



Sviluppo di protocolli di estrazione da acque reflue per isolare fagi attivi contro *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* antibiotico-resistenti

I. Totola (Verona), A. Bertoncilli (Verona), S. Morelli (Rovigo), A. Mazzariol (Verona)

INTRODUZIONE

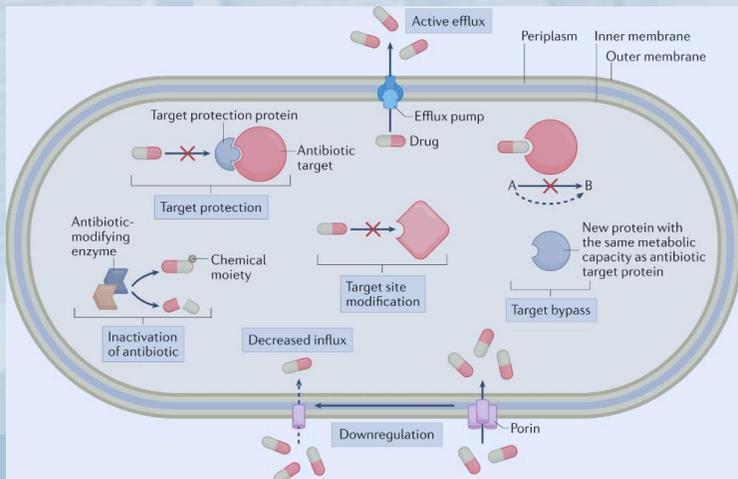
La multi resistenza è la condizione in cui i batteri non risultano più sensibili al trattamento antibiotico utilizzato per la terapia, rende più difficile trattare le infezioni sostenute da tali ceppi batterici e aumenta il rischio di diffusione della malattia anche nelle sue forme più gravi.

A livello sanitario, ma anche economico, è uno dei 10 problemi di salute mondiale che l'umanità si trova ad affrontare sia per i tempi di degenza in ospedale prolungati sia per il crescente investimento economico nei ricoveri e nei trattamenti terapeutici applicabili. In Europa si verificano ogni anno circa 4 milioni di infezioni da batteri antibiotico-resistenti, causando oltre i 37.000 decessi, negli Stati Uniti, invece, i soggetti raggiungono i 2 milioni/anno con un totale di circa 50.000 decessi.

A livello regionale l'Italia è uno dei paesi europei che ha il maggior numero di casi di infezioni da batteri antibiotico-resistenti, con una maggioranza di infezioni sviluppatesi in ambiente ospedaliero, principalmente a carico di germi multi resistenti quali *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.

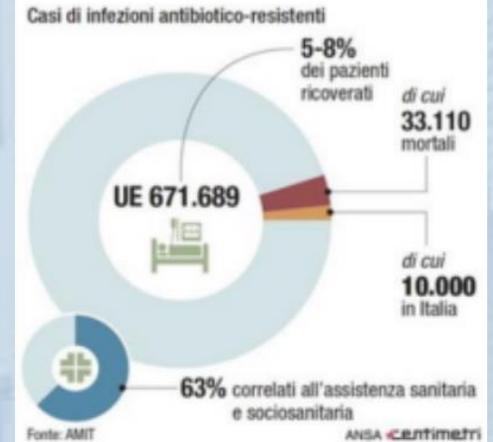
ORIGINE E DIFFUSIONE DELLA MULTIRESISTENZA

La resistenza agli antimicrobici ha origine naturale, ovvero emerge naturalmente da cambiamenti genetici che colpiscono il genoma batterico. I fattori che provocano l'insorgenza di farmaco-resistenza si possono individuare nel 50% dei casi, nell'uso eccessivo e improprio di antibiotici, ovvero nell'uso di antibiotici anche quando non sono necessari, nella prescrizione di antibiotici errati o nella posologia scorretta. I batteri diventano resistenti agli antimicrobici quando acquisiscono nel loro DNA dei geni di resistenza provenienti da un DNA extracromosomiale, chiamato plasmide, che può essere riprodotto e diffuso ad altri batteri con **meccanismi indipendenti e non ereditari**.



Oltre a questi meccanismi, si possono individuare delle mutazioni genetiche che alterano l'attività dell'antibiotico e che rendono quest'ultimo incapace di agire, come illustrato nell'immagine.

L'allarme sanitario



LA TERAPIA FAGICA

Una delle strategie individuate per superare la multi resistenza prevede l'introduzione di terapie innovative, tra le quali la terapia fagica. Essa consiste nell'utilizzo dei batteriofagi o fagi, ovvero dei virus che infettano i batteri uccidendoli, estratti prevalentemente da campioni ambientali, come il suolo e le acque reflue soprattutto degli ospedali dove sono in contatto con i batteri diffusi in quell'ambiente.

VANTAGGI:

- Mantenimento della flora batterica
- Somministrazione e univoca

SVANTAGGI:

- Difficoltà di raggiungimento delle sedi di azione
- Risposta anticorpale
- Resistenza
- Trasmissione dell'antibiotico-resistenza

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Costruire una banca di fagi da caratterizzare ulteriormente per essere impiegati in una terapia fagica

Ottimizzare un protocollo di lavoro per estrarre fagi attivi su ceppi isolati da infezioni croniche e multi resistenti dalle acque reflue delle due sedi ospedaliere dell'Azienda Universitaria Integrata di Verona

MATERIALI E METODI

- 43 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* produttrici di biofilm
- 14 ceppi di *Klebsiella pneumoniae* produttrici di OXA-48
- 22 ceppi di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemici

- Acque reflue dell'Ospedale Policlinico (OP)
- Acque reflue dell'Ospedale Civile Maggiore (OCM)

Le acque reflue sono acque utilizzate nelle attività umane, domestiche, industriali o agricole che contengono sostanze organiche e inorganiche dannose che, per tale motivo, necessitano un processo di depurazione prima del loro utilizzo. Lo scopo è quello di ottenere un effluente finale di qualità tale da essere idoneo allo sversamento in un corpo recettore senza che questo ne possa subire danni.

TECNICHE UTILIZZATE

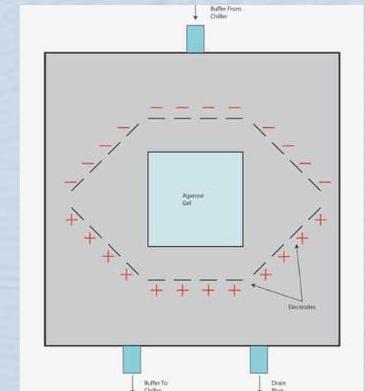
L'**estrazione di fagi dalle acque reflue** ha lo scopo di estrarre da un campione ambientale, fagi specifici per ceppi batterici isolati da pazienti aventi determinate patologie infettive. Nell'estrazione vengono inoculati insieme 5 ceppi batterici della stessa specie e isolati da infezioni croniche o multi resistenti, 50 ml di terreno BHA a doppia concentrazione e 50 ml di acqua reflua. In seguito ad incubazione o/n viene centrifugato e filtrato il surnatante, ottenendo il mix di fagi da cui poi si esegue la **prova del fago**. Allo scopo di determinare l'attività del fago sui 5 ceppi di partenza, è stato piastrato ogni ceppo su diverse piastre Petri insieme al terreno BHA soft e al fago e sono state osservate della placche fagiche, indici della lisi batterica causata dal fago. Le caratteristiche della placca sono correlate al tipo di batteriofago, alle caratteristiche del batterio ospite e ad altre caratteristiche fisiche e chimiche del sistema nel quale il batteriofago è prodotto.

Nelle piastre in cui si è ottenuta una placca di lisi viene aggiunto l'SM buffer, un buffer che consente di diluire e conservare i batteriofagi estratti in ambiente refrigerato; viene incubato a 4°C o/n e il giorno seguente viene centrifugato e filtrato il surnatante. In questo modo si ottiene l'**isolamento del fago** specifico attivo sul ceppo corrispondente.

Allo scopo di valutare il potenziale infettivo del fago, può essere eseguita la **tipizzazione del fago**, tecnica in cui viene testato il fago specifico su diversi ceppi batterici della stessa specie, eseguendo una prova del fago in cui viene utilizzato il fago isolato al posto del mix di fagi. Ottenuto il fago specifico viene eseguito l'**arricchimento del fago** tramite cui vengono rimossi i batteri endogeni dal fago e viene aggiunto a terreni di coltura e ad una



Placca litica fagica.



Schema della camera elettroforetica della PGFE.

coltura in crescita dell'ospite e poi viene incubato. Aumentando il volume di arricchimento aumenta la sensibilità della procedura e quindi la probabilità di rilevare il fago. Infine è stata condotta un'indagine di biologia molecolare, la **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**, sui ceppi di *Klebsiella pneumoniae* per individuare eventuali ceppi clonali cioè simili dal punto di vista genomico. In seguito ad un trattamento con lisozima e RNasi per digerire la parete batterica, ad una deproteinizzazione e a una digestione con enzima di restrizione, viene applicato un campo elettrico alternato all'interno di una camera elettroforetica e vengono separati i frammenti di DNA batterici in base alle loro dimensioni. Il prodotto finale è un gel contenente diverse bande colorate più o meno intensamente a seconda di quanto DNA contengono. Le bande dei diversi ceppi che corrispondono tra loro, identificano ceppi batterici clonali.

RISULTATI E CONCLUSIONI

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Partendo da 2 ceppi di *P. aeruginosa*, è stata fatta una prima **estrazione** usando i due tipi di acque. Sono stati ottenuti due fagi specifici dalle acque OP e due dalle acque OCM, che presentano una maggiore attività.

Con i fagi specifici OP è stata eseguita la **tipizzazione** sui 41 ceppi di *Pseudomonas*.

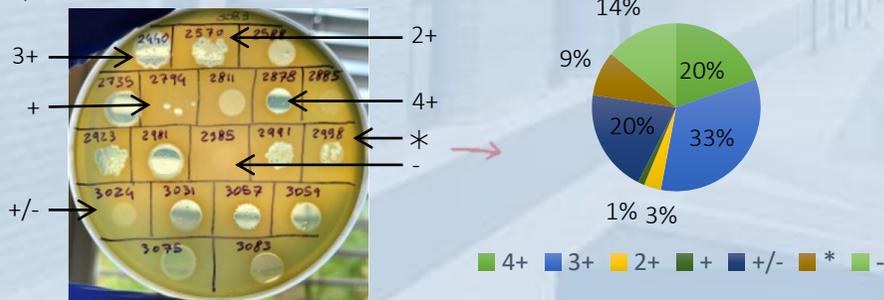
Estrazione



Tipizzazione con Acque OP

21 ceppi + con il fago 2813;
28 ceppi + con il fago 2647

Per la seconda **estrazione** sono stati utilizzati 41 ceppi di *P. aeruginosa* provenienti da pazienti con piede diabetico e sono stati divisi in pool da 5/6 ceppi, utilizzando l'acqua reflua OCM. Sono stati estratti 37 fagi specifici che sono stati utilizzati per la **tipizzazione**. Da questa sono state ottenute 7 tipologie di placca litica, a seconda della trasparenza e della conformazione della stessa, espresse anche in percentuale rispetto al totale:



Sono stati individuati diversi cluster di fagi aventi la stessa attività, ad esempio i fagi 1885 e 1931, che possono in linea teorica essere utilizzati per trattare un'infezione sostenuta da un ceppo sui cui tali fagi presentano attività.

BIBLIOGRAFIA

<https://www.aifa.gov.it>
<https://www.tgcom24.mediaset.it/salute/infografica>

Estrazione

K. PNEUMONIAE RESISTENTI AI CARBAPENEMICI

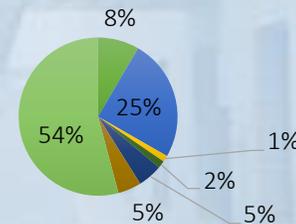
Acque OP	Acque OCM
0 positivi	21 positivi

K. PNEUMONIAE OXA-48 POSITIVE

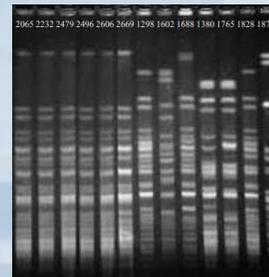
Acque OP	Acque OCM
1 positivo	6 positivi

Tipizzazione sui 22 ceppi di *Klebsiella*, usando i 21 fagi specifici estratti. I risultati dimostrano, come per le *Pseudomonas*, la presenza di 7 tipi di placche differenti, in diversa percentuale:

■ 4+ ■ 3+ ■ 2+ ■ + ■ +/- ■ * ■ -



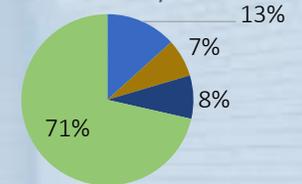
Sono stati individuati 6 ceppi aventi le stesse positività agli stessi fagi e sono perciò stati confermati con la PFGE:



Le prime 6 colonne a sinistra rappresentano i 6 ceppi: si può notare la corrispondenza delle bande, indice di clonalità.

Tipizzazione sui 14 ceppi di *Klebsiella* OXA-48, usando i 7 fagi specifici estratti. I risultati dimostrano la presenza di 4 tipi di placche differenti, in diversa percentuale:

■ 3+ ■ * ■ +/- ■ -



Sono stati individuati due cluster di ceppi aventi la stessa sensibilità ai medesimi fagi mentre, a differenza degli altri ceppi batterici di partenza, per le *Klebsiella* OXA-48 non sono stati individuati cluster di fagi con la stessa attività.

Oltre al cluster di ceppi, sono stati individuati altri gruppi di fagi aventi la stessa attività, come i fagi 1294, 1380, 1395 e 1688, che pertanto si può ipotizzare rappresentino lo stesso fago.

<https://bitesizebio.com>
<https://virologyj.biomedcentral.com>

<https://www.med4.care>