LPS, chiamato anche endotossina, è un componente di alcune pareti delle cellule batteriche ed è un potente stimolatore del sistema immunitario.



#### **Rilascio dell' endotossina durante la lisi cellulare.**

Questo studio ha sottolineato diversi esperimenti effettuati sui topi immunocompetenti che suggeriscono l'uccisione diretta dei batteri come il principale meccanismo dell'effetto terapeutico. Zimecki e colleghi nel loro studio hanno trovato prove significative di una maggiore attività immunitaria dovuta ai fagi mediante somministrazione profilattica di batteriofagi nel trattamento delle infezioni da *Staphylococcus aureus* nei topi (17). I topi

sono stati iniettati mediante via intraperitoneale con la ciclofosfamide che è un'immunosoppressore (CP) e poi, quattro giorni dopo, è stato somministrato per via endovenosa lo *S. aureus*. I fagi specifici per *S. aureus* sono stati somministrati per via intraperitoneale 30 minuti prima dell' infezione. I risultati hanno indicato che il numero estremamente elevato di batteri in topi trattati con CP è stato abbassato ai valori osservati nei topi non sottoposti a trattamento CP (con sistema immunitario sano) mediante pretrattamento con i fagi. I risultati hanno indicato un'efficace riduzione della carica batterica, ma hanno anche rivelato effetti positivi sulle attività del sistema immunitario. Nel loro studio sull'applicazione della terapia fagica per combattere la prostatite batterica cronica, Letkiewicz e colleghi hanno trovato forti evidenze che fagi purificati possono avere un effetto anti-infiammatorio. Essi modificano la funzione dei fagociti, diminuiscono l'attivazione delle citochina infiammatoria, del fattore nucleare  $\kappa$ B, e riducono l'adesione delle piastrine e delle cellule T. I loro esperimenti hanno inoltre dimostrato che i fagi sono in grado di inibire la formazione di specie reattive dell'ossigeno da parte dei neutrofili, e quindi riducono i danni ai tessuti che accompagnano di solito il processo infiammatorio cronico. Durante il loro studio, i ricercatori hanno anche osservato una riduzione significativa del livello della proteina C-reattiva (un marker infiammatorio). Tutte queste proprietà anti-infiammatorie contribuiscono alla riduzione dei sintomi. Carmody e colleghi descrivono anche effetti anti-infiammatori dei fagi nelle loro ricerche sulle infezioni da *Burkholderia cenocepacia*. Al fine di determinare se il trattamento con i fagi potesse attenuare l'infezione associata a infiammazione polmonare, i livelli di citochine proinfiammatorie TNF- $\alpha$  e MIP-2 sono stati misurati nei polmoni 48 ore dopo il trattamento. Nei topi AU0728 infettati è stato osservato che il trattamento con i fagi determina una riduzione significativa del livello di TNF- $\alpha$ , sia se somministrati per inalazione che per iniezione intraperitoneale. È stato anche scoperto che nei topi trattati tramite iniezione intraperitoneale si riduce significativamente il livello di MIP-2 nei

polmoni. Per valutare il potenziale pro-infiammatorio del fago da solo, i livelli di citochine sono stati misurati dopo 24 ore di trattamento con il fago. Questi topi non hanno mostrato livelli apprezzabili di TNF- $\alpha$  o MIP-2 nei polmoni anche 48 ore dopo il trattamento. In contrasto con gli effetti positivi sul sistema immunitario che i fagi hanno mostrato in alcuni studi, recentemente si sta valutando una eventuale risposta negativa immune da parte fagi, specialmente dopo il trattamento ripetuto. Nello studio condotto da Fischetti sulle lisine, sono stati esaminati gli effetti che gli anticorpi hanno sugli effetti terapeutici dei fagi. (18)

Dal momento che le lisine sono proteine in grado di stimolare una risposta immunitaria, l'attivazione da parte del sistema immunitario potrebbe mostrare una interferenza significativa sull'effetto terapeutico, cosa che non è un problema per gli antibiotici tradizionali. Per studiare questo problema, è stato testato l'effetto sull'attività litica del fago Caporale-1 contro la polmonite di siero di conigli iperimmuni. I risultati dello studio mostrano che il siero altamente immune rallenta, ma non blocca l'attività litica del Caporale-1. Uno studio è stato poi condotto sui topi, che sono risultati positivi per gli anticorpi contro il Caporale-1 dopo una precedente vaccinazione con il fago. Dopo l'inoculazione endovenosa di pneumococchi, i topi con l'anticorpo contro Caporale-1 hanno mostrato lo stesso grado di riduzione dei batteri dei topi senza anticorpo. Ciò indica che gli anticorpi hanno poco o nessun effetto neutralizzante. Nel loro lavoro sull'infezione da *Burkholderia cenocepacia* polmonare, Carmody e colleghi suggeriscono che l'effetto della terapia fagica è rapido e probabilmente più veloce di quello che l'immunità specifica è in grado di sviluppare (19). Tuttavia, l'effetto dell'esposizione a lungo termine ai fagi è sconosciuta. Dosi ripetute di fagi contro antigeni diversi per evitare la reattività immunologica è un mezzo per aggirare questo problema. La maggior parte degli scenari in ambito clinico comporterebbe cocktail di fagi multipli con diverse specificità dei recettori. In un altro studio (4) è stato dimostrato che anche se i topi hanno sviluppato anticorpi IgG e IgM per il fago, non c'erano però reazioni anafilattiche, alterazioni della

temperatura corporea, e altri effetti avversi. Quindi anche se la presenza di batteriofagi determina la produzione di anticorpi, essi non hanno alcun effetto dannoso sulla salute umana. Al contrario, il trattamento con i fagi consente la stimolazione per la produzione di neutrofili e contemporaneamente l'eliminazione di microrganismi suscettibili

### **3.1 Trattamenti alternativi con i fagi**

Oltre allo studio sull'efficacia dei fagi nel trattamento delle infezioni batteriche, è stata condotta anche una ricerca sull'efficacia di combinazioni di fagi come terapia antimicrobica, e sull'uso di lisine prodotte dai fagi per combattere direttamente i patogeni. Zimecki e colleghi descrivono i benefici di un'azione combinata di lattoferrina e fagi nel trattamento delle infezioni di *Escherichia coli* e *S. aureus* nei topi (20). La lattoferrina (LF) è una proteina che si trova nei fluidi secreti dai mammiferi e nei granuli secondari dei neutrofili, e mostra sia funzioni antibatteriche che antinfiammatorie. È stato anche dimostrato che la lattoferrina migliora la produzione dei neutrofili. Nell'esperimento, i topi sono stati iniettati con *E. coli* o *S. aureus*, mentre i batteriofagi specifici per *E. coli* o per *Staphylococcus aureus* sono stati somministrati per via orale o intraperitoneale un'ora dopo l'iniezione di batteri. La lattoferrina è stata iniettata per via endovenosa 24 ore prima dell'infezione. I risultati hanno mostrato che sia la somministrazione orale che quella intraperitoneale dei fagi riducono il numero di batteri nel fegato, mentre l'azione combinata di batteriofagi e LF ha prodotto un effetto additivo significativo. Fischetti e colleghi hanno studiato l'effetto antibatterico delle lisine prodotte dal batteriofago in vari tipi di infezioni (21). La lisina è una proteina che rompe il peptidoglicano dei batteri, così da uccidere i batteri gram-positivi dopo il contatto. Questi ricercatori hanno studiato l'efficacia della

lisina nel trattamento di diverse malattie e le sue potenzialità per essere utilizzata in sinergia con gli antibiotici. Questo studio ha mostrato che una dose di lisina somministrata un'ora dopo l'infezione con *S. polmonite* non è stata sufficiente ad eliminare completamente i batteri dopo 48 ore. Tuttavia, quando il trattamento viene fatto con più dosi di lisina, viene recuperato il 100% dei topi affetti da polmonite che, senza il trattamento sarebbe stata fatale. Dal momento che le lisine non possono riprodursi come i fagi, sono necessarie diverse dosi di enzima per eliminare completamente l'infezione.

### **3.2 Sicurezza della terapia fagica**

Anche se i batteriofagi sono generalmente considerati sicuri, ci sono alcune preoccupazioni che sono fonte di studio per la letteratura. Alcune preoccupazioni sono le stesse associate agli antibiotici, come la resistenza acquisita, mentre altre preoccupazioni sono dirette esclusivamente alla sicurezza dei fagi per l'impiego come agente terapeutico.

### **3.3 Preoccupazioni relative all'attività litica**

Kropinski e colleghi nei loro studi hanno espresso preoccupazioni per i fagi temperati che sono in grado di trasferire geni tra ceppi virulenti di batteri mediante un processo chiamato "conversione lisogena" (22). I fagi temperati sono caratterizzati dal ciclo lisogenico attraverso il quale integrano il proprio DNA nel DNA batterico, che viene poi replicato in ogni cellula batterica figlia. Il DNA del virus può a volte portare geni che aumentano la patogenicità dei batteri. Inoltre, l'infezione da fagi temperati non sempre porta alla lisi e

questo tipo di fago non uccide il 100% dei batteri. Pertanto, solo fagi litici dove l'infezione porta esclusivamente alla morte delle cellule, hanno le caratteristiche per essere usati come agenti terapeutici. L'uccisione diretta e la lisi dei batteri da parte dei fagi litici, tuttavia, solleva nuove preoccupazioni in materia di sicurezza di questo agente terapeutico. Matsuda e colleghi hanno esaminato il ruolo che la terapia fagica può avere nell' aumentata espressione di mediatori infiammatori che possono portare a pericolose complicazioni nei pazienti (23). La lisi di alcune specie di batteri può portare al rilascio di endotossina che causa un enorme aumento nella produzione di citochine infiammatorie, che possono dare luogo a shock tossico. Questi ricercatori hanno studiato l'efficacia di un fago mutante A3 T4 (LYD) che non esprime Holin, una proteina necessaria per lisare le pareti cellulari dei batteri. Poiché si tratta di fagi litici, l'infezione da sempre porta alla morte cellulare, ma dal momento che manca Holin, non si dovrebbe avere la lisi cellulare. Uno studio è stato condotto su topi affetti da peritonite causata da *E. coli*. I topi iniettati con i fagi LYD sopravvivono per l' 81% dopo 48 ore. Questi risultati sono stati confrontati con topi di controllo (0%) e fagi wild-type (52%). I fagi LYD riducono i livelli di endotossina e il rilascio delle citochine.

### **3.4 Recenti esperimenti sui fagi**

Negli ultimi anni, la terapia fagica è stato utilizzata per una grande varietà di microrganismi. I fagi sono stati utilizzati nel trattamento di infezioni sperimentali. Per esempio, in uno studio fatto sui conigli sono stati utilizzati i fagi per prevenire l'infezione con un enteropatogeno, ovvero col il ceppo di *E. coli* 0103 (24). Un altro studio ha mostrato il successo nell'utilizzo dei fagi che attaccano l'antigene capsulare K1 di *E. coli* e prevengono così la setticemia e altre patologie(25).Un altro studio ha utilizzato i fagi specifici KH1, KH4, e KH5 per controllare *E. coli* O157 in vitro (26). Ricerche fatte sull'utilizzo di fagi per combattere l'infezione da *Lactococcus garvieae* hanno messo in

evidenza ottimi risultati nel pesce ricciola. Questo studio prova che sia somministrazioni intraperitoneali che orali evitano l'infezione (27). Mentre, un altro studio ha utilizzato il fago specifico contro *Pseudomonas plecoglossicida* che causa ascite emorragica in alcuni pesci. Cosa più interessante è che i batteri sono diventati resistenti al fago e quindi meno virulenti. (28). Successivamente, l'Università della Florida ha esaminato fagi specifici contro *Vibrio vulnificus*. Tutti i topi non trattati muoiono entro 24 ore dal contagio, mentre nessuno dei topi trattati con il fago è morto (29). Uno studio ha utilizzato una lisina isolata da un fago specifico per streptococco chiamata lisina C1, che è specifica per i gruppi A, C ed E di Streptococco. La lisina ha avuto un rapido effetto letale sia in vivo che in vitro su streptococchi di gruppo A (30). Infine, un altro studio ha dimostrato che i fagi sono efficaci se usati per curare una potenziale infezione da enterococco vancomicina-resistente nei topi (4). I fagi sono stati utilizzati anche per curare le infezioni negli esseri umani. La terapia fagica è stata impiegata per il trattamento di pazienti settici (31), contro severe infezioni batteriche (32), per curare l'infezione in pazienti affetti da cancro (33). Inoltre, i fagi sono stati utilizzati dal 1981 al 1986 in 550 casi di infezioni batteriche causate da *S. aureus* e da batteri Gram-negativi con un miglioramento osservato nel 92,4% dei pazienti. In particolare si è visto che i fagi sono stati molto efficaci nel trattamento contro *S. aureus* con una sensibilità del 95% (34). I fagi sono stati utilizzati in via sperimentale anche per il controllo ambientale della contaminazione da microrganismi. Un American Society for Microbiology ha indicato che i fagi sono efficaci per il trattamento di infezioni causate da *Vibrio vulnificus*, antrace, così come per la contaminazione di carne e pollame (35, 4). Per esempio, i fagi sono stati impiegati per diminuire la crescita di *Pseudomonas* nella carne bovina (36). In uno studio più recente, i fagi sono stati utilizzati per ridurre la contaminazione da *Salmonella* su fette di melone. Lo stesso risultato non si è però avuto su fette di mela a causa dell'acidità della stessa. (37)

#### 4. FAGO-RESISTENZA

I vaccini sono costituiti da *antigeni* privi di tossicità che vengono iniettati o ingeriti per stimolare le difese specifiche contro un particolare microrganismo. Il vaccino deve essere un preparato che non ha patogenicità ma che conservi gli antigenici che inducono protezione. I vaccini contengono, oltre agli antigeni, anche sostanze aggiunte, *additivi*, per migliorarne la stabilità e la conservazione (es. albumina, antibiotici, antisettici). Possono contenere altre sostanze aggiunte, *adiuvanti*, per rendere più valida la risposta immunitaria (es. idrossido d'alluminio, fosfato di alluminio). La fago-resistenza che spesso sviluppano i batteri avviene quasi sempre ad un costo elevato che si traduce, nella maggior parte dei casi, in perdita di alcune caratteristiche fisiche.(38). Questo cambiamento fa sì che batteri fago-resistenti e fago sensibili coesistono (39). La selezione batterica per la fago resistenza potrebbe essere quindi sfruttata come un approccio per isolare ceppi attenuati di qualsiasi specie batterica. Il batterio fago-sensibile crescendo in vitro in presenza del fago specifico da origine a colonie fago- resistenti. Data la loro origine comune, i due ceppi sono simili, ma mostrano delle differenze cruciali. Le differenze variano a seconda della specie batteriche, e possono consistere nella perdita, per il ceppo fago-resistente, di componenti della parte batteriche spesso importanti, in quanto responsabili della virulenza del batterio. Il batterio dunque acquista resistenza al fago ma ciò avviene a spese della sua virulenza. Il ceppo è definito “attenuato” e non essendo più virulento, può essere utilizzato come possibile “vaccino”. Conservando infatti le costituenti antigeniche che inducono protezione e non infettando l'ospite, tali ceppi stimolano il sistema immunitario nella produzione di anticorpi contro quello specifico patogeno virulento(39).

## 5. IPOTESI

La produzione di anticorpi neutralizzanti (40, 41), la rapida comparsa di ceppi batterici resistenti al fago (40-42), e l'efficacia dei fagi solo quando somministrati poco dopo l'infezione batterica, (43) sono le critiche più frequenti fatte nei confronti dell'utilizzo clinico dei fagi. Questo studio descrive un fago litico contro *S.aureus*, caratterizzato dall'assenza delle limitazioni di cui sopra. Inoltre lo studio prevede un'indagine relativa al costo della fago resistenza per isolare ceppi batterici attenuati contro *S.aureus*. I fagi per infettare i batteri, selezionano un componente essenziale della parete cellulare batterica e lo usano come recettore (29). Per ottenere la resistenza, i batteri devono necessariamente espellere il componente o alterare la sua conformazione (2). Tuttavia, questa perdita è molto costosa per i batteri, che spesso diventano meno virulenti o avirulenti. Abbiamo esaminato in un modello murino di infezione questa fago resistenza e abbiamo indagato sulla possibilità di evitare, o quantomeno ridurre, diverse infezioni clinicamente rilevanti come quelle causate da ceppi di *S. aureus* o altri batteri proprio attraverso l'utilizzo dei suddetti ceppi attenuati o di componenti di essi. In particolare, abbiamo esaminato il polisaccaride (PS1) e il peptidoglicano (PG) di *S.aureus*. Il PG rappresenta circa il 50% in peso della parete cellulare dei batteri Gram-positivi, consentendo loro di resistere alla pressione osmotica (44). Il PG di *S. aureus* è coinvolto nell'attivazione del complemento, nell'immunità cellulo-mediata (45) e nell'opsonizzazione (46). PG è presente su tutti i ceppi di *S. aureus* ed è visibile sulla parete cellulare.

## **6. MATERIALI E METODI**

### **6.1 Batteri**

Lo studio ha incluso ceppi di *S.aureus* e i loro mutanti fago resistenti (A172, A178, A180, A182) tutti identificati come descritto (47). Per esperimenti in vitro e in vivo, lo *S.aureus* è stato cresciuto nel brodo TSB (Tryptone soya broth) a 37°C, raccolti nella fase di crescita esponenziale ( $OD_{600}$ :0,6-0,9), centrifugati (8000g per 10 min) e lavati con soluzione salina (0,15 M di NaCl).

### **6.2 Isolamento del fago**

Quando i batteri cresciuti in TSB sono nella fase esponenziale di crescita, si aggiunge mitomicina C (concentrazione finale 1ug/ml). Dopo incubazione con mitomicina C per 30 min, i batteri sono lavati in TSB e incubati a 37°C per 4h. Il surnatante è stato poi filtrato (membrana 0.45 µm) e testato mediante spot test per identificare placche di lisi. Il DNA del fago è stato isolato come descritto in precedenza.( 48.)Il tasso di adsorbimento è stato misurato miscelando 1 ml di fago MSa ( $1.5 \times 10^3$  PFU/ml) e 1ml di *S.aureus* A170 ( $5 \times 10^8$  CFU/ml). Dopo incubazione segue trattamento con 200ul di cloroformio.Per determinare il periodo di latenza e il burst size, *S. aureus* ( $5 \times 10^8$  CFU/ml) è incubato con il fago MSa ( $3 \times 10^3$  PFU/ml) per 5 min, lavato con TSB per rimuovere i fagi liberi e risospeso in TSB fresco. La sospensione cellulare è stata periodicamente titolata per la produzione di nuove particelle fagiche su un letto di batteri in soft agar 0,7%.

### 6.3 Topi

Gli esperimenti sono stati eseguiti su topi BALB / c femmine. I fagi ( $10^7$  PFU in 100 ml di soluzione salina) sono stati inoculati per via endovenosa, via intramuscolare o aerosol. Nel caso dell'infezione per via intramuscolare, i topi hanno ricevuto  $5 \times 10^6$ - $10^8$  batteri sospesi in soluzione fisiologica sterile (100 ml /mouse). Nel caso di infezione via aerosol, i topi sono stati collocati in una camera di nebulizzazione ed esposti a una soluzione spray ( $10^8$  CFU /ml) per 10 min. Il giorno dopo l' infezione i polmoni presentavano  $1.6 \times 10^5 \pm 5.5 \times 10^3$  CFU/ g / topo (media di 3 topi). Gli organi sono stati sezionati e pesati. I campioni sono stati omogeneizzati in 1 ml di soluzione salina e serialmente diluiti in soluzione salina. Le colonie formanti unità (CFU) sono state valutate nel test di carica batterica e espresse come CFU/ g. Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati approvati dal Comitato etico dell'Università degli Studi di Napoli per la cura degli animali (permesso numero 86/609/CEE).

### 6.4 Prova di neutralizzazione del fago e inibizione dell'attività litica del fago

I batteri A170 o A172 batteri ( $10^5$  CFU/100  $\mu$ l) sono stati coltivati (per 4 h) in 2 ml TSB, in presenza o assenza di: 5-20 mM N-acetilglucosamina (GlcNAc), 5-20 mM glucosio (Sigma, Milano), acido teicoico da A170 (A170TA) o A172 (A172TA). E' stato poi aggiunto il fago MSa ( $10^9$  PFU/tubo) e la crescita batterica ( $OD_{600}$ ) è stata misurata 30 minuti dopo. Inoltre i batteri A170 o A172 ( $10^5$  CFU/100 $\mu$  l) sono stati coltivati (per 4 h) in 2 ml TSB, in presenza o assenza di N-acetil-glucosaminidasi da *Canavalia ensiformis* (Sigma; 4 U / tubo). Successivamente è stato aggiunto il fago MSa ( $10^9$  PFU) e la crescita batterica ( $OD_{600}$ ) è stata misurata 30 minuti più tardi.

## **6.5 Real-time PCR di trascrizione inversa (RT-PCR).**

Le reazioni sono state effettuate in 20 ml di miscela di reazione in triplice copia con il seguente profilo termico: 95 °C per 10 min e 45 cicli di 15 s a 95 °C e 45 s a 60 °C; 1 min a 60 °C; 15 s a 95 °C più 0.3° C. La quantificazione relativa di espressione genica è stata calcolata usando il metodo standard , con il gene gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH per i geni delle citochine) utilizzato come controllo endogeno.

## **6.6 Isolamento dei ceppi fago resistenti**

Il fago MSa è stato isolato dal ceppo di *S. aureus* A170 mediante induzione con mitomicina (49). I fagi MSa1, MSa2 e MSa3 sono stati rispettivamente isolati da ceppi di *S. aureus* A177, A179 e A181; il rilascio del fago è stato ancora una volta indotto con mitomicina (49). Ceppi di *S. aureus* A172, A178, A180 e A182 fago resistenti sono stati isolati attraverso spot test di diluizioni di colture sensibili su TSA (Tryptone soya agar ) contenenti concentrazioni crescenti del fago utilizzato per la selezione. Dieci singole colonie sono state selezionate e poste in subcoltura due volte su agar TSA in assenza di fago. Per garantire la stabilità della resistenza, due colonie da ogni ceppo fago- resistente sono state ulteriormente poste in subcoltura (20 volte o più) in assenza di fago. L'induzione della fago-resistenza con mitomicina esclude la presenza di profagi in questi ceppi.

## **6.7 Titolazione di anticorpi anti-A172**

I topi sono stati immunizzati con il ceppo A172 ( $10^8$  CFU / topo) e dopo due settimane è stato fatto un prelievo di sangue per poter poi eseguire un test ELISA. I pozzetti di una

piastra a 96 wells (Falcon, Milano) sono stati rivestiti con *S. aureus*, quencati con 3% di albumina sierica bovina (50 µl/pozzetto, per 2 h), lavati con PBS, incubati con siero anti-A172 diluito ( $10^2$  - $10^4$ ) in PBS (50µl / pozzetto per 2 h), lavati con PBS e incubati, in successione, con anti- IgG di topo (50 µl /pozzetto per 2 h) legato alla perossidasi e con un substrato della perossidasi (100µl / pozzetto; Bio-Rad, Milano).

## **6.8 Analisi dei carboidrati e purificazione della capsula polisaccaridica.**

### **Cromatografia di affinità con ConA - Sepharose**

Gli acidi teicoici di A170 (A170TA) e A172 (A172TA) sono stati isolati e preparati come descritto (50). I monosaccaridi sono stati analizzati mediante gas cromatografia-spettrometria di massa combinate (GC-MS) e confrontati con gli standard. Altre analisi sono state effettuate come descritto (51). Il ceppo A172 (100 µl) è stato coltivato in TSB. Al momento della fase di crescita esponenziale, la cultura è stato centrifugata (8000g per 10 min) e il surnatante precipitato con etanolo a freddo (-20°C per tutta la notte). Il surnatante e il precipitato sono stati separati mediante centrifugazione (8000g per 10 min). Il precipitato, insolubile in H<sub>2</sub>O e in diversi solventi organici (metanolo, etanolo, cloroformio, o dimetilsolfossido), è stato scartato. Il surnatante è stato dializzato per 3 giorni, liofilizzato, pesato e testato per la capacità di proteggere i topi. I topi vaccinati con il surnatante (25 µg / mouse) sono stati completamente protetti contro una dose letale di A170. Questa frazione, chiamata polisaccaride capsulare (CP), è biologicamente attiva (3,4 g) ed è stata idrolizzata con 0,1 M HCl a 100°C per 48 h. E' stata estratta la parete cellulare da *S. aureus* con acido tricloroacetico (52) e ulteriormente purificata con Concanavalina A coniugata a Sepharose (ConA-Agarosio, Sigma, Milano, Italia). La sospensione di lectina

(500  $\mu$  l) è stato centrifugata, lavata con tampone Tris-HCl e il pellet sospeso in 500  $\mu$  l dello stesso buffer. La sospensione (2,8 mg in 5 ml di Tris-HCl pH 7,5) è stata mescolata con la ConA-Agarosio, incubata per 1 ora, centrifugata ed è stato recuperato il surnatante (frazione ConA-) . Il pellet è stato lavato tre volte con tampone Tris-HCl e la parete cellulare eluita dalla matrice con 5 ml di 0,2 M  $\alpha$ -metil-diglucoside (Sigma) (frazione ConA +). Le frazioni ConA- e ConA + sono state dissalate (Sephadex G-25), liofilizzate, pesate e testate separatamente per la capacità di proteggere i topi.

## **6.9 Rilevamento di revertanti A172**

Singoli pozzetti di piastre a 96 wells sono stati riempiti con 200  $\mu$  l di TSB e inoculati con una colonia di batteri A172 isolati dai topi vaccinati con lo stesso ceppo e poi coltivati in vitro per 15 generazioni in condizioni di stress (10  $\mu$ g / ml novobiocina) (53). I batteri sono stati coltivati per 3 ore a 37° C. Singole colture (10<sup>9</sup>CFU/200 ml) sono state spottate su un letto di fagi (10<sup>12</sup>PFU / 5 ml di soft agar).I batteri sono stati così circondati da un gran numero di particelle virali. Le piastre sono state ispezionate per la presenza di placche di lisi durante i successivi 4 giorni. Il limite di rilevazione della prova è stato istituito con l'esecuzione della prova sulla stessa coltura di A172 con 1, 3, 6 e 12 batteri A170 MSa sensibili. La presenza di revertanti è stata studiata anche con un metodo indipendente, basato sulla crescita del titolo del fago di un coltura liquida dopo l'aggiunta del fago stesso (54). I batteri A172 (10<sup>9</sup> CFU/200 ml) cresciuti in presenza di novobiocina sono stati incubati per 1 h con il fago MSA (10<sup>5</sup> PFU). Le colture sono state poi trasferite su un letto di batteri A170 MSa sensibili (10<sup>5</sup> CFU / 4 ml di soft agar) per determinare se il titolo originale del fago era aumentato. Il limite di rilevamento del test è stato stabilito con un

test parallelo in cui il titolo del fago è stato valutato nella stessa coltura di A172 ( $10^9$  CFU /200 ml) con 1,3, 6 o 12 batteri A170 MSa sensibili.

### **Altri metodi.**

L'elettroforesi in campo pulsato di ceppi di *S. aureus* è stata eseguita come descritto (55).

I tassi di sopravvivenza dei topi sono stati analizzati utilizzando il test Kaplan Meier. La conta batterica e i livelli di citochine sono stati analizzati utilizzando il test *t* di Student.

## 7. RISULTATI

### *S.aureus*

Analisi fatte sui ceppi di *S.aureus* A170 e A172 mostrano una stretta relazione genetica tra il ceppo A170 fago sensibile e il ceppo A172 fago-resistente, infatti, come dimostra il modello di PFGE sono identici. (Figura 1). A172 è stato isolato dal ceppo A170 in presenza di concentrazioni crescenti del fago MSa. Oltre a MSa, il ceppo A172 è resistente anche ai fagi MSa1, MSa2 e MSa3. Colture liquide prolungate per diversi mesi in assenza di fagi e stoccaggio prolungato a -80°C non hanno alterato la resistenza di A172. Il ceppo è anche estremamente stabile in vivo. Batteri A172 sono stati isolati da topi vaccinati e cresciuti per 15 generazioni sotto condizioni di stress (10 µg / ml novobiocina)(53). A172 non produce alcuna placca di lisi se spottato su un letto di fagi. L'assenza di revertanti A172 è stata confermata in un secondo esperimento indipendente. Quando il fago MSa (10<sup>5</sup> PFU) è stato mescolato con i batteri A172 cresciuti in condizioni di stress (10<sup>9</sup> CFU /200 µl), non si è verificato nessun aumento misurabile nel titolo fago. In coltura liquida, rispetto al ceppo parentale, le colonie formate da A172 hanno la tendenza ad ammassarsi a partire dai primi momenti della fase stazionaria (Figura 2A-B). Sono state analizzate sospensioni batteriche di A170 e A172 con la stessa densità (OD600nm). In tre esperimenti indipendenti, culture contenenti A170 mostrano circa 3 volte più batteri di A172 (Figura 2C). Inoltre, a differenza di A170, A172 produce un polisaccaride capsulare. La resistenza al fago altera la trascrizione di numerosi fattori di virulenza. Di 14 ORF analizzati, almeno 13 sono down-regolati rispetto a A170 in maniera significativa (Figura3). Tra questi ORF, 9 geni controllano i fattori di virulenza(56). Spesso i fagi usano acidi teicoici per l'adsorbimento sulla parete cellulare dei batteri gram-positivi. Possono utilizzare come recettore gli acidi teicoici della porzione del glucosio come nel caso del *Bacillus subtilis* (56,57) o la N-acetilglucosammina (GlcNAc) come in

*S. aureus* (59). Per identificare il sito del recettore del fago MSa, A170 e A172 sono stati coltivati in presenza o in assenza di 5-20 mM di GlcNAc o 5-20 mM di glucosio. GlcNAc ha inibito la lisi di A170 da parte del fago MSa, mentre il glucosio non ha prodotto alcun effetto. L'inibizione di GlcNAc era dose dipendente (Figura 4A-B). L'esperimento è stato ripetuto con l'acido teicoico di A170TA o di A172TA come inibitori. In queste condizioni, l'inattivazione del fago si è verificata con A170TA, ma non con A172TA (Figura 4C). I batteri A170 sono stati poi trattati con N-acetilglucosaminidasi (4 U / tubo; 2 ore a 37°C) e l'idrolisi enzimatica di GlcNAc dei batteri A170 ha impedito la lisi da parte dei fagi (Figura 4D). Collettivamente, gli esperimenti sopra descritti dimostrano che A172 è conforme alla tendenza di diverse specie batteriche quali *B. subtilis* (61,62) *S. aureus* (59,60), *S. enterica* (58) che acquisiscono la fago-resistenza alterando la componente cellulare polisaccaridica. Il ceppo fago resistente A172 protegge il 90% dei topi (topi sopravvissuti: 18/20) da infezioni letali con A170, mentre i topi di controllo (10/10) sono morti tutti entro 4 giorni (Tabella 1). Se esaminati alla fine dell'esperimento (14 giorni dopo l'infezione), i reni dei topi sopravvissuti presentano CFU significativamente inferiori rispetto ai reni dei topi di controllo al momento della morte (Tabella 1). A172 pone il rischio di un ritorno al fenotipo virulento. Questo rischio è remoto, anche se può diventare notevole quando è prospettato l'uso di un gran numero di dosi di vaccino. Lo studio ha quindi indagato sulla capacità di A172 di conferire protezione una volta che è stato ucciso al calore (15 min a 100°C). I topi sono stati vaccinati con A172 ucciso al calore (A172-HK) e 2 settimane dopo infettati con una dose letale di A170. A172 ha protetto anche in questa forma (Tabella 1). Quando l'intervallo tra la vaccinazione e l'infezione è stato esteso a 20 settimane, i topi di controllo sono tutti morti entro 4 giorni (10/10) mentre quelli vaccinati (37/40) erano vivi 14 giorni dopo l'infezione (Tabella 1). Così, la protezione fornita da A172 dura almeno 20 settimane. È stato organizzato poi un esperimento per accertare se anche A170 ucciso al calore (A170-HK, 15 min a 100°C) conferisse

protezione ai topi. Non è stata osservata nessuna significativa differenza nella sopravvivenza tra i topi vaccinati e quelli di controllo. L'efficacia del A172-HK è stata testata contro due *S. aureus* meticillina-resistenti (MRSA) (A174 e A175) e contro uno *S. aureus* vancomicina-resistente (A176) isolati da pazienti con infezioni da stafilococco. Anche in questo caso la differenza di sopravvivenza tra topi vaccinati e topi di controllo è risultata statisticamente significativa in ogni caso (Tabella 2). I pazienti con fibrosi cistica sono altamente suscettibili ad infezioni polmonari con *S. aureus* (63). *S. aureus* è anche una delle più comuni cause di polmonite nei pazienti pediatrici e negli adulti.(64). Lo studio ha quindi indagato sull'efficacia di A172-HK contro infezioni polmonari e A172 è stato efficace anche se somministrato per aerosol (Tabella 3). In due esperimenti indipendenti anticorpi anti A172 HK hanno fornito protezione a tutti i topi esaminati (10/10). In un altro esperimento indipendente, i topi sono stati immunizzati con siero anti-A172 assorbito con rat IgG anti mouse. Il giorno dopo i topi si sono infettati con una dose letale di *S. aureus* A170. L'assorbimento del siero anti-A172 ha completamente eliminato l'effetto protettivo del siero (Tabella 4). Il ceppo A172 infine controlla l'infiammazione. Modula la trascrizione dei geni che codificano per le citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , mentre aumenta la trascrizione dei geni che codificano per le citochine anti-infiammatorie IL-4 e IL-6, quando questi geni sono stati analizzati mediante RT-PCR 24 e 48 ore dopo la vaccinazione (Figura 5). Gli esperimenti di cui sopra ed altri non riportati mostrano l'applicabilità generale della selezione per la resistenza al fago come mezzo per arginare la virulenza batterica. Infine è stata fatta un'analisi riguardo al polisaccaride capsulare (CP), prodotto dai ceppi fago resistenti (A172, A178, A180, A182). Nel tentativo di identificare il dispositivo di protezione di A172, il CP di questo ceppo (CP-A172) è stato purificato e analizzato mediante gas cromatografia liquida (GLC). CP-A172 contiene glucosio e mannosio nel rapporto molare di 3:1 e tracce (molare ratio: 0,3) di galattosio e GLCN (Figura 6). Topi immunizzati attivamente con CP-A172 (25 mg / topo) o

passivamente con il siero da topi immunizzati con CP-A172 erano tutti protetti contro una dose letale di A170 (Tabella 5). Due gruppi di topi sono stati immunizzati rispettivamente con ConA- o ConA + (PG) estratti da *S.aureus* A170 ceppo virulento. Due settimane dopo i topi sono stati infettati con una dose letale di *S. aureus* A170. I topi immunizzati con la frazione ConA + sono sopravvissuti tutti (10/10), mentre quelli immunizzati con il ConA- sono morti tutti (10/10) (Tabella 6). Il trattamento termico seguente (15 min a 100 ° C) ha fatto sì che il ConA + conservasse la sua attività protettiva, un risultato che rende improbabile che la protezione sia stata offerta da una glicoproteina (Tabella 6). L'identificazione della componente ConA + è stata perseguita con metodi sierologici ed enzimatici. Utilizzando come antigeni ConA +, peptidoglicano (PG) e l'acido lipoteicoico (LTA) da *S. aureus*, si è visto che il siero di topi immunizzati con ConA+ reagisce con l'antigene omologo ConA + (come previsto), con PG, ma non con LTA (Figura 7A). Il test ha fornito prove preliminari che PG, ma non LTA, è presente nel ConA +. L'assenza di LTA non è sorprendente dal momento che presumibilmente è stato rimosso dall'acido tricloroacetico utilizzato per estrarre la parete cellulare. Il siero di topi immunizzati con la preparazione ConA+ protegge i topi da una dose letale di A170. Il siero stesso perde questa proprietà se prima assorbito con PG. Questo risultato è prova che PG è il componente che offre protezione. Il ConA + è stato digerito con lisozima o lisostafina. Dopo digestione i preparati sono stati poi testati per vedere se conservavano la capacità di proteggere i topi da una dose letale del ceppo A170. La digestione con lisozima o lisostafina distrugge la capacità di ConA + di proteggere (Tabella 5). Dato che questi enzimi idrolizzano in particolare il PG, il risultato è un'ulteriore prova che PG, ovvero il ConA + sia il componente che conferisce protezione contro *S. aureus*. *S. aureus* A170 è stato coltivato in presenza di penicillina G (5 µg / ml). Quando la cultura ha raggiunto la fase stazionaria, il PG solubile (SPG) è stato isolato dal mezzo mediante cromatografia di affinità con ConA-Sepharose, testato per la reattività con anticorpi ConA + e utilizzato per

immunizzare i topi. Due settimane dopo con una dose letale di A170, i topi immunizzati sono sopravvissuti tutti (10/10) (Tabella 6). Dal momento che SPG è privo di qualsiasi altro componente della parete cellulare, l'esperimento fornisce una prova convincente che la protezione osservata in questo esperimento è offerta dal PG. La pentaglicina (GL5) è un unico epitopo del PG di stafilococco, mentre l'acido muramico (MA) e il Ribitolo (RBT) sono monosaccaridi riservati al PG e all'acido teicoico (TA), rispettivamente. Gly5, MA e RBT erano quindi i reagenti ideali per confermare la presenza di PG. In un saggio ELISA diretto, anticorpi ConA + legano Gly5 e MA, mentre non legano RBT (Figura 7), allo stesso modo, in una prova di competizione solo Gly5 e MA, insieme a PG, inibiscono il legame degli anticorpi ConA + con l'omologo antigene (Figura 7). Nel loro insieme, gli esperimenti offrono linee guida per provare che la componente di ConA + che conferisce protezione contro l'infezione da *S. aureus* corrisponde al PG, questo componente sarà indicato come A170PG:

## 8.DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio era quello di esaminare il potenziale terapeutico dei fagi e la possibilità di usarli per la produzione di possibili vaccini. In primo luogo, abbiamo dimostrato che i fagi sono altamente efficaci quando somministrati 2 settimane dopo l'infezione, in secondo luogo, che i batteri fago resistenti sono spesso avirulenti (o poco virulenti) e non sopravvivono in vivo per molto tempo. Questi risultati da un lato sottolineano la possibilità di utilizzare i fagi come antimicrobici, dall'altro, mostrano che i batteri fago resistenti, con la loro virulenza ridotta, potrebbero essere eccellenti vaccini. La selezione per la resistenza ai fagi, come approccio diretto per la produzione di vaccini, potrebbe rappresentare un contributo nuovo e significativo dei fagi per il controllo delle malattie batteriche. Il fago MSa per *S.aureus* è in grado di contrastare infezioni batteriche altrimenti letali e salvare il 100% degli animali trattati. I topi infettati con *S.aureus* e trattati con i fagi specifici non solo sopravvivono, ma diventano anche completamente sterili. La scoperta di un'associazione inversa tra la presenza di fagi virulenti e batteri sensibili è molto importante per un utilizzo migliore della terapia fagica. Ciò spiega perché, contrariamente a quanto accade con gli antibiotici, la somministrazione precoce dei fagi (quando la carica batterica è bassa) potrebbe essere controproducente. Questo consente anche di valutare se usare una singola dose di fago o se sono necessarie dosi multiple. Se i batteri si replicano rapidamente, una singola dose di fago è sufficiente, se i batteri invece si replicano lentamente, allora sono sicuramente più efficaci dosi multiple. L'emergere di ceppi di *S. aureus* resistenti agli antibiotici (65) rende il trattamento dei pazienti più difficile e, al tempo stesso, più urgente la necessità di un vaccino. Se si considera la complessa gamma di fattori di virulenza prodotti da *S. aureus*, è improbabile che un vaccino che sia specifico per un unico fattore di virulenza (cioè un vaccino a subunità) possa essere soddisfacente. Inoltre, il fattore di virulenza contro cui è diretto il

vaccino potrebbe avere una distribuzione limitata tra isolati clinici. Anche se il fattore fosse comune tra i ceppi di *S. aureus*, anticorpi preesistenti potrebbero neutralizzare il vaccino prima che possa essere efficace (65). Un vaccino, nella forma di un ceppo attenuato ottenuto con la selezione per la fago resistenza, potrebbe essere la scelta appropriata.(1,2,39). Per lo *S.aureus* diversi fattori di virulenza sono analizzati per il loro potenziale uso come vaccini. Tuttavia, anche in questo caso, è improbabile che un vaccino fatto con un singolo componente possa proteggere contro una moltitudine di fattori di virulenza. A170 e A172 pur essendo uguali, (Figura 1) allo stesso tempo, differiscono nella loro struttura dell'acido teicoico e nella capacità di secernere CP. Gli acidi teicoici di A172 non hanno la GlcNAc che spesso i fagi usano per l' adsorbimento sulla parete cellulare di *S. aureus* (66). Ancora più importante, GlcNAc e gli acidi teicoici di A170 (A170TA) inibiscono la lisi del fago MSa, mentre il glucosio o gli acidi teicoici di A172 (A172TA) no (Figura 4 A-B-C). Questi risultati suggeriscono che la A172 ha maturato la sua fago-resistenza, perdendo il sito di adsorbimento del fago (GlcNA). Tuttavia, A172 produce CP, una strategia che alcuni batteri mettono in atto per mascherare il loro sito di adsorbimento da parte del fago (66). Quindi, mentre la perdita di GlcNA è il probabile meccanismo adottato da A172 per ottenere la resistenza ai fagi, non può essere escluso il contributo dato della produzione di CP. La sterilizzazione è stata raggiunta in tutti gli organi bersaglio quali reni nei topi infettati con *S.aureus*.(Tabelle 1,2,3,5).Una singola dose di A172-HK (inattivato al calore), senza uso di adiuvanti, ha protetto dopo essere stato somministrato per via intramuscolare o via aerosol (Tabelle 1,2 e 3). A172-HK è efficace contro isolati di *S. aureus* meticillina-resistente (MRSA) o vancomicina-resistenti. L'immunizzazione passiva dei topi con il siero di topi vaccinati(10ul di siero,ma non 20ul) con A172-HK ha protetto contro una dose letale di *S. aureus* A170.(Tabella 4). Questi risultati indicano che alte dosi di anticorpi possono essere dannoso. A172 vivo ha protetto , mentre la A170-HK no. Tutti i ceppi fago resistenti esaminati (A172, A178, A180, A182)

secernono CP. I CP sono stabili al calore e possono conferire protezione (67). L'efficacia protettiva potrebbe risiedere nel CP. I risultati hanno confermato che CP-A172 offre protezione attiva e passiva ai topi contro una dose letale di A170 e i componenti principali di CP-A172 sono mannosio e glucosio (Figura 6). Infine i topi vaccinati con A172-HK e poi infettati con A170 mostrano un elevato livello di trascrizione della citochina proinfiammatoria IL-6 (Figura 5). Infezioni da stafilococco provocano il rilascio di citochine pro infiammatorie (68). In particolare, determinano elevati livelli di IFN- $\gamma$  nei reni di *S. aureus* di topi infettati. A172 induce una risposta equilibrata pro e anti-infiammatoria. In conclusione, nonostante i limiti suddetti, i dati presentati in questo studio sono importanti per il ruolo che i fagi possono avere come antimicrobici. Per *S.aureus* ma anche per altri patogeni i fagi potrebbero rappresentare la chiave per la produzione di ceppi attenuati da usare come vaccini. Tuttavia, l'applicazione di questi vaccini è limitata dalla difficoltà di sviluppare procedure affidabili di attenuazione batterica. Le evidenze finora disponibili (38) suggeriscono che la selezione per la resistenza ai fagi rappresenta un mezzo efficace per modulare la virulenza batterica e questa caratteristica non è una peculiarità del fago MSa o di  $\phi 1$  ma molto più generale. La fago resistenza, a lungo considerata un problema nella lotta contro i batteri(66), appare qui essere una opportunità. Considerando il ceppo virulento di *S.aureus* A170, diversi esperimenti dimostrano che la componente biologicamente attiva che conferisce protezione è il PG. In primo luogo, il siero di topi trattati con PG protegge i topi da una dose letale di A170, tuttavia, questa protezione si perde se il siero viene assorbito con PG (Tabella 6). In secondo luogo, PG perde la capacità di proteggere i topi se prima digerito con lisozima o lisostafina, enzimi che idrolizzano in particolare il PG (Tabella 6). In terzo luogo, coltivati in presenza di penicillina G (che inibisce l'incorporazione di PG nella parete cellulare), il PG si accumula nel terreno di coltura in forma solubile (SPG) privo di qualsiasi componente della parete (69,70); il PG dal ceppo A170 protegge i topi contro *S.*

*aureus* (Tabella 6). Quarto, il siero di topi trattati con A170PG riconosce due componenti unici del PG: GL5 e MA (Figura 7) In conclusione, A170PG potenzialmente potrebbe trovare applicazione per la profilassi e la terapia delle infezioni da stafilococco. Allo stesso tempo, si deve considerare che A170PG è stato testato in un modello murino e il topo non è un ospite naturale per *S. aureus*.

## TABELLE

**Tabella 1.** Attività protettiva di A172 in topi infettati con *S.aureus* A170.

Exp	Vaccinazione			Intervallo vaccinazione-infezione (settimane)	Infezione					
	Dose CFU/topo	Vaccino	Via		Dose CFU/mouse	Patogeno	Via	Topi vivi	$P_{\text{vibe}}^b$	CFU/g <sup>a</sup> (media $\pm$ SD)
1	10 <sup>8</sup>	A172L <sup>c</sup>	Im <sup>d</sup>	2	10 <sup>8</sup>	A170	Im	18/20	0.008	266 $\pm$ 11 <sup>e</sup>
					10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10		5.6 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 3.5 x 10 <sup>8</sup>
2	5 x 10 <sup>6</sup>	A170	Im	2	10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10	1	5.7 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 3.2 x 10 <sup>8</sup>
					10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10		5.2 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 1.5 x 10 <sup>8</sup>
3	10 <sup>8</sup>	A172HK <sup>f</sup>	Im	2	10 <sup>8</sup>	A170	Im	19/20	0.004	260 $\pm$ 25 <sup>e</sup>
					10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10		3.5 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 1.8 x 10 <sup>8</sup>
4	10 <sup>8</sup>	A172HK	Im	20	10 <sup>8</sup>	A170	Im	37/40	0.004	200 $\pm$ 11 <sup>e</sup>
					10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10		5.7 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 3.3 x 10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup> Colonie formanti unità per g di rene (esperimenti 1-4). Valori calcolati su 3 topi.

<sup>b</sup> Kaplan-Meier test.

<sup>c</sup> A172 Live.

<sup>d</sup> Intramuscolare.

<sup>e</sup> P < 0.001.

<sup>f</sup> Heat killed A172

**Tabella 2.** A172 ucciso al calore protegge contro un'infezione da *S. aureus*

Vaccinazione			Intervallo vaccinazione - infezione (settimane)	Infezione					
Dose (CFU/ topo)	Vaccino	Via		Dose (CFU/ topo)	Patogeno	Via	Topi vivi	P <sub>value</sub> <sup>b</sup>	CFU/g <sup>a</sup> (media ± SD)
10 <sup>8</sup>	A172 HK <sup>c</sup>	Im <sup>d</sup>	20	10 <sup>8</sup>	A174	Im	8/10	0.02	250 ± 22 <sup>e</sup>
				10 <sup>8</sup>	A174	Im	0/10		6.7 × 10 <sup>8</sup> ± 1.8 × 10 <sup>8</sup>
10 <sup>8</sup>	A172 HK	Im	20	10 <sup>8</sup>	A175	Im	9/10	0.01	330 ± 37 <sup>e</sup>
				10 <sup>8</sup>	A175	Im	0/10		5.8 × 10 <sup>8</sup> ± 1 × 10 <sup>8</sup>
10 <sup>8</sup>	A172 HK	Im	20	10 <sup>8</sup>	A176	Im	9/10	0.01	380 ± 26 <sup>e</sup>
				10 <sup>8</sup>	A176	Im	0/10		5.5 × 10 <sup>8</sup> ± 3.6 × 10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup> Colonie formanti unità per g di rene. Valori calcolati su 3 topi.

<sup>b</sup> Kaplan-Meier test..

<sup>c</sup> Heat killed A172

<sup>d</sup> Intramuscolare.

<sup>e</sup> P < 0.001.

**Tabella 3** . A172 ucciso al calore protegge contro un'infezione da S.aureus somministrato per via nasale o aereosol.

Exp	Vaccinazione			Intervallo vaccinazione – infezione (settimane)	Infezione					
	Dose (CFU/topo)	Vaccino	Via		Dose (CFU/topo)	Patogeno	Via	Topivivi	P <sub>value</sub> <sup>b</sup>	CFU/g <sup>a</sup> (media ± SD)
1	10 <sup>8</sup>	A172 HK <sup>c</sup>	Aer <sup>d</sup>	20	10 <sup>8</sup>	A170	Aer	19/20	0.004	216 ± 3 <sup>e</sup>
					10 <sup>8</sup>	A170	Aer	0/10		7.1 × 10 <sup>8</sup> ± 3.1 × 10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup> Colonie formanti unità per g di rene. Valori calcolati su 3 topi.

<sup>b</sup>Kaplan-Meier test

<sup>c</sup>Heat killed A172.

<sup>d</sup>Aerosol.

<sup>e</sup>P < 0.001

**Tabella 4.** Anticorpi anti-A172 ucciso al calore protegge i topi da un'infezione contro *S. aureus* A170.

Vaccinazione passiva				Infezione					
Exp	Trattamento	Dose (µl / topo)	Via	Dose (CFU/ topo)	Patogeno	Via	Topi vivi	P value <sup>b</sup>	CFU/g <sup>a</sup> (media ± SD)
1	Normal mouse serum	10	Im <sup>c</sup>	10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10	0.01	5.8x10 <sup>8</sup> ± 1x10 <sup>8d</sup>
	Anti-A172 HK serum	10	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	10/10		90 ± 7
	Normal mouse serum	20	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10	0.05	4.7x10 <sup>8</sup> ± 2x10 <sup>7d</sup>
	Anti-A172 HK serum	20	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	6/10		5.5x10 <sup>5</sup> ± 3.6x10 <sup>4</sup>
2	Normal mouse serum	10	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10	0.01	3.5x10 <sup>8</sup> ± 2x10 <sup>8d</sup>
	Anti-A172 HK serum	10	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	10/10		73 ± 6
	Normal mouse serum	20	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10	0.06	6.3x10 <sup>8</sup> ± 1x10 <sup>8d</sup>
	Anti-A172 HK serum	20	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	5/10		2.6 x 10 <sup>5</sup> ± 10 <sup>5</sup>
3	Anti-A172 HK serum adsorbito con rat anti-mouse IgG	10	Im	10 <sup>8</sup>	A170	Im	0/10		5.4x10 <sup>8</sup> ± 4.2x10 <sup>7</sup>

<sup>a</sup> Colonie formanti unità per g di rene. Valori calcolati su 3 topi.

<sup>b</sup> Kaplan-Meier test .

<sup>c</sup> Intramuscolare.

<sup>d</sup> P < 0.0001.

**Tabella 5.** Protezione attiva e passiva offerta da CP A172.

Exp	Vaccinazione			Intervallo vaccinazione – infezione	Infezione					
	Tattamento	Dose µg/topo	Via		Dose (CFU/ topo)	Patogeno	Via	Topi vivi	P <sub>value</sub> <sup>b</sup>	CFU/g <sup>a</sup> (media± SD)
1	CP A172	25	Im <sup>c</sup>	20(settimane)	10 <sup>8</sup>	A170	Im	20/20	0.004	138± 27 <sup>d</sup>
					-	-	-	0/10		4 x 10 <sup>8</sup> ±10 <sup>7</sup>
2	Anti – CP A172	10	Im	24(ore)	10 <sup>8</sup>	A170	Im	20/20	0.004	205 ± 42
	Normal mouse serum	10	-	-	-	-	-	0/10		3.8 x 10 <sup>8</sup> ±10 <sup>7</sup>

<sup>a</sup> Colonie formanti unità per g di rene. Valori calcolati su 3 topi.

<sup>b</sup>Kaplan-Meier test.

<sup>c</sup>Intramuscolare.

<sup>d</sup>p < 0.0001.

**Tabella 6 .** PG (peptidoglicano) è il componente della frazione ConA+ che conferisce protezione

Exp	Dose/ topo	Trattamento	Intervallo trattamento-infezione	Infezione		P-value <sup>a</sup>
				Patogeno	Topi vivi	
1	15µg	ConA <sup>+</sup> CW <sup>b</sup>	2settimane	A170	10/10	< 0.0001
	15µg	ConA <sup>-</sup> CW	2settimane	A170	0/10	
	15µg	Heat-treated ConA <sup>+</sup> CW	2settimane	A170 A170	10/10 0/10	
2	10µl	Non-absorbed ConA <sup>+</sup> CW Antibodies	24 ore	A170	10/10	< 0.0001
		PG-Absorbed ConA <sup>+</sup> CW Antibodies	24ore	A170	0/10	
3	15µg	Lysozyme-Digested ConA <sup>+</sup> CW	2settimane	A170	0/10	1
	15µg	Lysostaphin- Digested ConA <sup>+</sup> CW	2settimane	A170	0/10	1
4	15µg	sPG	2settimane	A170	10/10	< 0.0001
				A170	0/10	

<sup>a</sup>Kaplan-Meier test.<sup>b</sup>CW : cell wall, parete cellulare di A170.

## FIGURE

Figura 1

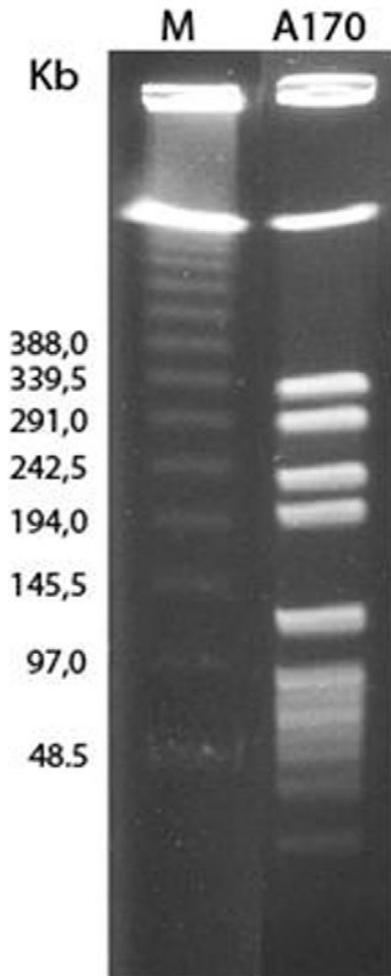


Figura 1. PFGE ( Pulsed field electrophoresis) pattern di Sma I digeriti da *Staphylococcus aureus* A170. Il ceppo A172 (dati non mostrati) presenta un pattern simile. M: DNA Size Standard, Lambda Ladder.

Figura 2

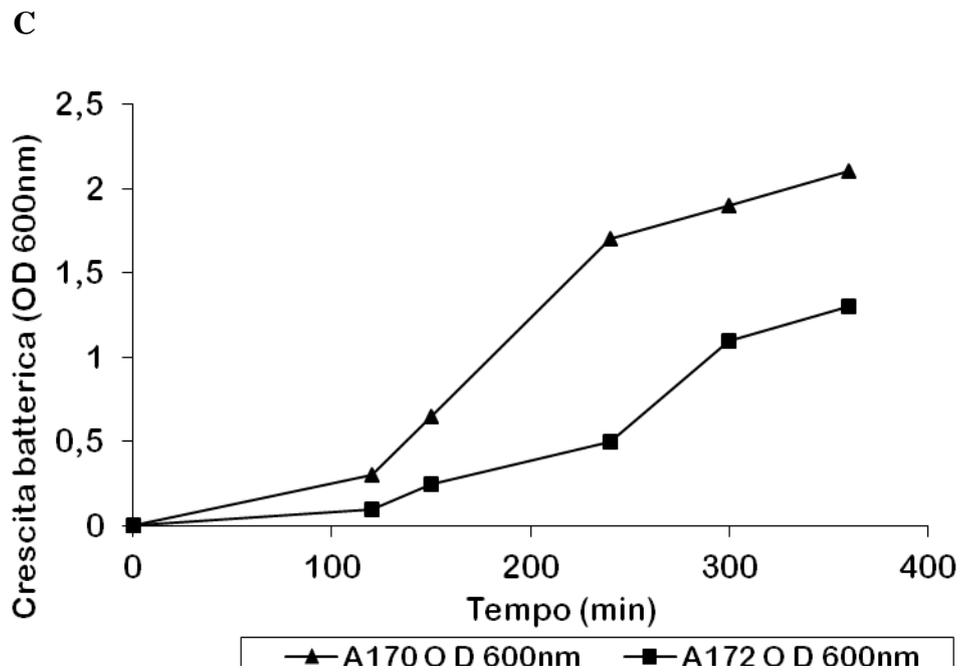
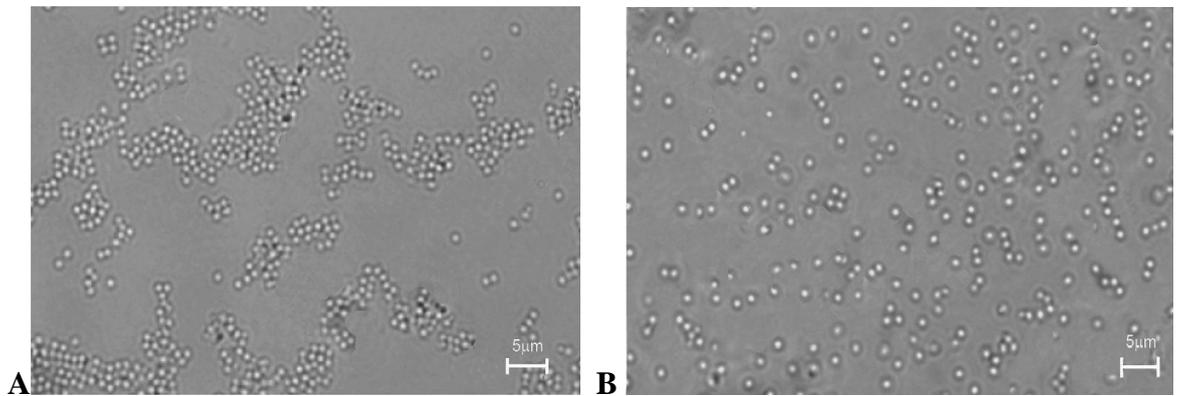


Figura 2. Il ceppo A172(A) forma dei grandi clumps rispetto A170(B). C. Il ceppo a172 cresce più lentamente rispetto a A170.

Figura 3

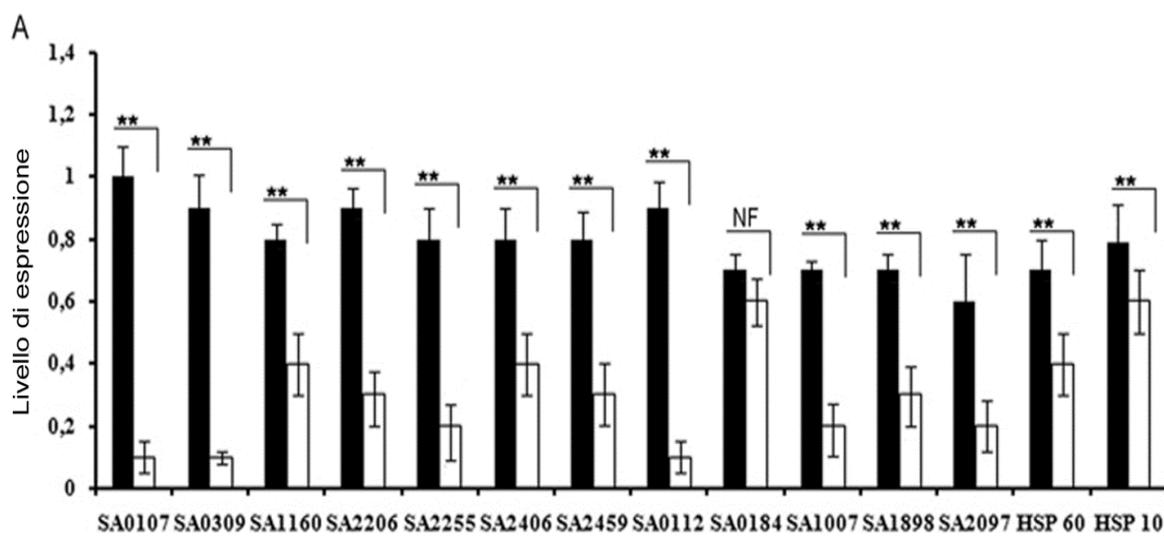


Figura 3. Livelli di espressione di 14 geni di virulenza di A170 e A172.

**Figura 4**

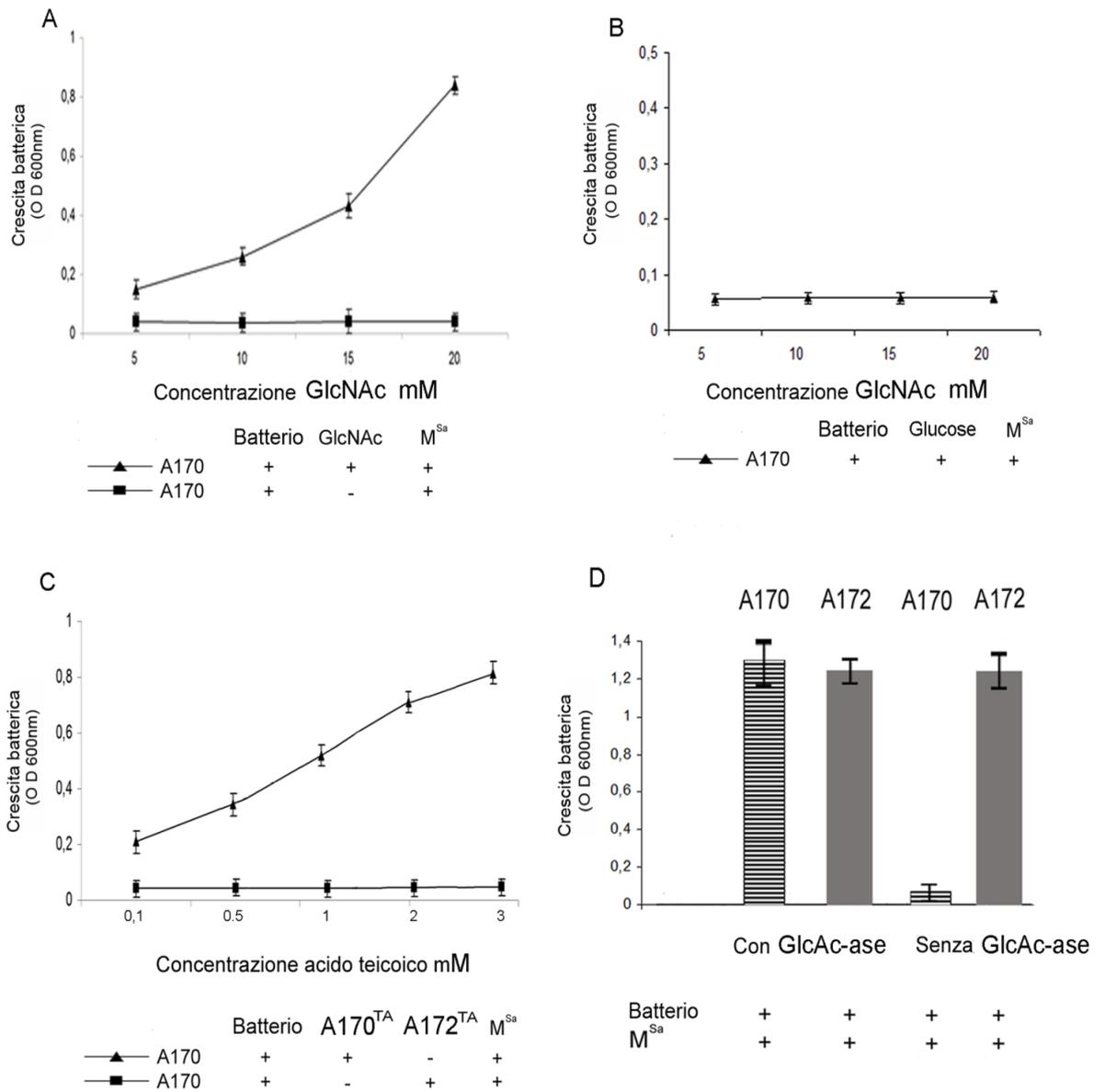


Figura 4. A. GlcNAc inibisce la lisi di A170 da parte del fago MSa, mentre il (B) glucosio no. C. L'acido teicoico di A170 inibisce la lisi di A170. D. A170 cresce in presenza del fago MSa se pretrattato con GlcAc-ase.

Figura 5

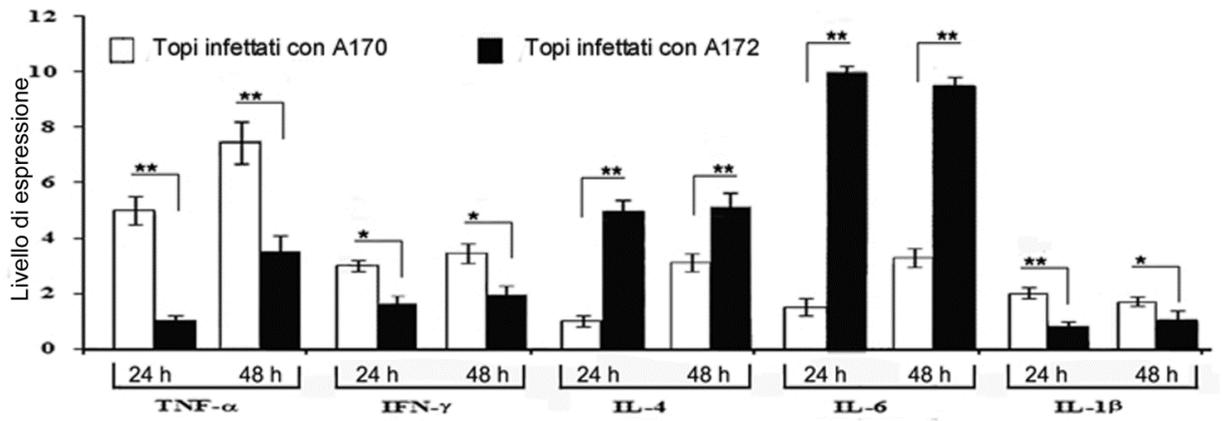


Figura 5. Attività anti-infiammatoria del ceppo A172 rispetto a A170.

Figura 6

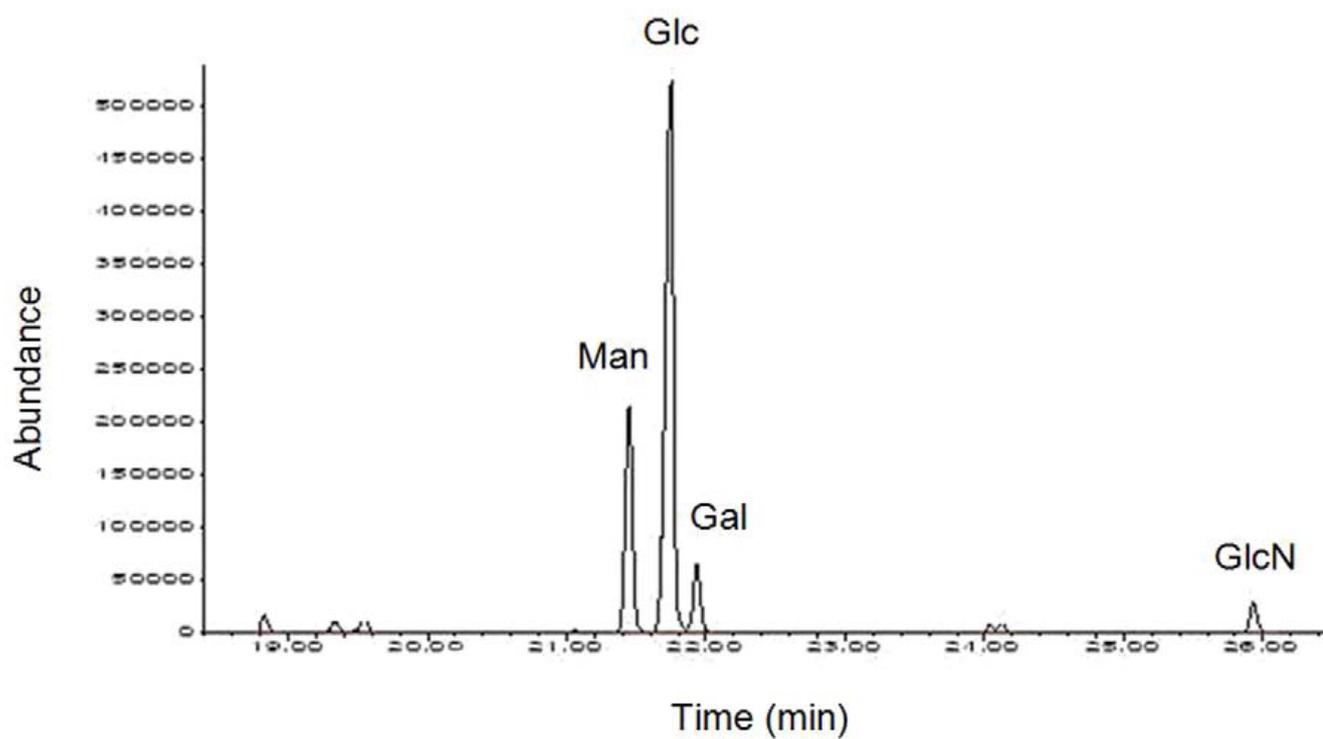


Figura 6. Cromatografia gas liquida. Profilo dei monosaccaridi ottenuti mediante idrolasi acida del polisaccaride capsulare di A172.

**Figura 7**

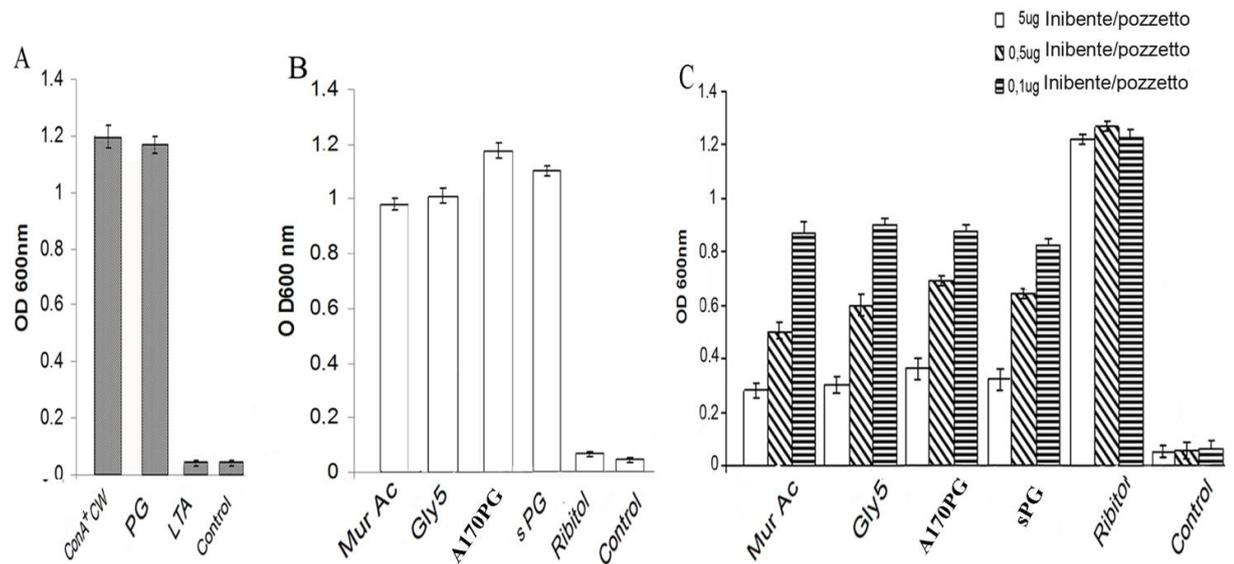


Figura 7. Il componente di A170 PG che conferisce protezione è il peptidoglicano. A .Il siero di topi immunizzati con A170 PG reagisce con il PG, ma non con LTA. B. Il siero di topi immunizzati con A170 PG lega l'omologo antigene; il sPG; la pentaglicina; l'acido muramico. Lo stesso siero non lega il ribitolo, specifico degli acidi teicoici. Questo risultato esclude che A170PG contenga acido teicoico. C. Il legame del siero suddetto con l'omologo antigene è inibito dall'acido muramico, dalla pentaglicina, dal sPG , dall'A170PG ma non dal ribitolo.

## BIBLIOGRAFIA

1.Zahid MS, Udden SM, Faruque AS, Calderwood SB, Mekalanos JJ, et al. (2008). Effect of phage on the infectivity of *Vibrio cholerae* and emergence of genetic variants. *Infect Immun* 76: 5266–5273.

2.Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Carrillo CL, Radzum KA, et al. (2007).Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLOS Pathogens* 3: 1142–1151.

3.Adams MH 1959

4. Biswajit Biswas, Sankar Adhya, Paul Washart, Brian Paul, Andrei N. Trostel, Bradford Powell, Richard Carlton, and Carl R. Merrill Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic from a Clinical Isolate of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* . *Infect Immun*. 2002 March; 70(3): 1664.

5.Kutter, E. (1997). Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics. {Online}  
Available HTTP: <http://www.evergreen.edu/user/t4/phagetherapy/phagethea.html>  
[2000, August 28].

6. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris Jr., J. G. (2001). Minireview. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (3), 649 – 659

7.Douglas, J. (1975). *Bacteriophages*. London: Chapman and Hall

8. Merril CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Jun;2(6):489-97. Review.

9. Parisi A. 2000

10. Barrow, P. (2000). An antibiotic alternative? *Chemistry & Industry*, 14, 461–464

11. Summers, W. C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55, 437–451.

12. Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S. Long circulating as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16;93(8):3188-92.

13. Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, Chacón O, Wagner D, McGarvey J, Barletta RG,

Bermudez LEJ Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *Infect Dis.* 2002 Oct 15;186(8):1155-60. Epub 2002 Sep 30

14. Inal JM. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(4):237-44. Review

15. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Mar;45(3):649-59.

16. Borysowski, J .. (2008, May). Is phage therapy in the immunocompromised host acceptable?. *International Journal of Infectious Diseases.* 12 (5), 466-471.

17. Zimecki, M .. (2009, May). Effects of Prophylactic administration of immunosuppressed mice infected with bacteriophages to *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology.* 17 (9), 169 -. from

18. Fischetti VA. Using phage Lytic Enzymes to Control Pathogenic Bacteria *BMC Oral Health* (2006)

19. Carmody, LA (2010, Feb). Efficacy of bacteriophage therapy in a model of pulmonary infection *Burkholderia cenocepacia*. *The Journal of Infectious Diseases.* 201 (2), 264-271..

20. Zimecki, M ..). Lactoferrin and The Concerted Action of bacteriophages in the clearance of bacteria in sublethally infected mice. (2008, Feb *Postepy Hig Med Dosw.* 7 (62), 42-46.

21. Fischetti, VA (2008, May). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinions in Microbiology.* 11 (5), 393-400. From PubMed.

22. Kropinski, AM (2006, May). Phage therapy-Everything Old is New Again. *Medical Microbiology.* 17 (5), 297-306.

23. Matsuda, T .. (2005, May). Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and Improves Survival in a murine peritonitis model. *Surgery*. 137 (6), 639-546.
24. Reynaud, A., Cloastre, L., Bernard, J., Laveran, H., Ackermann, H. W., Licois, D. & Joly, B. (1992). Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* O103. Attempts to use this phage for therapy. *Veterinarian Microbiology*, 30 (2 – 3),203 – 212.
25. Barrow, P., Lovell, M., & Berchieri Jr., A. (1998). Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5 (3), 294 – 298.
26. Kudva, I. T., Jelacic, S., Tarr, P. I., Youderian, P., & Hovde, C. J. (1999). Biocontrol of *Escherichia coli* O157-specific bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9), 3767 – 3773.
27. Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K. H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T., & Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garviae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Organ*, 37 (1), 33 – 41.
28. Park, S. C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K., & Nakai, T. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4), 1416 – 1422.

29. Pirisi, A. (2000). Phage therapy – advantages over antibiotics? *The Lancet*, 356 (9239), 1418.
30. Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98 (7), 4107 – 4112.
31. Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., & Kucharewicz-Krukowska, A. (1983). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981 - 1986. {Online} Available HTTP: <http://www.evergreen.edu/user/T4/1981-1986.html> [2000, September 13].
32. Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Kucharewicz-Krukowska, A., Dabrowski, M., & Bisikiewicz, R. (1983). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections 1. General evaluation of the results. {Online} Available HTTP:<http://www.evergreen.edu/user/T4/generaleval.html> [2000, September 13].
33. Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., & Gorski, A. (No date). Therapy of infections in cancer patients with bacteriophages. {Online} Available HTTP: <http://surfer.iitd.pan.wroc.pl/Phage3.htm> [2000, September 13].
34. Fogg, D. (2001). Warming cabinets; staffing levels; *Staphylococcus aureus*; gloving; gastrointestinal endoscopy; OR floors. *AORN Journal*, 73 (2), 486, 489 – 490, 492.
35. Travis, J. (2000). Viruses that slay bacteria draw new interest. *Science News*, 157 (23), 358.

36. Greer, G. G., & Dilts, B. D. (1990). Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, *10* (3 – 4), 331 – 342.
37. Leverntz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E., & Sulakvelidze, A. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: A model study. *Journal of Food Protection*, *64* (8), 1116 – 1121.
38. Capparelli R, Nocerino N, Lanzetta R, Silipo A, Amoresano A, Giangrande C, Becker K, Blaiotta G, Evidente A, Cimmino A, Iannaccone M, Parlato M, Medaglia C, Roperto S, Roperto F, Ramunno L, Iannelli D. Bacteriophage-resistant *Staphylococcus aureus* mutant confers broad immunity against staphylococcal infection in mice. *PLoS One*. 2010 Jul 22;5(7):e11720.
39. Bohannan BJ, Lenski RE (2000) Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecol Lett* 3: 362–377.
40. Stent GS. *Molecular biology of bacterial viruses*. San Francisco: Freeman & Co, 1963:6–9.
41. Lederberg J. Smaller fleas ... ad infinitum: therapeutic bacteriophage redux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:3167–8.
42. Kysela DT, Turner PE. Optimal bacteriophage mutation rates for phage therapy. *J Theor Biol* 2007; 249:411–21.
43. Bull JJ, Levin BR, DeRouin T, Walker N, Bloch CA. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol* 2002; 2:35.

44. Boneca I. (2005) The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr Op Microbiol* 8: 46-53.
45. Peterson P, Wilkinson B, Kim Y, Schmeling D, Douglas S et al (1978) The key role of peptidoglycan in the opsonization of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 61: 597-609.
46. Kowalski J, Berman D (1971) Immunological activity of the cell wall antigens of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 4: 205-211.
47. Mason W, J. Blevins J, Beenken K, Wibowo N, Ojima N, et al. (2001) Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infections. *J Clin Microbiol* 39: 3332–3338.
48. Binetti, A. G., B. Del Río, M. Cruz Martí'n, and M. A. Álvarez. 2005. Detection and characterization of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6069– 6103.)
49. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D (2007). Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2765–2773.

50. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, et al. (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 274: 8405–8410.
51. Ciucanu I, Kerek F (1984) A simple method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* 131: 209–217.
52. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, et al. (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 274: 8405–8410.
53. Korman R (1975) Cell wall composition of novobiocin-resistant pleiotropic mutant staphylococci. *J Bact* 124: 724–730.
54. Luria SE, Delbruck M (1943) Mutations of bacteria from virus sensitive to virus resistance. *Genetics* 28: 491–511.
55. McClelland M, Jones R, Patel Y, et al. Restriction nuclease for pulsed field mapping of bacterial genomics. *Nucleic Acids Res* 1987; 15:5985–6005.
56. Siragusa S, Di Cagno R, Ercolini D, et al. Taxonomic structure and monitoring of the dominant lactic acid bacteria population in wheat flour type I sourdough propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:1099–109.

57. Simmaco M, Mignona G, Canofeni S, et al. Temporins, antimicrobials from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem* 1996; 242:788–92.
58. Santander J, Robeson J. Phage-resistance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and pathogenesis in *Caenorhabditis elegans* is mediated by the lipopolysaccharide. *Electron J Biotechnol* 2007; 10:627–32.
59. Korman R (1975) Cell wall composition of novobiocin-resistant pleiotropic mutant staphylococci. *J Bact* 124: 724–730.
60. McCallum N, Karauzum H, Getzmann R, Bischoff M, Majcherczyk P, et al. (2006) In vivo survival of teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2352–2360.
61. Glaser L, Ionesco H, Schaeffer P (1966) Teichoic acids as components of a specific phage receptor in *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys Acta* 124: 415–417.
62. Young FE (1967) Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc Natl Acad Sci USA* 58: 2377–2384
63. Coyette JJ, Ghuysen M (1968) Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. IX. Teichoic acid and phage adsorption. *Biochemistry* 7: 2385–2389

64. Goerke C, Gressinger M, Endler K, Breitkopf C, Wardechi CK, et al. (2007) High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environm Microbiol* 9: 3134–3142.
65. Wardenburg JB, Schneewind O (2008) Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Exp Med* 205: 287–294.
66. Labrie S, Samson J, Moineau S (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiology* 8: 317–327.
67. Nilsson IM, Patti JM, Bremell T, Hook TM, Tarkowski A (1998) Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesion provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *J Clin Invest* 101: 2640–2649
68. HU DL, Omoe H, Sasaki S, Sashinami H, Sakuraba H, et al. (2003) Vaccination with non-toxic mutant toxic shock syndrome toxin I protects against *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 188: 743–752.
69. McKenney D, Kimberley L, Pouliot L, Wang Y, Murthy V, et al. (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284: 1523–1527.
70. Dziarki R, Gupta D (2005) *Staphylococcus aureus* peptidoglycan is a Toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect Immun* 73: 5212–5216.

## **Ringraziamenti**

-Alla Prof.ssa Capparelli e al Prof. Iannelli per avermi dato questa possibilità. Grazie per gli insegnamenti preziosi, per gli elogi e i rimproveri.

-Ai miei amatissimi genitori e a mia sorella Francesca, mia forza nei momenti difficili e senza i quali questo traguardo non sarebbe stato mai raggiunto. Grazie per essere da sempre i miei primi sostenitori e per avere sempre creduto in me.

-A Mario che ormai da due anni mi sopporta e supporta con amore e dedizione. Grazie per la pazienza e la dolcezza donatami ogni giorno.

-A Rosa e Francesco, presenze importanti in questi ultimi anni. Grazie per la vostra disponibilità, la vostra collaborazione e per i sorrisi che mi avete regalato ogni giorno.

-A tutte le persone conosciute in questi tre anni in laboratorio, ognuno ha lasciato qualcosa nel mio cuore e ricordi che resteranno indelebili.