

# Indice

<b>1. Introduzione</b> .....	2
<b>2. I batteriofagi</b> .....	7
2.1 Cenni storici .....	7
2.2 Morfologia.....	8
2.2.1 La testa .....	9
2.2.2 La coda.....	11
2.2.3 Il dispositivo di penetrazione cellulare .....	13
2.3 Ciclo replicativo .....	14
2.3.1 Adsorbimento.....	14
2.3.2 Replicazione.....	15
2.3.3 Maturazione .....	16
2.3.4 Rilascio .....	16
<b>3. Principali agenti infettivi negli allevamenti e meccanismi di antibiotico-resistenza</b> .....	18
3.1 <i>Salmonella</i> spp. ....	18
3.1.1 Terapia e antibiotico-resistenza .....	20
3.2 <i>Campylobacter</i> spp. ....	23
3.2.1 Terapia e antibiotico-resistenza .....	24
3.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
3.3.1 Terapia e antibiotico-resistenza .....	27
<b>4. Ruolo dei batteriofagi come sostituti degli antibiotici</b> .....	29
4.1 Batteriofagi e <i>Salmonella</i> .....	30
4.2 Batteriofagi e <i>Campylobacter</i> .....	35
4.3 Batteriofagi e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
<b>5. Aspetti normativi</b> .....	43
<b>6. Conclusioni</b> .....	45
<b>7. Bibliografia e Sitografia</b> .....	48
<b>8. Ringraziamenti</b> .....	55

# 1. Introduzione

La Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO, Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura) riferisce, in un suo rapporto del 2023, che la richiesta di prodotti alimentari di origine animale subirà, entro il 2050, un aumento del 20% rispetto ai livelli registrati nel 2020 <sup>[1]</sup>. Così come è già accaduto negli scorsi decenni, all'aumento della domanda di suddetti prodotti la risposta più facile ed immediata è insita nella tecnica dell'allevamento intensivo: allevare il maggior numero di capi nel minimo spazio consentito <sup>[2]</sup>. In questa maniera, tuttavia, pur rispondendo positivamente alla richiesta di mercato, si rischia di incappare in questioni igienico-sanitarie che si riflettono non solo sulla salute degli animali allevati, ma anche su quella del consumatore. Gli animali allevati secondo tecnica intensiva, infatti, condividono ridotti spazi e sono tra loro geneticamente simili; pertanto, la probabilità della diffusione di eventuali agenti patogeni aumenta <sup>[3]</sup>. Questo si ripercuote sia sulla salute degli animali, per la presenza di affezioni cliniche o subcliniche, che andranno poi trattate con terapia medica, sia sul consumatore. Nello specifico, ciò accade quando l'animale infetto è un portatore sano, ovvero non manifesta la malattia, ma contamina potenzialmente il relativo prodotto alimentare (carne, uova, latte). Senza considerare, ovviamente, l'aspetto di una eventuale contaminazione chimica dell'alimento in caso di residui delle molecole farmacologiche utilizzate (pur esistendo, per tali sostanze, dei limiti massimi residuali individuati dalle normative). Negli ultimi anni, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA, European Food Safety Authority) ha concentrato parte del suo lavoro proprio nell'individuare metodiche di lavoro, nelle varie filiere di produzione di alimenti di origine animale, che riducessero la numerosità delle malattie a trasmissione

alimentare (MTA) date da animali portatori sani che contaminano i prodotti che derivano dalla loro filiera. Per questo motivo, si sono formati diversi gruppi di studio che hanno poi definito pareri da rivolgere ai legislatori europei, i quali, di risposta, hanno modificato alcune normative: l'innovazione più importante è stata quella nel campo dell'ispezione degli alimenti di origine animale, apportata dai Regolamenti (UE) 2017/625 e 2017/627. Secondo l'EFSA, infatti, la maggior parte delle MTA derivavano dal consumo di prodotti derivanti da capi con patologie subcliniche: non manifestando segni clinici di malattia, questi capi possono sfuggire a un controllo approfondito dei prodotti che ne derivano, consentendo l'immissione sul mercato di alimenti già in origine contaminati. Ad aggravare questo, il fatto che, perlomeno nel settore delle carni, le manualità del Veterinario Ufficiale potevano determinare cross-contamination tra le varie carcasse durante i controlli, inquinando le incontaminate. Per ridurre il rischio, la nuova normativa riduce le operazioni manuali di controllo, puntando maggiormente su un'ispezione di tipo visivo e documentale. Infatti, l'EFSA ha anche consigliato di implementare le informazioni sulla catena alimentare, le così dette ICA, che compaiono sui documenti di accompagnamento dei capi allevati e che vanno osservate prima della macellazione. Oltre a queste attenzioni, appunto la riduzione delle manualità durante il controllo ispettivo delle carni e l'implementazione delle ICA, l'EFSA ha anche indicato, per le varie filiere, degli indici epidemiologici armonizzati (IEA), ovvero dei parametri che misurano la diffusione e l'intensità di un pericolo in una popolazione o che fungono da indicatori del rischio per la salute umana. Senza entrare nel dettaglio, si tratta di controlli che vengono effettuati durante specifici momenti della produzione, a partire dall'allevamento stesso dei capi, in modo da individuare quanto prima

eventuali agenti patogeni ed agire di conseguenza, in un sistema di miglioramento continuo e nell'ottica della tutela del consumatore.

Un'altra conseguenza dell'allevamento intensivo, oltre alla maggiore probabilità di contaminazione degli alimenti che ne derivano, come già anticipato è la maggiore necessità di trattamenti farmacologici, in particolare quelli antibiotici. Per contrastare infatti la diffusione di agenti patogeni batterici ed il protrarsi delle infezioni, e in alcuni Paesi extra-UE addirittura come promotori di crescita, gli antibiotici rappresentano la classe elitaria di molecole in utilizzo. Tuttavia, data l'ingente quantità impiegata negli allevamenti intensivi, negli anni queste molecole hanno perso di efficacia: essendo gli agenti patogeni sempre più in contatto con le stesse, hanno sviluppato meccanismi di resistenza, rendendo gli antibiotici sempre meno efficaci o, addirittura, del tutto inutili <sup>[3]</sup>. Quanto detto porta ad un più difficile contrasto delle infezioni e, pertanto, un uso di dosi maggiori di antibiotici. A tal proposito, uno studio di Van Boeckel ed altri <sup>[4]</sup> ha riportato che, entro il 2030, la sola Cina utilizzerà negli allevamenti fino al 30% della produzione mondiale di antibiotici: una quantità enorme. L'EFSA ha riportato che tra gli agenti patogeni degli animali allevati e responsabili di zoonosi (MTA incluse) si hanno batteri, come *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli*, solo per citarne alcuni, spesso resistenti a più di una classe di antibiotici <sup>[2]</sup>. Senza nemmeno aver bisogno di numeri e statistiche, è un fatto di per sé allarmante, soprattutto in considerazione del lungo percorso di ricerca e sviluppo di nuove molecole antibiotiche, che impiega anni e non sempre è fruttuoso. Il consumatore, che è l'oggetto di tutela nell'ambito della professione di tecnico della prevenzione nell'ambiente e nei luoghi di lavoro, in questo panorama subisce un doppio svantaggio. Un primo, che spesso percepisce e del quale quindi si preoccupa, è quello dell'assunzione, tramite gli alimenti di origine animale, di residui delle sostanze farmacologiche che

sono state somministrate agli animali. Grazie anche all'attenzione mediatica al tema, il consumatore medio è consapevole del rischio che assume consumando qualsiasi alimento animale, proprio per questo nell'ultimo decennio circa hanno preso campo i trend del biologico e dell'antibiotic free. Sul mercato sono infatti ad oggi disponibili prodotti, ad un costo ovviamente maggiore, che promettono un trattamento diverso degli animali allevati, garantendo un approccio più "naturalistico", con riduzione o totale mancanza di trattamenti tipici di percorsi più industrializzati. Un secondo svantaggio, che spesso non è percepito dal consumatore, ma che è assai più imponente, si esercita su di lui in maniera indiretta: si tratta della persistenza nell'ambiente delle molecole residuali di antibiotico. Ogni farmaco assunto da un animale viene metabolizzato ed escreto per diverse vie, in dipendenza dalle caratteristiche della molecola: questo significa che una parte del farmaco assunto lascerà l'animale per via urinaria, oltre che tramite le sue feci o altri secreti. Ritrovandosi questi prodotti poi nell'ambiente, così come nella catena alimentare, i batteri avranno modo di entrarci in contatto e sviluppare più facilmente dei meccanismi di difesa, appunto le antibiotico-resistenze. Tanto più vengono usati questi farmaci, tanto più si vengono a creare microrganismi ad essi resistenti e lo saranno a prescindere dalla specie animale, uomo incluso, che andranno ad infettare. Questi microrganismi, infatti, sono gli stessi responsabili delle zoonosi che citavamo poc'anzi, ecco perché il consumatore subisce anche un effetto indiretto, per così dire, di una somministrazione eccessiva di antibiotici sugli animali allevati.

Nell'ottica di una riduzione del fenomeno dell'antibiotico resistenza, di cui si è descritto, almeno in parte, l'ingente impatto sulla salute animale ed umana, si stanno cercando approcci alternativi per contrastare la circolazione degli agenti batterici negli allevamenti. Un lavoro del 2016 <sup>[5]</sup>, riporta una serie di opzioni non convenzionali, tra le quali compare l'utilizzo dei

batteriofagi, microrganismi virali capaci di predare i batteri e causarne il decesso. Avendo ritenuto particolarmente interessante questa possibilità, la presente tesi verterà sulla descrizione dei batteriofagi e sul loro possibile utilizzo nella zootecnica, come alternativa alla più consueta antibioticoterapia.

## 2. I batteriofagi

### 2.1 Cenni storici

Durante la prima metà del '900, il batteriologo inglese Frederick W. Twort e il microbiologo franco-canadese Félix d'Hérelle scoprirono, indipendentemente l'uno dall'altro e grazie all'osservazione di una lisi spontanea di alcune colture batteriche, che esistevano dei virus in grado di inglobare ed uccidere i batteri. Il nome che venne attribuito a suddetti microrganismi fu quello di *batteriofagi*, a significare letteralmente "divoratori di batteri" (lat. *bacterium* "batterio" e gr. *baktérion* "bastoncello", gr. *fago* "mangiare").

I batteriofagi, si scoprì più avanti, sono microrganismi con una reattività specifica verso le differenti specie batteriche, diventando altamente efficienti quando entrano in contatto con quelle a loro sensibili. Infatti, si è dimostrato come, dopo aver lisato una coltura batterica, essi riescono a causare ulteriori lisi quando entrano in contatto con nuovi batteri dello stesso tipo: se si versa una coltura lisata con batteriofagi in un'altra, ancora non trattata, dello stesso batterio, si riesce ad ottenere la lisi anche di quest'ultima.

Vista la loro azione di contrasto verso lo sviluppo di colonie batteriche, si iniziarono a studiare i batteriofagi come possibili agenti terapeutici: purtroppo, fu evidente che l'efficienza ottenuta in vivo era molto inferiore a quella ottenuta in vitro. Le ricerche, tuttavia, non si fermarono e portarono ad interessanti scoperte. I fagi (abbreviazione per *batteriofagi*), considerati inizialmente degli organismi semplici, sono invece, per la maggior parte, virus tra i più complessi e con un range di diversità tra generi assai ampio.

## 2.2 Morfologia

I fagi più studiati sono quelli più grandi e complessi, in modo particolare i cosiddetti “fagi T pari” dell’*Escherichia coli*. Il più descritto e studiato tra essi risulta il batteriofago T4, appartenente alla famiglia *Myoviridae*. Esso è uno dei sette fagi dell’*Escherichia coli* e già dal 1944 fu oggetto di studio. Nel 1959, Brenner ed altri riuscirono ad ottenere immagini dei fagi T pari (T2, T4, T6) utilizzando la microscopia elettronica <sup>[6]</sup>. Questo evento diede inizio a studi approfonditi sulla morfologia e sulla struttura del fago, utilizzando principalmente la già utilizzata microscopia elettronica insieme alla criomicroscopia elettronica, una tecnica a risoluzione più elevata. Negli ultimi anni, molte proteine del T4 sono state studiate utilizzando anche la cristallografia a raggi X, che, insieme alla microscopia crioelettronica, hanno fornito informazioni strutturali e sulle interazioni che regolano i cambiamenti conformazionali durante l'assemblaggio e l'infezione delle cellule di *Escherichia coli* da parte del fago T4.

Negli anni, si arrivò quindi a definire la struttura del fago T4 dell’*Escherichia coli*. Esaminarla ci permette non solo di conoscere meglio questa specie, ma di avere anche un modello di riferimento durante lo studio delle altre famiglie virali di batteriofagi, osservandone analogie e differenze.

Il T4 dell’*Escherichia coli* possiede una testa, alla quale si aggancia un collaretto che si continua in una coda, la quale è circondata da una guaina contrattile e termina con una piastra basale, dotata di fibre lunghe e corte. Di seguito, una descrizione di suddette parti.



### 2.2.1 La testa

T4 ha una testa prolata, ovvero un aspetto allungato. Nello specifico, essa mostra una sezione centrale cilindrica e possiede due estremità icosaedriche, formate da vertici pentamerici. La testa si costituisce di un capsido, ossia un rivestimento, composto principalmente da tre proteine: gp23\* (gene product 23), gp24\* (gene product 24) e gp20 (gene product 20). Quella più espressa è la gp23, di forma esamerica; in particolare, in T4 se ne contano 155 <sup>[7]</sup>. La gp24\*, invece, è di forma pentamerica ed ha un 21% della struttura in comune con gp23\* <sup>[8]</sup>; la gp24\* è presente su undici dei dodici vertici del capsido. La gp20, infine, è di forma dodecamerica, presenta un canale centrale <sup>[9]</sup>, e occupa il dodicesimo vertice del capsido. Sia questo vertice che la gp20 vengono aggettivati come “portali”, in riferimento alla loro importanza per l’assemblaggio del capsido ed il conferimento al suo interno del genoma <sup>[10]</sup>. Sulla superficie esterna del capsido sono collocate altre due proteine: Hoc e Soc. La Hoc, ovvero la *highly antigenic outer capsid protein* (proteina esterna del capsido altamente antigenica), ha un aspetto allungato e fa procidenza sulla superficie del capsido, attaccandosi alla porzione centrale della gp23\*. Si tratta di una proteina funzionale, non strutturale: la sua conformazione immunoglobulino-simile conferisce infatti al batteriofago la possibilità di aderire meglio alle cellule batteriche <sup>[11]</sup>. La Soc, ovvero la *small outer capsid protein* (piccola proteina esterna del capsido), ha anch’essa un aspetto allungato, ma si dispone tra le gp23\* a formare un reticolo sulla superficie del capsido; in tal maniera, la Soc stabilizza la testa del batteriofago, assumendo pertanto un ruolo strutturale <sup>[12]</sup>. Per una migliore comprensione della struttura del capsido, si consulti la figura 1.

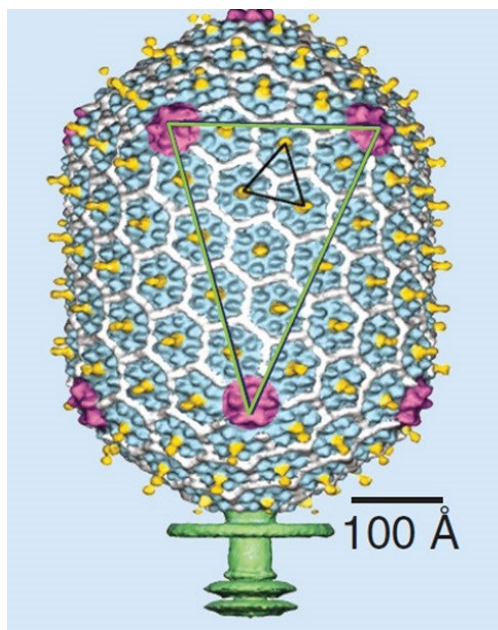


Figura 1 - Struttura della testa del batteriofago T. In azzurro la gp23\*, in magenta la gp24\*, in giallo la Hoc ed in grigio la Soc <sup>[12]</sup>

All'interno del capsid è contenuto il genoma del fago. Si tratta un double-stranded DNA (dsDNA, DNA a doppio filamento) concatemerico, formato da 172 coppie di basi <sup>[7]</sup>. Il termine concatemerico si riferisce al fatto che il DNA in questione è composto da tante copie seriali della stessa sequenza nucleotidica.

La formazione della testa del batteriofago avviene per fasi e si realizza all'interno del batterio ospite. Inizialmente si forma una *protesta*, ovvero un complesso proteico dato da un *core* (parte centrale) ed un guscio esterno, quest'ultimo costituito dalle succitate gp23 e gp24. Successivamente si realizza una proteolisi di alcuni componenti della struttura; anche la gp23 e la gp24 subiscono un clivaggio ed è per questo che, nel capsid definitivo, vengono denominate, rispettivamente, gp23\* e gp24\* (l'asterisco indica la forma proteica post rimaneggiamento). A questo punto si realizza il packaging del DNA virale: i precisi meccanismi non sono ancora noti, ma di certo il materiale genetico del fago viene organizzato in strati ed inserito nel

capside, finora vuoto, ad opera di una struttura ATP-dipendente che ve lo inietta, passando attraverso quello che sarà, successivamente, il punto di attacco per la coda, ossia il vertice pentamerico. Il processo richiede fini meccanismi regolatori di inizio e di fine. Contestualmente al packaging del DNA, si realizza l'espansione del capsido, ossia un riarrangiamento strutturale che provoca un aumento di circa il 50% del suo volume iniziale. A latere dell'espansione, infine, si vengono a creare i siti di attacco per Hoc e Soc, che quindi si agganciano al capsido, determinandone l'aspetto definitivo.

La testa del fago risulta completa solo quando vi si agganciano, a livello dell'apice portale, le proteine che costituiscono il collareto, ossia gp13, gp14, gp2 e gp4. A questo punto, la testa è pronta per allacciare la coda. <sup>[12]</sup>.

### 2.2.2 La coda

La coda, come anticipato, è costituita da una struttura centrale, di aspetto tubulare, avvolta da una guaina ed innestata su una piastra basale, alla quale si agganciano fibre lunghe e corte. Il lungo tubo centrale si compone di 138 copie della proteina gp19 ed è rivestito da 138 proteine gp18, le quali si dispongono a formare una grossa elica destrorsa che avvolge, appunto, la struttura tubulare centrale. Sia il tubo che la sua guaina si innestano al centro della piastra basale, un polimero esagonale cupoliforme di sei subunità, composta ciascuna dalle proteine gp11, gp10, gp7, gp8, gp6, gp53 e gp25 (Figura 2). All'estremità terminale della coda, ossia quella opposta alla piastra basale, si dispongono a questo punto le proteine gp3 e gp15, dette *terminatori di coda*. <sup>[12]</sup>.

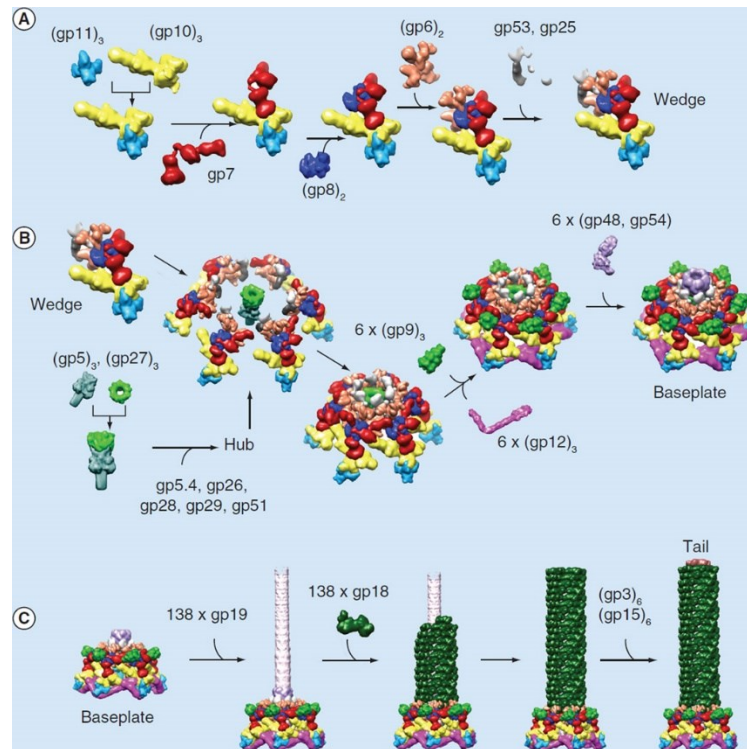


Figura 2 - Assemblaggio della coda fagica <sup>[12]</sup>

Al di sotto della piastra basale, si assemblano sei fibre corte della coda (STF, *short tail fibers*) e sei fibre lunghe della coda (LTF, *long tail fibers*). Sia le STF che le LTF sono filamenti proteici: le prime sono costituite dalla gp12, mentre le LTF da gp34, gp 35, gp36 e gp37. Le STF si ripiegano al di sotto della placca basale e verranno distese solo nel momento in cui il fago dovrà aderire saldamente al suo ospite batterico, incrementando per la particella virale la possibilità di infettarlo. Le LTF, invece, rimangono distese e servono a riconoscere l'ospite come tale e, pertanto, sono quelle che promuovono l'inizio del contatto fago-batterio e che determinano la selettività di suddetto legame. Come anticipato, infatti, non tutti i fagi possono aderire a tutti i batteri. In figura 3, l'immagine completa del batteriofago T4.

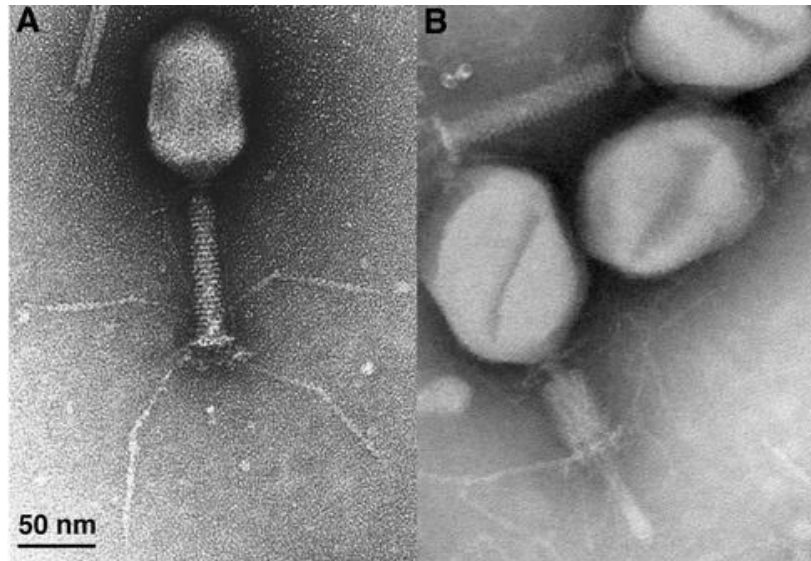


Figura 3 - Scansione al microscopio elettronico di un batteriofago T4 <sup>[13]</sup>

### 2.2.3 Il dispositivo di penetrazione cellulare

Decisamente rilevante per infettare la cellula ospite è il dispositivo di penetrazione cellulare. Esso è collocato all'estremità distale del tubo della coda, è protetto dalla piastra basale – che lo circonda – ed è dato dall'unione di gp5, gp27 e gp5.4 <sup>[12]</sup>. Tale complesso proteico è in grado di penetrare la parete batterica e disgregare il peptidoglicano<sup>1</sup>, aprendo così la strada alla successiva fase di iniezione del genoma fagico all'interno dell'ospite <sup>[14]</sup>.

---

<sup>1</sup> Il peptidoglicano è un polimero costituito, come indica il nome stesso, da una componente polisaccaridica ed una amminoacidica e si inserisce nello spazio intermembrana della parete batterica (parete esterna e parete interna), immerso nel periplasma.

## 2.3 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo del batteriofago è un complesso meccanismo che può essere semplificato in quattro fasi: adsorbimento, replicazione, maturazione e rilascio. In base alla tipologia di batteriofago, questi eventi presentano delle differenze. Nel precedente paragrafo, infatti, è stata descritta la morfologia del solo fago T4, ma è bene sapere che esistono altre tipologie di fagi (a RNA piuttosto che a DNA, con o senza coda, con o senza envelope) e che queste presenteranno, in base alla loro struttura, differenze funzionali. Per semplificare, nella presente tesi si continuerà a prendere come modello il solo fago T4.

### 2.3.1 Adsorbimento

La fase di adsorbimento prevede il legame del fago al batterio ospite. Come anticipato, si tratta di un legame altamente specifico; pertanto, non tutti i fagi sono in grado di adsorbirsi a tutti i batteri. Nel caso di T4, il sito di adsorbimento fagico è collocato a livello delle fibre lunghe della coda <sup>[12]</sup>, le quali si legano a recettori somatici<sup>2</sup> presenti sulla parete batterica. A causa della specificità del legame, è chiaro che anche piccole mutazioni che dovessero occorrere a carico dei siti recettoriali batterici porterebbero ad una resistenza all'infezione fagica <sup>[15]</sup>. Le fibre corte della coda, invece, si dispiegano una volta avvenuto il riconoscimento dell'ospite e lo legano saldamente, facilitandone l'infezione <sup>[12]</sup>.

---

<sup>2</sup> Tali recettori somatici vengono anche detti *recettori del primo tipo*, per distinguerli da quelli del *secondo tipo*. I recettori del primo tipo sono quelli utilizzati dal batteriofago T4, ma anche dagli altri fagi con coda e quelli senza coda a DNA. I recettori del secondo tipo, invece, sono delle vere e proprie appendici batteriche e vengono utilizzati dai piccoli fagi a RNA e dai fagi filamentosi (Poli, 2017).

Durante l'adsorbimento, la piastra basale del fago cambia la sua conformazione e assume un aspetto stellato, abbandonando quello cupoliforme. La guaina che riveste la coda si contrae, producendo una rotazione della testa sull'asse lungo del fago, con l'esito di spingere la punta della coda verso il basso: in questo modo, il dispositivo di penetrazione cellulare contatta la parete batterica e vi si inserisce <sup>[12]</sup>. Successivamente, l'estremità terminale della coda si apre ed il genoma fagico viene inoculato nell'ospite <sup>[15]</sup>.

### 2.3.2 Replicazione

La replicazione di un fago avviene, fondamentalmente, tramite le stesse tappe di quella di un qualsiasi altro virus e dipende dal tipo di genoma che possiede (DNA o RNA). T4 è in grado di sintetizzare una serie di proteine che vanno sotto il nome di replisoma e che sono responsabili della replicazione genomica <sup>[16]</sup>. Ciascun filamento di DNA, infatti T4 ha un dsDNA, agirà pertanto da guida per la sintesi del filamento complementare ad opera della DNA polimerasi<sup>3</sup>.

Per consentire la replicazione del loro genoma, alcuni fagi producono delle nucleasi che scindono il DNA batterico, producendo così frammenti utili alla sintesi del genoma virale. Tuttavia, in questa maniera interferiscono imponentemente con la funzionalità batterica, tanto da determinare, in alcuni casi, persino la morte dell'ospite <sup>[15]</sup>.

---

<sup>3</sup> Si ricorda che la DNA polimerasi è un enzima facente parte del complesso della replicasi.

### 2.3.3 Maturazione

La fase di maturazione fagica all'interno dell'*Escherichia coli* inizia con l'assemblaggio della testa, evento che si realizza a ridosso della superficie citoplasmatica della membrana interna del batterio. Dall'interazione tra la gp20 e una proteina di membrana batterica, si forma un anello dodecamerico che sarà la base per la successiva costituzione di una struttura proteica, il core, che funge da impalcatura per dirigere il corretto assemblaggio della testa prolata <sup>[17]</sup>. Contemporaneamente alla formazione del *core*, le proteine gp23\* e gp24\* si assemblano attorno ad esso, portando alla formazione della protetta. Successivamente, il guscio del capsido si espande, come già descritto. In questo momento, il DNA viene iniettato ed impacchettato all'interno capsido, grazie alle interazioni con la proteina portale gp20. Una volta completato il confezionamento della testa, il collo si assembla, consentendo l'aggiunta della coda e delle fibre della coda <sup>[18]</sup>, le quali vengono assemblate nella maniera descritta nei precedenti paragrafi.

### 2.3.4 Rilascio

Alla fine del ciclo vegetativo, il fago porta la cellula ospite alla lisi cellulare. La fuga della progenie del batteriofago dall'ospite è però contrastata da una barriera, il peptidoglicano. Per lisare l'ospite, i batteriofagi con dsDNA, come il T4, utilizzano un sistema di azione chiamato "sistema ad olina-endolisina". Si tratta di due enzimi: il primo, l'olina, serve ad attivare il secondo, l'endolisina, che disgrega il peptidoglicano, consentendo il danneggiamento della parete batterica necessario alla fuoriuscita dell'agente virale. T4, rispetto ad altri fagi che utilizzano questo stesso sistema, ha la straordinaria capacità di ritardare, per un periodo che va dai 25 minuti fino



ad alcune ore, l'inizio della lisi: il fenomeno è noto come *inibizione della lisi* (LIN, *lysis-inhibition*). Tale strategia consente al virus di incrementare le probabilità di infettare nuovi batteri: infatti, se tutte le cellule ospiti nelle vicinanze di T4 sono state già occupate, non è conveniente per il fago rilasciare la sua progenie nell'ambiente esterno. Oltre a questo, il ritardare la lisi batterica consente a T4 di incrementare di dieci volte la potenza del suo rilascio, facilitando così l'incontro con nuove cellule ospiti <sup>[19]</sup>. Ancora in aggiunta alle sue peculiarità, si è notato come T4 abbia persino la capacità di settare, tramite l'olina, la LIN in relazione a segnali ambientali che indichino la presenza o meno di ospiti consoni <sup>[20]</sup>.

### **3. Principali agenti infettivi negli allevamenti e meccanismi di antibiotico-resistenza**

All'interno degli allevamenti animali circolano inevitabilmente agenti patogeni capaci di causare problemi sanitari, anche gravi, non solo per gli animali stessi, ma anche per il consumatore degli alimenti che derivano dalle loro produzioni. Tutto questo senza considerare il danno economico che ne scaturisce per l'allevatore: si considerino, infatti, sia il costo delle terapie necessarie che il mancato ricavo dovuto all'impossibilità di vendere la carne, il latte o le uova ottenuti. In un contesto del genere, soprattutto in vista dell'aumento della richiesta di suddetti prodotti, è stato inevitabile l'utilizzo marcato di terapie antibiotiche in caso di patologie dovute ad agenti batterici. Come anticipato nell'introduzione della presente tesi, un utilizzo imponente di antibiotici ha spinto il fenomeno dell'antibiotico-resistenza, ostacolando pertanto l'approccio terapeutico al soggetto infetto, sia animale che uomo, il che rappresenta un problema dall'enorme portata e per il quale si stanno cercando soluzioni che prevedano l'utilizzo di sostituti degli antibiotici. Nei seguenti paragrafi verranno proposti alcuni dei principali agenti infettivi che si riscontrano negli allevamenti di animali destinati alla produzione di alimenti, unitamente ad una descrizione dei fenomeni di antibiotico-resistenza loro connessi.

#### **3.1 *Salmonella* spp.**

Quello di *Salmonella* è un genere la cui tassonomia è abbastanza complessa e continuamente oggetto di modifiche. Attualmente, il genere è diviso in due gruppi: quello delle Salmonelle responsabili di enteriti e quello delle

Salmonelle del gruppo tifo-paratifo. All'interno del primo gruppo si ritrova la *Salmonella enterica subspecie enterica*, che riconosce sotto di sé numerosi sierotipi (o “serovarianti”) diversi in relazione alle caratteristiche dei loro fattori antigenici flagellari (detti “H”), capsulari (detti “K”) e somatici (detti “O”) <sup>[21]</sup> (figura 3). Tra i sierotipi più conosciuti si annoverano il Typhimurium, l'Enteritidis, l'Agona, l'Infantis ed il Newport.

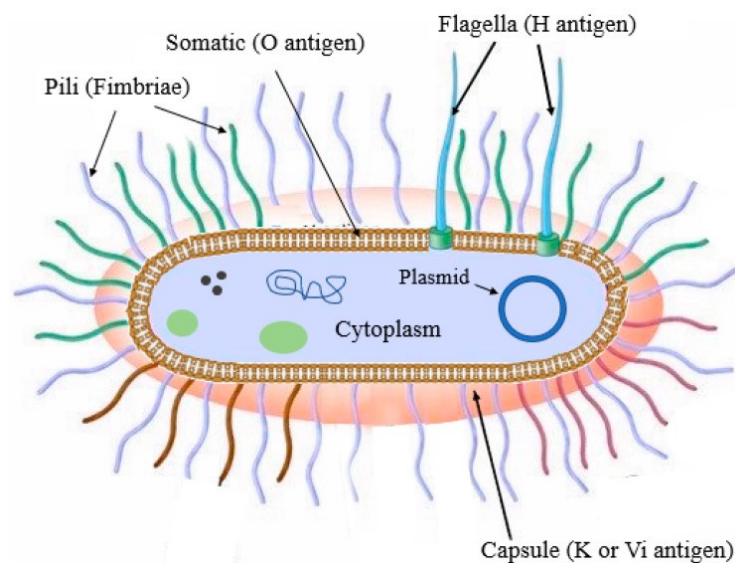


Figura 4 Illustrazione schematica della struttura della Salmonella <sup>[28]</sup>

Si tratta di un batterio Gram-negativo, bastoncellare, asporigeno, per lo più mobile e con un metabolismo aerobio-anaerobio facoltativo. Ha una distribuzione ubiquitaria nell'ambiente e può infettare, tramite processo tossinfettivo, numerose specie animali, tra esse si sottolineano tacchino, pollo, suino, bovino e uomo. La via di trasmissione tra gli animali è spesso orofecale ed ascrivibile alla stretta condivisione degli spazi contaminati da feci infette. Una volta realizzata l'infezione, il batterio si localizza nell'apparato digerente e per questo è responsabile di quadri gastroenterici, anche gravi, con importante diarrea. Fatto degno di nota è che la *Salmonella* possa essere eliminata con le feci anche per mesi post guarigione clinica, a

rendere difficile una gestione degli spazi in un allevamento, soprattutto quando intensivo, e a favorire la persistenza del germe nel gruppo.

Secondo l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), nell'uomo le infezioni da *Salmonelle* responsabili di enteriti rappresentano oltre il 50% del totale delle infezioni gastrointestinali e sono una delle cause più frequenti di tossinfezioni alimentari nel mondo industrializzato [22]. La trasmissione all'uomo può avvenire tramite l'assunzione di alimenti contaminati. In particolare, sono da considerarsi alimenti a rischio: uova, latte crudo, carne e derivati, salse, creme, frutta e verdura. I sintomi variano dai semplici disturbi del tratto gastrointestinale (febbre, dolore addominale, nausea, vomito e diarrea) fino a forme più gravi che includono batteriemie, soprattutto in soggetti fragili. Di solito la malattia non richiede l'ospedalizzazione, ma l'infezione può aggravarsi al punto tale da renderla necessaria [22].

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato 153 milioni di infezioni da *Salmonella* non tifoidea (NTS) in tutto il mondo nel 2010, di cui 56.969 sono state letali e quasi la metà sono state trasmesse da alimenti [23]. Nel 2019 sono stati segnalati in totale 926 focolai di salmonellosi di origine alimentare in 23 paesi europei, con conseguenti 9169 casi, 1915 ricoveri ospedalieri e 7 decessi. Una grande percentuale (72,4%) dei focolai di salmonellosi di origine alimentare era stata causata da *Salmonella enterica* [24].

### 3.1.1 Terapia e antibiotico-resistenza

L'approccio terapeutico classico per l'infezione da *Salmonella* prevede l'utilizzo di antibiotici, tra questi in particolare si ricordano il trimetoprim-

sulfamidico, i fenicoli, l'ampicillina, i fluorochinoloni e le cefalosporine di terza e quarta generazione. Un uso importante di queste molecole ha fatto sì, negli anni, che il batterio sviluppasse meccanismi di difesa contro le stesse, risultando man mano sempre meno sensibile. Già dagli anni '60 del secolo scorso, la questione delle salmonelle con antibiotico-resistenza (anti-microbial resistance, AMR) ha suscitato preoccupazione nella comunità scientifica, fu riscontrato, infatti, un drastico calo della suscettibilità del batterio nei confronti di molecole rilevanti quali le cefalosporine di terza generazione ed i fluorochinoloni. Nel periodo che va dal 2016 al 2020, in Italia, è stata osservata una prevalenza del 35% di Salmonelle multi-resistenti (Multi-drug resistant, MDR) [25], il che è estremamente preoccupante perché significa che non solo un'elevata percentuale di salmonelle ha sviluppato antibiotico-resistenza, ma possiedono questa caratteristica contro diverse classi di molecole, restringendo così la categoria di molecole efficaci per debellare un'eventuale infezione. I meccanismi di difesa sviluppati da *Salmonella* sono vari e preoccupanti. Secondo quanto riportato dall'Istituto Superiore di Sanità: “La resistenza della *Salmonella* ad ampicillina, sulfamidici e tetracicline è risultata alta (>20%) e molto alta (in Italia si tratta del 68-72% degli isolati resistenti), mentre la resistenza alle cefalosporine di terza generazione è risultata bassa (<10%). In Italia questa resistenza era <2% negli isolati umani e <5% negli isolati animali” [26]. Per quanto riguarda la differenza di resistenza tra animali e uomo, è stato affermato quanto segue: “Riguardo alla frequenza degli isolati multiresistenti, il 38-43% da suini e il 33-38% da polli (animali vivi e carcasse al macello) degli isolati è risultato resistente a tre o più classi di antibiotici, nelle altre specie le percentuali erano inferiori. Tra gli isolati di origine umana, il 25% è risultato multiresistente, con picchi del 74% negli isolati di variante monofasica della *S. Typhimurium*” [26]. Le salmonelle utilizzano vari

meccanismi di resistenza per combattere gli antimicrobici. Un primo meccanismo è rappresentato da una loro inattivazione ed è uno dei più comuni mezzi per raggiungere l'obiettivo. In pratica, il batterio riesce ad idrolizzare la molecola antibiotica, annientandone l'efficacia. Questo meccanismo è attivo contro aminoglicosidi, cloramfenicolo e  $\beta$ -lattamici. I  $\beta$ -lattamici, ad esempio, hanno azione battericida in quanto impediscono la sintesi del peptidoglicano. Per farlo si legano ad un enzima, il *penicillin binding protein* (PBP), necessario per la sintesi della parete cellulare: se questo viene inibito, la parete non viene sintetizzata ed il batterio viene a morte. Se quest'ultimo, però, è in grado di produrre enzimi, quali le  $\beta$ -lattamasi, che contrastino il legame PBP-antibiotico, si protegge dall'azione della molecola. Proprio per risultare nuovamente efficaci, i  $\beta$ -lattamici vengono oggi coniugati con degli inibitori delle  $\beta$ -lattamasi. Un altro meccanismo di resistenza, sviluppato dalle salmonelle, consiste nella sovraespressione di pompe di efflusso poste sulla membrana cellulare. Tali pompe sono dei complessi proteici normalmente presenti nelle salmonelle e che attraversano tutto lo spessore della parete cellulare, con la funzione di convogliare all'esterno molecole tossiche per il batterio. La pressione selettiva esercitata da un utilizzo importante di antibiotici, ha fatto sì che si selezionassero salmonelle con una sovraespressione genica di questi complessi proteici, che pompano all'esterno le molecole di antibiotico [27]. Grazie al rafforzarsi di questi meccanismi di resistenza, si è notato un aumento delle salmonelle MDR e con esse anche la gravità delle infezioni batteriche nell'uomo e negli animali. Secondo uno studio epidemiologico [28], e come è facile immaginarsi, i ceppi di *Salmonella* MDR generano infezioni più gravi o fatali rispetto ai ceppi non MDR; pertanto, è fondamentale scovare nuove azioni terapeutiche nei confronti di questo agente infettivo.

### 3.2 *Campylobacter* spp.

Il *Campylobacter* è un batterio Gram-negativo pleomorfo, asporigeno e mobile, grazie al flagello di cui è dotato (figura 4). Le sue specie sono ubiquitarie nell'ambiente: alcune sono commensali nel tratto digerente dell'animale, altre si localizzano a livello dei genitali o sono saprofiti ambientali. *Campylobacter* ha un'ampia gamma di serbatoi animali ed è prevalentemente presente nei ruminanti, nei suini e nel pollame.

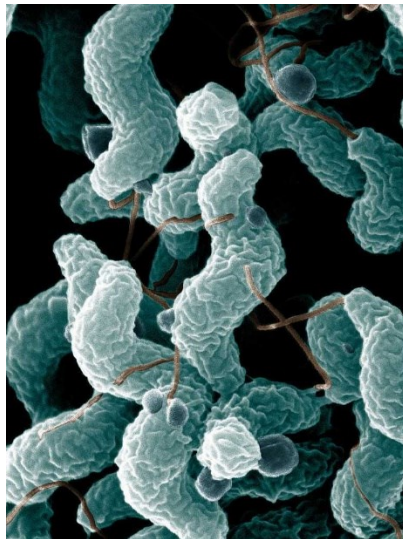


Figura 4 - Scansione al microscopio elettronico del *Campylobacter* [29]

Il genere racchiude numerose specie, molte delle quali agenti di diarrea nell'animale e nell'uomo, le più rilevanti sono di certo *jejuni*, *coli* e *lari*. Tra l'altro, il *Campylobacter* è riconosciuto come una delle cause più comuni di gastroenterite batterica umana. Il consumatore può contrarre la campilobatteriosi assumendo acqua o latte contaminati, alimenti crudi, come carne e frattaglie di maiale o ruminanti e, occasionalmente, carne di pollo. I sintomi sono solitamente leggeri o moderati, tra quelli più frequenti si evidenziano diarrea, dolori addominali, febbre, mal di testa, nausea e vomito.

Di solito la loro durata varia da uno a sette giorni. Manifestazioni più gravi della malattia si verificano in meno dell'1% dei pazienti, solitamente in soggetti molto anziani o molto giovani, e includono meningiti, endocarditi e aborti settici. Il tasso di mortalità è basso, ma, per i pazienti più vulnerabili (bambini, anziani, donne gravide e immuno-compromessi), le conseguenze della malattia possono essere molto gravi e possono richiedere trattamenti antibiotici [30].

L'incidenza stimata di gastroenterite dovuta a *Campylobacter* nei Paesi ad alto reddito tra i consumatori è compresa tra 4,4 e 9,3 ogni 1.000 persone [31]. Queste infezioni sono responsabili di circa l'8,4% dei casi di diarrea a livello globale [32].

### 3.2.1 Terapia e antibiotico-resistenza

In quanto patogeno circolante negli allevamenti, il *Campylobacter* è stato costantemente esposto agli antimicrobici somministrati a scopo di limitare la presenza del batterio negli animali. La conseguenza è stata la comparsa di specie resistenti ai trattamenti tradizionali. Questo fatto è stato evidenziato da numerosi studi effettuati negli scorsi anni sugli animali da allevamento nei Paesi sviluppati. Nel contrastare la pressione operata dall'antibiotico, il *Campylobacter* ha sviluppato vari meccanismi di resistenza: alcuni sono efficaci contro una classe specifica di antimicrobici, altri a più classi. Nel tempo, si è rilevata la prevalenza di ceppi di *Campylobacter* resistenti ai fluorochinoloni, una famiglia di agenti antibatterici sintetici ad ampio spettro attivi contro organismi Gram-positivi e Gram-negativi. Molecole esponenti di questo gruppo sono, ad esempio, ciprofloxacina ed enrofloxacina. I fluorochinoloni prendono di mira due enzimi essenziali, la DNA girasi (detta



anche topoisomerasi II) e la topoisomerasi IV, compromettendo la duplicazione del DNA batterico. Mutazioni nei geni che codificano le subunità della DNA girasi, della topoisomerasi IV o di entrambe sono responsabili della resistenza dei batteri ai fluorochinoloni. In *Campylobacter*, il principale meccanismo di resistenza ai fluorochinoloni è mediato da mutazioni puntiformi nella subunità “GyrA” della DNA girasi [33]. Sono stati riscontrati *Campylobacter* resistenti alla ciprofloxacina in carcasse di pollo vendute al dettaglio negli Stati Uniti, con numeri che vanno dal 57% già nel 2001 al 96% nel 2003 [34].

Un altro tipo di antibiotico-resistenza viene osservata con la somministrazione di macrolidi. Gli antibiotici di questa classe, tra cui eritromicina e tilosina, prendono di mira il ribosoma batterico, inibendo così la sintesi proteica. La resistenza ai macrolidi è mediata da tre meccanismi: inattivazione enzimatica, mutazioni puntiformi del bersaglio e aumento dell'efflusso del farmaco [35]. È importante notare che sono stati rilevati diversi nuovi meccanismi di MDR nel *Campylobacter*, il che aumenta notevolmente la sua pericolosità. Proprio per questo, sono necessarie strategie innovative per frenare l'ascesa e la diffusione del *Campylobacter*. [36].

### 3.3 *Staphylococcus aureus*

Lo *Staphylococcus aureus* è un batterio Gram-positivo, appartenente alla famiglia *Staphylococcaceae*, ha forma sferica con circa 1 µm di diametro e si raggruppa, nella colonia, a formare grappoli (figura 4). È un

microrganismo non sporigeno, non mobile, formante cluster e anaerobio-facoltativo che cresce in un'ampia gamma di temperature e pH.

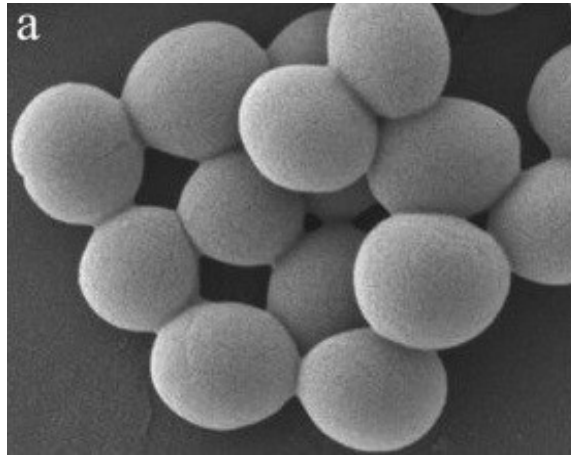


Figura 4 - Scansione al microscopio elettronico dello *Staphylococcus aureus* [37]

*Staphylococcus aureus* è conosciuto per essere una delle principali cause di infezioni contratte in ospedale e in comunità, con gravi conseguenze. Può colonizzare la pelle, le basse vie respiratorie e può causare alcune gravi infezioni come l'endocardite e l'osteomielite [38]. Questo microrganismo può causare anche intossicazioni alimentari attraverso la produzione di enterotossine [39], determinano insorgenza di vomito con o senza diarrea e, talora, sindrome da shock tossico [40]. Gli esseri umani sono comuni portatori asintomatici di *S. aureus* nel naso, nella gola, sulla cute e nei suoi annessi. Pertanto, gli addetti alla manipolazione degli alimenti possono rappresentare una fonte importante di contaminazione alimentare. La capacità di formare biofilm, inoltre, consente allo stafilococco di sopravvivere in ambienti ostili come le superfici dell'industria alimentare.

*S. aureus* è inoltre associato a importanti patologie in medicina veterinaria, come la mastite nei ruminanti, la dermatite esfoliativa nei suini e il complesso dermatite/artrite edematosa nel pollame [41]. Per questo motivo, negli allevamenti è sempre più richiesto l'utilizzo di antibiotici per evitare

perdite economiche, ma questo inevitabilmente ha portato allo sviluppo di specie resistenti. Ovviamente, come già esposto nel presente lavoro di tesi, le resistenze si ripercuotono anche nei trattamenti agli esseri umani.

### 3.3.1 Terapia e antibiotico-resistenza

Lo *Staphylococcus aureus* presenta una serie di fattori di virulenza e la capacità di acquisire resistenza alla maggior parte degli antibiotici rientra tra questi. Una delle più conosciute resistenze in medicina è proprio quella dello stafilococco nei confronti della meticillina, un antibiotico  $\beta$ -lattamico. Il fenomeno è noto come MRSA, ovvero *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente. La colonizzazione e l'infezione da MRSA sono state segnalate non solo negli esseri umani, ma anche in numerosi animali, compreso il bestiame d'allevamento. La meticillina è stata introdotta all'uso clinico nel 1959 come prima penicillina semisintetica resistente alle  $\beta$ -lattamasi (descritte in precedenza). Entro un anno dalla sua introduzione, è emerso l'MRSA dovuto all'incorporazione del gene *mecA* nel genoma batterico<sup>[42]</sup>. Si tratta di una resistenza ad ampio spettro, con la capacità di contrastare l'intera classe di farmaci  $\beta$ -lattamici, ad eccezione di ceftarolina e ceftobiprololo<sup>[43]</sup>.

Sebbene il contatto con gli animali sembri essere il fattore di rischio più importante, anche i prodotti e i preparati a base di carne possono rappresentare una fonte di infezione. Nel 2010 uno studio olandese ha mostrato che il 35% di 40 allevamenti di polli da carne era positivo a MRSA. Quasi l'8% dei singoli polli da carne era positivo a MRSA all'arrivo al macello, ma, durante il giorno, questa percentuale è aumentata al 35%, a causa della contaminazione da parte degli addetti alla macellazione. Il 20% dei dipendenti coinvolti nell'appendere gli animali sulla linea di

macellazione era risultato positivo a MRSA, rispetto all'1,9% di altro personale a contatto con i polli da carne e allo 0,1% della popolazione generale <sup>[44]</sup>. A fronte di questi risultati, non sorprende che la carne sia facilmente contaminata da stafilococco/MRSA <sup>[45]</sup>.

## 4. Ruolo dei batteriofagi come sostituti degli antibiotici

Alla luce degli elementi esposti in merito ad alcuni dei principali agenti patogeni negli allevamenti, e compreso come la problematica dell'antibiotico-resistenza si rifletta sul consumatore a partire da diversi fronti, è chiaro come sia necessario ed urgente valutare tecniche alternative rispetto all'antibioticoterapia. Un'alternativa, per essere valida, deve essere sicura ed efficace. Negli ultimi anni diversi metodi sostitutivi sono stati oggetto di studio da parte della comunità scientifica, tra questi si ricordano: le proteine antimicrobiche, le batteriocine, i composti antimicrobici derivati dalle piante, i probiotici, i prebiotici ed infine i batteriofagi. Il presente lavoro tesi si è voluto concentrare su quest'ultima opzione, ritenuta particolarmente interessante a causa dei meccanismi che sottostanno al loro utilizzo.

I batteriofagi che di solito vengono selezionati per effettuare la terapia fagica sono quelli più virulenti per l'ospite, ovvero quelli che ne determinano la morte. Si tratta dei fagi a ciclo litico (o "virulenti"). Wessels et al. <sup>[46]</sup>, li definiscono nel seguente modo: "I fagi virulenti (noti anche come strettamente litici) sono fagi che non possono incorporare il loro materiale genetico nel cromosoma batterico, ciò significa che dopo l'infezione, i fagi virulenti inizieranno sempre la replicazione all'interno dell'ospite, creando una progenie, con la conseguente lisi (morte cellulare) della cellula batterica". L'uso di questo tipo di fagi permette di avere un'azione rapida e mirata, senza interferire con il DNA del soggetto da trattare <sup>[47]</sup>. Per aumentare l'efficienza della terapia fagica, spesso i batteriofagi vengono addizionati gli uni agli altri, andando a costituire un vero e proprio cocktail, in modo da sfruttare la selettività batterica di ciascuno <sup>[48]</sup>. Si ricordi, infatti, che ciascun fago compie legami altamente specifici con l'ospite.

Prima di entrare nel dettaglio della terapia fagica, è opportuno specificare che la maggior parte dei fagi utilizzati sono *di campo*, ovvero direttamente isolati dall'ambiente e non geneticamente modificati <sup>[46]</sup>. Le soluzioni di fagi contengono un'alta concentrazione di acqua, non hanno effetti sulle proprietà nutritive e organolettiche degli alimenti e la capacità di ridurre i microrganismi rimane alta <sup>[49]</sup>.

#### 4.1 Batteriofagi e *Salmonella*

Come ricordato nel precedente capitolo, le Salmonelle responsabili di enteriti sono le più comuni tra quelle trasmesse nella catena alimentare, causando malattie nei consumatori. Nel 2022, nella sola Unione Europea, sono stati 65202 i casi di salmonellosi umana da malattia a trasmissione alimentare (MTA) <sup>[50]</sup>. Si tratta di batteri ubiquitari responsabili di tossinfezioni in numerose specie animali, dove la via di trasmissione è di solito oro-fecale. Uno studio effettuato da Wall SK et al. <sup>[51]</sup>, ha riscontrato la capacità di ridurre la colonizzazione e la diffusione della *Salmonella* nei suini attraverso la somministrazione di un cocktail di batteriofagi come additivo alimentare microincapsulato. La ricerca era divisa in un esperimento preliminare e un esperimento principale. L'esperimento preliminare prevedeva la selezione di sedici suinetti, tutti negativi per *Salmonella*. Ognuno di essi ha poi ricevuto, attraverso un sondino orale, una soluzione contenente *Salmonella enterica* e successivamente il cocktail di fagi microincapsulati (nel gruppo dei soggetti trattati) oppure una soluzione placebo (nel gruppo di controllo). Il microincapsulato fagico era stato precedentemente ottenuto tramite isolamento di fagi riscontrati in acque reflue in Indiana (USA, America). I suinetti sono stati quindi ospitati in un

recinto con a regime controllato ed ogni due ore, per tre volte, hanno continuato a ricevere il cocktail di fagi microincapsulati o la soluzione placebo. Ogni due ore venivano effettuati tamponi fecali. Terminato il trattamento, i suinetti sono stati sottoposti ad eutanasia e sono stati prelevati dei campioni per poter determinare la concentrazione di *Salmonella* post-trattamento. Nello specifico, l'esame colturale è stato effettuato su contenuto ileale e ciecale, raschiature tonsillari, linfonodi mesenterici e feci. L'esperimento principale, invece, prevedeva l'esecuzione di un triplicato: in ciascun trial, quattro suini (per un totale, quindi, di dodici) venivano infettati con *Salmonella* attraverso la via orale e poi collocati in recinti a regime controllato, uno per gruppo. Il management dei gruppi, stavolta, soprattutto in termini di pulizia dei recinti e di approvvigionamento di acqua e cibo, riproduceva quello di un allevamento (mentre nell'esperimento preliminare i suini erano stati privati delle mangiatoie e solo acqua era lasciata a disposizione, in una condizione igienica del ricovero migliore). In questo caso, i tamponi fecali di controllo sono stati effettuati ogni 24 ore. Dopo 48 ore dall'infezione, sedici maiali naïve (ancora non inclusi nello studio e negativi per salmonellosi) sono stati divisi in due gruppi da otto: un gruppo ha ricevuto la terapia fagica, l'altro una soluzione placebo (gruppo di controllo). Questi sedici maiali naïve sono stati quindi mescolati, parimenti, agli altri dodici già nei ricoveri. I suini trattati con il microincapsulato fagico hanno nuovamente ricevuto ogni due ore, per sei totali, la terapia, parimenti è accaduto per i capi che ricevevano il placebo. Ogni due ore venivano effettuati tamponi fecali. terminate tutte le somministrazioni, i soggetti sono stati abbattuti tramite utilizzo di pistola a proiettile captivo e sono stati collezionati campioni per la ricerca del batterio. Nello specifico, in questo caso sono stati prelevati il contenuto di ileo e cieco, linfonodi mesenterici e campioni fecali. I risultati dell'esperimento preliminare sono stati

decisamente soddisfacenti: negli animali trattati con il microincapsulato si è riscontrato il 99,0% in meno di carica batterica, rispetto al gruppo di controllo, a livello di ileo e, addirittura, cinque dei sei suini trattati non presentavano *Salmonella* rilevabile. Risultati simili quelli dei raschiati tonsillari e dei campioni ciecali: in entrambi i casi, la percentuale di riduzione è stata del 99,9 % e, di nuovo, in cinque suini non si è rilevato il batterio. Per quanto riguarda il tessuto linfonodale, invece, la metà dei soggetti che avevano ricevuto terapia fagica e due terzi di quelli di controllo sono risultati positivi. Nel caso dell'esperimento principale, si è constatato come tutti i recinti fossero costantemente contaminati da *Salmonella*, ma la terapia fagica è stata capace di ridurre significativamente la colonizzazione batterica a livello di cieco (95%) ed ileo (90%), mentre, anche in questo caso, i campioni linfonodali sono risultati positivi o negativi con percentuali simili a quelle dello studio preliminare <sup>[51]</sup>, Questo studio ha dimostrato come i fagi siano stati efficaci nella riduzione della *Salmonella* nei suini, ma anche che trattare preventivamente gli animali riduce efficacemente la diffusione del patogeno. Sebbene i fagi siano più efficienti in vitro, simulare le condizioni effettive dell'allevamento di questa specie, anche se a regime controllato, ha permesso di evidenziarne l'effettivo potenziale.

Un altro studio, effettuato da Clavijo et al. <sup>[52]</sup>, ha voluto testare, su un preesistente ed attivo allevamento commerciale di polli da carne, un cocktail di sei batteriofagi, denominato SalmoFREE<sup>®</sup>. Il piano di ricerca prevedeva l'esecuzione di due diverse prove nelle condizioni effettive dell'allevamento, in effetti le usuali pratiche di management non sono state variate e gli animali sono stati alimentati ed abbeverati *ad libitum*, come di consueto. L'allevamento era costituito da undici capannoni, tutti contenenti pulcini accasati nella stessa giornata, ma sono stati scelti in entrambe le prove i capannoni numero 4, 8, 9 e 10, nei quali era stata rilevata la presenza di



*Salmonella*. Gli animali dei primi due capannoni costituivano sempre il gruppo di controllo, mentre quelli degli ultimi due sempre quello dei trattati. I controlli ricevevano, tramite acqua di bevanda, una soluzione priva di batteri e fagi, mentre ai trattati veniva somministrata, alla stessa maniera, il SalmoFREE®. I polli sono stati trattati, sia nel primo che nel secondo trial, ad inizio, metà e fine ciclo produttivo. Durante la prima prova sono stati effettuati, il giorno precedente e quello successivo a ciascun trattamento, cinque tamponi cloacali randomici per capannone, mentre nella seconda ne sono stati effettuati dieci, con la stessa cadenza. Per ciascun capannone, inoltre, erano state casualmente selezionate cinque femmine da abbattere a fine trial, per effettuare una valutazione del loro cieco. Per valutare l'efficacia e l'impatto sui capi del cocktail fagico, non si è voluta identificare solo l'incidenza di *Salmonella* nei due gruppi, ma si sono voluti anche considerare e confrontare l'indice di conversione alimentare e il peso dei soggetti (parametri produttivi). Per quanto concerne la prima prova, è stata rilevata una riduzione nell'incidenza di *Salmonella* nei capannoni trattati rispetto a quelli che non avevano ricevuto il cocktail fagico, tuttavia, proprio nei capannoni 9 e 10 era stato effettuato dal veterinario aziendale un trattamento antibiotico (non previsto dal disegno di ricerca), in quanto si stavano registrando indici di mortalità giornaliera troppo elevati. Si tiene a specificare che il trattamento antibiotico è stato somministrato solo ai capannoni 9 e 10 poiché provenienti dallo stesso lotto di uova, nonostante solo il capannone 10 avesse mostrato problemi di mortalità anomala. Questo intervento ha chiaramente bissato lo studio, ma si può ritenere che, quantomeno, il SalmoFREE® abbia contribuito al successo terapeutico, insieme all'antibiotico. Tuttavia, osservando bene i dati dello studio, è possibile osservare come la prevalenza batterica nei capannoni 9 e 10 dopo tre giorni di antibiotico, e un giorno prima di iniziare la terapia fagica, fosse

maggiore che nei capannoni controllo. Questo dimostrerebbe, o farebbe perlomeno presupporre, che la terapia effettuata dal veterinario aziendale non potesse essere particolarmente efficace. In ogni caso, per sorpassare il vizio oramai realizzatosi, è stato necessario effettuare un secondo trial. In questa seconda prova si sono ottenuti risultati simili a quelli della prima, in merito alla prevalenza del batterio. Inizialmente, in tutti i capannoni l'incidenza di *Salmonella* era alta, per poi ridursi nel 9 e nel 10 a partire dal secondo trattamento fagico, fino ad arrivare ad uno 0% a fine ciclo. Nonostante il buon risultato, non è comunque possibile attribuire solo alla somministrazione del SalmoFREE® il successo del ciclo, in effetti anche i gruppi controllo hanno mostrato buoni risultati, pur non eguagliando i capannoni trattati. Per effettuare un'analisi più completa, sono state effettuate indagini di ricerca dei fagi di SalmoFREE®, tramite amplificazione con PCR (*polymerase chain reaction*, reazione a catena della polimerasi), all'interno dei ciechi delle galline selezionate. Nel primo trial, si sono riscontrate positività in entrambi i gruppi di animali, ma più che altro in quelle trattate. Nel secondo trial si sono rilevati dati similari. Infine, sono state testate alcune delle salmonelle isolate dai tamponi cloacali: un 77,4% delle stesse è risultato sensibile al cocktail fagico. Per quanto concerne l'indice di conversione alimentare (ICA), il peso e l'indice di mortalità giornaliera, si può dire che il SalmoFREE® non abbia inciso in maniera negativa, dimostrandosi pertanto un prodotto sicuro e potendo rappresentare una valida alternativa, o quantomeno un supporto, alla terapia antibiotica [52].

## 4.2 Batteriofagi e *Campylobacter*

Il *Campylobacter* è la causa più significativa MTA batterica nell'unione Europea, con 132107 casi confermati nel 2022 <sup>[50]</sup>. Il genere *Campylobacter* racchiude numerose specie, molte delle quali agenti di diarrea nell'animale e nell'uomo, ma circa il 95% di tutti i casi segnalati derivano da infezioni causate dal *Campylobacter* <sup>[2]</sup>. Il *Campylobacter* ha un'ampia gamma di serbatoi animali ed è altamente prevalente nei ruminanti, nei suini e nel pollame. Terapie volte a ridurre questo batterio negli allevamenti sono fondamentali. Ad esempio, un'elevata presenza di *Campylobacter* nel cieco dei polli da carne spesso contamina l'intera carcassa in fase di macellazione, rappresentando un problema igienico-sanitario enorme. Anche questo patogeno presenta dei meccanismi di antibiotico-resistenza, pertanto sarebbe importante trovare valide alternative alla classica antibioticoterapia. L'approccio fagico, in questo caso, vede un'applicazione piuttosto difficoltosa, in quanto vi sono problemi nell'isolamento dei fagi e nella produzione di soluzioni e cocktail che li contengano. Inoltre, si è dimostrata complicata la scelta tra i numerosi fagi disponibili contro il batterio <sup>[53]</sup>.

In base alle dimensioni del loro genoma e alla loro morfologia, i fagi litici del *Campylobacter* sono stati divisi in tre gruppi: il gruppo I contiene fagi con genomi grandi, mentre i membri dei gruppi II e III possiedono una struttura più ridotta. Alcuni tra quelli del II e III gruppo sono stati sequenziati, a differenza di quelli del gruppo I, che non sono stati né sequenziati né usati per qualche applicazione. Una capacità riconosciuta nei fagi del gruppo II è che riescono ad infettare sia *C. jejuni* che *C. coli*; i fagi del gruppo III, invece, riescono a lisare più ceppi di *C. jejuni*. rispetto al gruppo II <sup>[54]</sup>. Hammerl JA et al. <sup>[55]</sup>, hanno proposto uno studio che evidenziava le proprietà litiche dei fagi dei gruppi II e III, in un contesto di

riduzione di *C. jejuni* nei polli. Sono stati quindi selezionati un fago del gruppo I e due fagi del gruppo III, in entrambi i casi da campioni fecali prelevati in allevamenti siti in Germania, e poi sono stati creati quattro gruppi studio (A, B, C e D), rappresentati ciascuno da dieci polli, negativi per *Campylobacter*, poi infettati sperimentalmente. Al gruppo A non è stato somministrato nulla ed è stato destinato alla funzione di controllo. Il gruppo B ha ricevuto il trattamento col CP14, il gruppo C col CP14 ed il CP81, mentre il gruppo D ha ricevuto prima un trattamento con CP14 e, dopo un giorno, con CP68. Sono stati effettuati tamponi cloacali seriali e, a dopo 31 giorni di allevamento, sono stati abbattuti tutti i capi e campionato il loro contenuto ciecale. I risultati dell'isolamento del *Campylobacter* hanno mostrato una maggiore efficacia del trattamento sinergico con CP14 e CP68, un'efficacia di un terzo nel caso della sola somministrazione di CP14, mentre alcun effetto ha sortito il cocktail composto da CP14+CP81. Questo sembrerebbe indicare che sia più efficace un cocktail rispetto ad una terapia monofagica, ma allo stesso tempo che è necessario selezionare bene gli elementi che si associano, altrimenti non si ottiene affatto il risultato sperato [55]. Uno studio del 2020 [56] ha voluto provare la somministrazione di un cocktail di batteriofagi specifici per *Campylobacter* nel contesto di due allevamenti a carattere commerciale di broiler. Lo studio è stato svolto in Australia. Sono stati individuati dei fagi di campo attivi contro il *Campylobacter jejuni* e il *Campylobacter coli* circolanti nel Queensland (Australia) sud-orientale. Sono stati individuati due allevamenti, denominati A e B, che presentassero una popolazione di *Campylobacter* potenzialmente sensibile ai fagi selezionati. Per A sono stati selezionati quattro fagi, mentre per B solo due. Sia in A che in B sono stati costituiti due gruppi da 30 polli, uno dei quali destinato al controllo e l'altro al trattamento. La terapia fagica e il placebo sono stati somministrati esclusivamente a 47 giorni di età, ovvero

un giorno prima rispetto alla cattura dei polli e al termine del ciclo produttivo. Nella giornata seguente, dieci soggetti per gruppo sono stati macellati direttamente in allevamento, altri dieci sono stati soppressi subito dopo il trasporto (durato quattro ore), mentre il resto degli animali veniva macellato in apposito impianto esterno. Venivano quindi raccolti, per ciascun animale, sia una porzione di cieco che una di ileo, ma veniva anche allestito un colturale basato sulla contaminazione dell'intera carcassa. I risultati hanno mostrato come in A vi fosse una riduzione significativa della prevalenza di *Campylobacter*, tuttavia, in singoli casi si era riscontrata un'elevata conta di *Campylobacter* a fronte di una bassa conta del fago, a suggerire che questo non fosse riuscito a replicarsi in modo efficiente nell'intestino dell'animale durante il breve (inferiore alle 24 ore) periodo di trattamento. In B non è stata riscontrata una differenza importante tra il gruppo di controllo e quello che aveva ricevuto la terapia fagica, ma bisogna sottolineare come fosse stata rilevata una positività fagica nei controlli durante l'allevamento, nonostante inizialmente gli animali fossero negativi. In considerazione degli elementi appena descritti, si può affermare che le variabili che influenzano un corretto trattamento fagico per *Campylobacter*, così come per altre specie batteriche, possono essere molte; sicuramente una selezione capillare del fago è fondamentale per la sua efficacia, ecco perché la terapia antibiotica spesso ancora lo sostituisce. Tuttavia, la capacità di essere in grado di colpire specie patogene all'interno di un microbiota complesso, senza causare problemi al resto della flora residente, rappresenta un vantaggio importante per la terapia fagica, contribuendo al benessere dell'animale e alla qualità del prodotto alimentare che ne deriva <sup>[49]</sup>.

Tuttavia, per avere successo, i batteriofagi devono essere virulenti contro i batteri bersaglio e con la capacità di raggiungerli in quantità sufficiente da influenzare un cambiamento nella popolazione batterica dell'ospite. Anche il

tempo di esposizione è una considerazione fondamentale. I fagi devono avere abbastanza tempo per raggiungere una concentrazione che consentirà loro di accedere a tutti gli ambienti ricchi di ospiti all'interno dell'intestino così da uccidere i batteri bersaglio. Il periodo di trattamento per influenzare le riduzioni di *Campylobacter* nel maggior numero possibile di soggetti deve essere sicuramente aumentato rispetto alle 24 ore stabilite nello studio del 2020 appena descritto, poiché il fago potrebbe non avere il tempo sufficiente per raggiungere una diffusione sufficiente all'interno del digerente. Tuttavia, nella maggior parte degli animali trattati con fagi dell'allevamento A, nello studio di Chinivasagam et al. <sup>[56]</sup>, il fago si è replicato ed è stato efficace nel ridurre i numeri di *Campylobacter* nel cieco. Per capire il motivo per cui nell'allevamento B non ci siano stati risultati corrispondenti, basti probabilmente riflettere sulla differenza principale tra ciò che avviene in natura rispetto alle sperimentazioni in vitro o in regimi controllati. Gli animali allevati si infettano naturalmente con ceppi di *Campylobacter* o altri batteri che entrano in competizione tra loro e questo accresce la probabilità di insuccesso della terapia somministrata. In un'ottica del genere è chiaro che si fa forte la necessità di un elevato livello di specificità fago-batterio, in modo da efficientare quanto più possibile la terapia <sup>[56]</sup>.

### 4.3 Batteriofagi e *Staphylococcus aureus*

La MTA da tossina stafilococcica è la seconda più frequente in Unione Europea e la prima in termini di ospedalizzazione e morte, seguita dalla clostridiosi <sup>[50]</sup>. Anche in termini di allevamento animale, la prevalenza di infezione da stafilococco non è bassa. Come per altri batteri, l'uso intensivo di antibiotici in medicina umana e veterinaria ha portato allo sviluppo di una resistenza da parte di questo microrganismo. L'uso intensivo di meticillina ha dato vita allo *Staphylococcus aureus* meticillinoresistente (MRSA), nei confronti del quale si riscontra sempre più difficoltà di trattamento. Nel 2021, Tuomala et al. <sup>[57]</sup>, hanno proposto uno studio avente l'obiettivo di studiare l'efficacia del trattamento fagico nell'eradicazione di MRSA da suini portatori sani. Nella fase iniziale dello studio, un totale di 19 suinetti MRSA-positivi è stato diviso in un gruppo di prova (dieci animali) e un gruppo di controllo (nove soggetti). Questi sono poi stati sistemati in ambienti separati, ciascuno col proprio sistema di ventilazione. In ogni ambiente, i suini sono stati suddivisi in due recinti, a contatto costante. Per prevenire la contaminazione crociata, il gruppo di controllo è stato il primo a cui sono state rivolte le procedure dell'esperimento, a seguire il gruppo di prova. Un cocktail di tre fagi o una soluzione placebo venivano quindi somministrati a livello nasale o cutaneo, al giorno 28, 30 e 32 d'allevamento. Tamponi cutanei e nasali sono stati eseguiti a partire dal primo giorno di trattamento e in maniera seriale, fino all'ultimo giorno di vita dei soggetti (50esimo). Post terapia sono stati prelevati anche campioni per la ricerca di anticorpi anti-fago. La valutazione dei tamponi ha dimostrato come l'MRSA non abbia sofferto per la terapia fagica; infatti, non è stata riscontrata alcuna riduzione della colonizzazione batterica, pur non essendo stati riscontrati ceppi resistenti ai fagi utilizzati. La valutazione sierica, inoltre, non ha rilevato la

presenza di un'immunità umorale nei confronti dei fagi. Si è scoperto che i fagi utilizzati non riuscivano a sopravvivere per più di 24 ore post-applicazione, fatto che sicuramente avrà influito sull'esito negativo della sperimentazione. Gli autori hanno voluto ipotizzare anche che i fagi utilizzati non si sono replicati in maniera importante poiché la numerosità di cellule ospiti era troppo bassa, evento sfavorevole per il fago <sup>[57]</sup>. A proposito della concentrazione di batteri presenti negli animali è stato affermato che: "Il successo della terapia è influenzato positivamente se all'inizio della stessa, come nel caso di un'infezione acuta, è presente un gran numero di batteri, poiché un numero elevato di batteri favorisce la rapida moltiplicazione dei batteriofagi. Al contrario, se i fagi vengono utilizzati a scopi profilattici, o in caso di infezioni con una bassa conta batterica, possono essere rimossi in parte dal sistema immunitario dell'ospite." <sup>[58]</sup>. Gill et al., già nel 2006 <sup>[59]</sup>, presentavano uno studio sperimentale concentrato nel testare l'efficacia della terapia fagica in corso di mastiti bovine subcliniche stafilococciche, che rappresentano un problema ingente negli allevamenti da latte. "La mastite è una condizione che si manifesta come infiammazione del tessuto della ghiandola mammaria. Essa è considerata una delle principali fonti di perdite economiche potenzialmente evitabili nel settore lattiero-caseario <sup>[60]</sup>. Tra i batteri responsabili di questa infezione c'è lo *Staphylococcus aureus*. Gli antibiotici rappresentano ancora il principale trattamento utilizzato contro la mastite stafilococcica, tuttavia, la crescente resistenza e la capacità del batterio di sviluppare biofilm possono rendere inefficace la terapia. Lo studio è stato effettuato su bovine canadesi in lattazione. Le femmine incluse nello studio erano in lattazione da più di 30 giorni e tutte quelle che negli ultimi 30 giorni avevano ricevuto antibiotici sono state escluse. Infine, 24 esemplari sono stati selezionati per il test. Gli animali reclutati nello studio erano risultati positivi allo *Staphylococcus aureus* attraverso il prelievo di



campioni di latte dalle mammelle. Gli animali sono poi stati assegnati in modo casuale a due gruppi: al primo, composto da 13 esemplari, è stata poi somministrata la soluzione con il fago, mentre al secondo, composto da 11 esemplari, quella placebo. Il fago scelto (fago K) e il placebo sono stati somministrati, al momento della mungitura, con infusione intramammaria una volta al giorno per 5 giorni consecutivi. Sono quindi stati raccolti quattro campioni seriali di latte post trattamento per effettuare la ricerca del patogeno. I risultati sono stati fallimentari: solo tre dei 18 quarti mammari trattati con terapia fagica sono guariti, evento che potrebbe essere anche ascrivibile al caso o ad altri fattori (guarigione spontanea, evento autolimitante o altro), soprattutto alla luce del fatto che i quarti guariti presentavano solo una lieve mastite. Nel gruppo di controllo, invece, nessun quarto ha visto la guarigione. Probabilmente il fago non è riuscito ad intervenire in modo efficace perché le proteine del siero del latte hanno la capacità di legarsi alla superficie dello *Staphylococcus aureus*, inibendo il legame con il fago. Lo stesso studio, comunque, ha anche indagato l'effetto della somministrazione fagica sulla ghiandola mammaria: l'infusione giornaliera nei quarti infetti non ha determinato un aumento significativo della conta delle cellule somatiche (SCC) del latte negli animali trattati con fago rispetto a quelli ricevuti il placebo. Al contrario, un aumento significativo della SCC è stato rilevato per la somministrazione fagica su mammelle sane. Questo dimostra come la ghiandola mammaria bovina reagisca con un'elevata risposta immunitaria alla presenza del batteriofago. Suddetta sensibilità, invece, non è stata notata nei quarti già infetti da una mastite subclinica <sup>[59]</sup>. Nel caso dello Stafilococco, a differenza degli studi menzionati per gli altri agenti batterici, troviamo delle lacune maggiori nella terapia fagica, ma anche degli elementi che ci aiutano a comprendere i pregi e i difetti di una tecnica ancora da scoprire. Più di recente, comunque, sono

stati eseguiti nuovi studi, utilizzando come modello i topi: essi rappresentano infatti un modello più economico e rapido. I risultati hanno portato a buone prospettive, in alcuni casi già dopo 24 ore dal trattamento si è riscontrata una riduzione della colonizzazione del batterio nei soggetti trattati <sup>[60]</sup>.

## 5. Aspetti normativi

L'uso dei batteriofagi come alternativa alla più consueta antibioticoterapia, come per ogni altro medicinale somministrato agli animali, deve rispettare la normativa vigente riguardante la vendita, la fabbricazione, l'importazione, l'esportazione, la fornitura, la distribuzione e il controllo dei medicinali veterinari (VMP) <sup>[61]</sup>. Ad oggi, il Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'11 dicembre 2018 norma l'utilizzo dei medicinali ad uso veterinario. Esso sostituisce la precedente direttiva 2001/82/CE ed è entrato in vigore il 28 gennaio 2019 con applicazione a decorrere dal 28 gennaio 2022. Inoltre, l'allegato II del Regolamento (UE) 2019/6, modificato dal Regolamento (Ue) 2021/805, pone la terapia fagica tra le “novel therapy” e, per questo motivo, l'Agenzia Europea per i Medicinali (European Medicines Agency, EMA) ha ritenuto opportuno emanare apposite linee guida in vigore dal 13 ottobre 2023, aggiuntive al regolamento europeo stesso e per dare supporto ai produttori di batteriofagi <sup>[62]</sup>. Nella parte introduttiva del documento, viene dichiarato che “a causa della complessità biologica e della natura nascente dei medicinali veterinari specificamente progettati per la terapia fagica, i consigli forniti in questo documento sono generali e non entrano nei dettagli”. Tali linee guida non contengono, chiaramente, direttive vincolanti, infatti non rappresentano una fonte normativa, ma offrono un valido supporto ai produttori di batteriofagi. Sempre nella parte introduttiva ne vengono chiariti gli obiettivi: “Questa attuale linea guida affronta, tra gli altri aspetti, la base normativa, tecnica e scientifica applicabile alla qualità, sicurezza ed efficacia dei medicinali veterinari per terapia fagica in cui è prevista una composizione variabile del prodotto finale”. La sicurezza e l'efficacia devono quindi essere un punto fondamentale della terapia, al quale non deve mancare di flessibilità. A tal

proposito, come specificato in nell'articolo pubblicato il 20 ottobre 2023 dall'Associazione Nazionale Medici Veterinari Italiani <sup>[62]</sup>: “Per EMA, il punto chiave della linea guida è di orientare i produttori verso la registrazione di medicinali con una composizione flessibile”. Quanto detto è fondamentale, soprattutto alla luce della possibile creazione di resistenze batteriche anche nei confronti dei fagi. Proprio per questo motivo, il produttore dovrà preferire lo sviluppo di un cocktail di batteriofagi, più che di una soluzione contenente un solo tipo di fago, il quale può meglio affrontare un'eventuale resistenza.

## 6. Conclusioni

Il tema dell'utilizzo degli antibiotici negli allevamenti e della loro possibile sostituzione con tecniche alternative, in particolare la terapia fagica, è stato il filone centrale di questa tesi. Il sempre maggiore consumo di carne e i continui trattamenti terapeutici sulle specie allevate contribuiscono ad aumentare la resistenza alle terapie utilizzate da parte dei microrganismi patogeni. Il principio cardine di One Health (unica salute) merita la nostra attenzione in questo momento storico: esso si basa sul riconoscimento che la salute umana, la salute animale e la salute dell'ecosistema siano legate in modo indissolubile. Sulla base di questo, le terapie che si decidono di utilizzare su un componente dell'ecosistema, come quello animale, indubbiamente influenzeranno anche gli altri. Il dilagante consumo di antibiotici negli allevamenti intensivi espone sia gli animali che noi a dover affrontare specie batteriche sempre più resistenti e più difficili da debellare. È evidente che si necessiti di un approccio diverso, volto alla ricerca di tecniche alternative sicure, ma allo stesso tempo efficaci. Abbiamo parlato dei batteriofagi nella veste di possibili sostituti all'antibioticoterapia, ma dai risultati ottenuti non possiamo concludere che ad oggi rappresentino un valido sostituto immediato. D'altro canto, sono stati evidenziati anche dati rassicuranti, che ci permettono di riconoscere in essi un potenziale sostituto nel prossimo futuro, insieme ad altre tecniche emergenti e sostitutive alla terapia classica. Dagli studi che sono stati analizzati in questa tesi sono emersi degli aspetti positivi: tra questi, sicuramente, la capacità dei fagi di non creare danni rilevanti nelle specie trattate. In tutti gli studi citati è stata dimostrata l'innocuità del cocktail somministrato agli animali allevati. In particolare, nel cocktail somministrato ai polli dal gruppo di ricerca

Chinivasagam et al. <sup>[56]</sup> per il trattamento del *Campylobacter*, si è notato come esso sia stato in grado di colpire il microrganismo interessato senza danneggiare la componente zoonotica del microbiota dell'animale. La specificità di azione dei fagi, in aggiunta, è un grande vantaggio per il benessere dell'animale e per la qualità del prodotto. Al contrario, tuttavia, sempre nello studio appena menzionato, si è notato come l'alta specificità del fago necessiti di una selezione accurata per capire quale sia il più funzionale per la buona riuscita del trattamento. Diretta conseguenza è che spesso non si riesce ad essere specifici, visto anche che le condizioni *in vivo* sono diverse da quelle *in vitro*, dove manca la possibilità di infezione da parte di altre specie o varianti del microrganismo durante l'approccio terapeutico, evento che invece si realizza *in vivo* e che comporta il rischio di compromettere l'efficacia della terapia fagica. Lo studio di Tuomala H et al. <sup>[57]</sup>, riguardante il trattamento dello *Staphylococcus aureus*, ha invece evidenziato come una bassa concentrazione del microrganismo influenzi negativamente la terapia, al contrario, invece, un numero elevato di batteri favorisce la rapida moltiplicazione dei batteriofagi e un successo più probabile. Un aspetto che non è da trascurare, inoltre, è quanto riscontrato nello studio di Clavijo V et al., nel 2019 <sup>[52]</sup>, riguardante il trattamento della *Salmonella* nei polli. A causa di un evento sfortunato è stato necessario intervenire con un antibiotico durante il trattamento con il cocktail di fagi, questo inconveniente ha comunque permesso di dimostrare che un trattamento simultaneo di antibiotici e fagi è stato compatibile e ha anzi suggerito un'azione efficace nel controllo della *Salmonella*.

In conclusione, è possibile affermare che, nonostante al momento una completa sostituzione dell'antibioticoterapia con il trattamento fagico non sia fattibile, quest'ultimo possa essere utilizzato come terapia integrativa, così da ridurre la pressione antibiotica sugli allevamenti e rallentare la

probabilità che un microrganismo possa attuare ulteriori meccanismi di resistenza.

Nell'ottica di quanto esaminato, i Tecnici della Prevenzione continueranno a difendere la salute del consumatore, promuovendo tecniche innovative, azioni congiunte, e collaborazioni multidisciplinari per promuovere l'approccio One Health necessario a far fronte alle sfide già esistenti e future.

## 7. Bibliografia e Sitografia

1. Pathways towards lower emissions, FAO, 2023. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cc9029en>.
2. Gigante A, Atterbury RJ. Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock. *Virol J.* 2019 Dec 12;16(1):155.
3. Jones BA, Grace D, Kock R, Alonso S, Rushton J, Said MY, McKeever D, Mutua F, Young J, McDermott J, Pfeiffer DU. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 21;110(21):8399-404.
4. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 May 5;112(18):5649-54.
5. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, Foster S, Gilmore BF, Hancock RE, Harper D, Henderson IR, Hilpert K, Jones BV, Kadioglu A, Knowles D, Ólafsdóttir S, Payne D, Projan S, Shaunak S, Silverman J, Thomas CM, Trust TJ, Warn P, Rex JH. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb;16(2):239-51.
6. Brenner S, Streisinger G, Horne RW, et al. Componenti strutturali del batteriofago. *J. Mol. Biol.* 1959; 1 (3):281–292.
7. Baschong W, Baschong-Prescianotto C, Engel A, et al. Mass analysis of bacteriophage T4 proheads and mature heads by scanning transmission electron microscopy and hydrodynamic measurements. *J. Struct. Biol.* 1991;106(2):93–101.
8. Fokine A, Leiman PG, Shneider MM, et al. Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97



- point to a common ancestry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005;102(20):7163–7168.).
9. Rao, Venigalla & Fokine, Andrei & Fang, Qianglin & Shao, Qianqian. (2023). Bacteriophage T4 Head: Structure, Assembly, and Genome Packaging. *Viruses.* 15. 527. 10.3390/v15020527.
  10. Hsiao CL, Black LW. DNA packaging and pathway of bacteriophage T4 head assembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1977;74(9):3652–3656.
  11. Fokine A, Islam MZ, Fang Q, Chen Z, Sun L, Rao VB. Structure and Function of Hoc-A Novel Environment Sensing Device Encoded by T4 and Other Bacteriophages. *Viruses.* 2023 Jul 7;15(7):1517.
  12. Yap ML, Rossmann MG. Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiol.* 2014;9(12):1319-27.
  13. Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Rüger W. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Mar;67(1):86-156, table of contents.
  14. Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):553-7.
  15. Poli G.: I batteriofagi. In Poli G., *Microbiologia e immunologia veterinaria.* 2017. Milano: Edra, pp 311-318.
  16. Mueser TC, Hinerman JM, Devos JM, Boyer RA, Williams KJ. Structural analysis of bacteriophage T4 DNA replication: a review in the *Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives.* *Virol J.* 2010 Dec 3; 7:359.
  17. Kuhn A., Keller B., Maeder M., Traub F. Prohead core of bacteriophage T4 can act as an intermediate in the T4 head assembly pathway. *J. Virol.* 1987; 61:113–118.

18. Kuhn A, Thomas JA. The Beauty of Bacteriophage T4 Research: Lindsay W. Black and the T4 Head Assembly. *Viruses*. 2022 Mar 28;14(4):700.
19. Erlan Ramanculov, Ry Young, Genetic analysis of the T4 holin: timing and topology, *Gene*, Volume 265, Issues 1–2, 2001, Pages 25-36.
20. Paddison, P., Abedon, S.T., Dressman, H.K., Gailbreath, K., Tracy, J., Mosser, E., Neitzel, J., Guttman, B., Kutter, E., 1998. The roles of the bacteriophage T4 r genes in lysis inhibition and  $\phi$ ne- structure genetics: a new perspective. *Genetics* 148, 1539±1550.
21. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 2000.
22. <https://www.epicentro.iss.it/salmonella/>
23. Kirk M.D., Pires S.M., Black R.E., Caipo M., Crump J.A., Devleeschauwer B., Doepfer D., Fazil A., Fischer-Walker C.L., Hald T., et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Salmonellosis. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2019. Stockholm: ECDC; 2023.
25. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal* 2022; 20(3):7209, 197 pp.).
26. [https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/dati-efsa-ecdc-2018-2019#:~:text=Alcuni%20dati%20sulla%20Salmonella,risultata%20bassa%20\(%3C10%25\).](https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/dati-efsa-ecdc-2018-2019#:~:text=Alcuni%20dati%20sulla%20Salmonella,risultata%20bassa%20(%3C10%25).)

27. Rahul Chaudhari, Kanika Singh, Prashant Kodgire, Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* spp., *Research in Microbiology*, Volume 174, Issues 1–2, 2023.
28. Teklemariam AD, Al-Hindi RR, Albiheyri RS, Alharbi MG, Alghamdi MA, Filimban AAR, Al Mutiri AS, Al-Alyani AM, Alseghayer MS, Almaneea AM, Albar AH, Khormi MA, Bhunia AK. Human Salmonellosis: A Continuous Global Threat in the Farm-to-Fork Food Safety Continuum. *Foods*. 2023 Apr 23;12(9):1756.
29. Fischer GH, Hashmi MF, Paterek E. *Campylobacter* Infection. 2024 Jan 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
30. <https://epicentro.iss.it/campylobacter/>
31. WHO. 2013. The Global View of Campylobacteriosis: Report of an Expert Consultation. Utrecht, Netherlands 9-11 July 2012. *Who Rep.* 57.).
32. Igwaran A, Okoh AI. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon*. 2019 Nov 14;5(11):e02814.
33. Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Mégraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 2006 Jun;8(7):1967-71.
34. Nannapaneni R., Story R., Wiggins KC, Johnson MG (2005). Quantificazione simultanea dei carichi totali di *Campylobacter* e *Campylobacter* resistente alla ciprofloxacina nei risciacqui di carcasse di pollo crudo al dettaglio dal 2001 al 2003 mediante placcatura diretta a 42 °C . *Appl. Environ. Microbiol.* 71 , 4510–4515.
35. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 2009 Mar;4(2):189-200.

36. Shen Z, Wang Y, Zhang Q, Shen J. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* spp. *Microbiol Spectr*. 2018 Apr;6(2).
37. Chen, Xiaohui & Liu, Panpan & Luo, Xiaofeng & Huang, Ailin & Wang, Guiqin. (2024). Study on the antibacterial activity and mechanism of Cinnamaldehyde against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Food Research and Technology*. 250. 1-13. 10.1007/s00217-023-04446-z.
38. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M; SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. 2001 May 15;32 Suppl 2:S114-32.
39. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*. 2003 Mar 31;2(1):63-76.
40. Gutiérrez D, Delgado S, Vázquez-Sánchez D, Martínez B, Cabo ML, Rodríguez A, Herrera JJ, García P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Dec;78(24):8547-54.
41. Hu D.L., Li S., Fang R., Ono H.K. Update on molecular diversity and multipathogenicity of staphylococcal superantigen toxins. *Anim. Dis*. 2021; 1:7.
42. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jun;44(6):1549-55.

43. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Sep;7(9):629-41.
44. Mulders MN, Haenen AP, Geenen PL, Vesseur PC, Poldervaart ES, Bosch T, Huijsdens XW, Hengeveld PD, Dam-Deisz WD, Graat EA, Mevius D, Voss A, Van De Giessen AW. Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands. *Epidemiol Infect*. 2010 May; 138(5):743-55.
45. Fluit AC. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Aug;18(8):735-44.
46. Wessels K, Rip D, Gouws P. *Salmonella* in Chicken Meat: Consumption, Outbreaks, Characteristics, Current Control Methods and the Potential of Bacteriophage Use. *Foods*. 2021 Jul 28;10(8):1742.
47. Joerger R.D. Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci*. 2003; 82:640–647.
48. Abedon ST, Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ. Phage Cocktail Development for Bacteriophage Therapy: Toward Improving Spectrum of Activity Breadth and Depth. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Oct 3;14(10):1019.
49. Moye Z.D., Woolston J., Sulakvelidze A. Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*. 2018; 10:205.
50. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21(12), e8442.
51. Wall SK, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jan;76(1):48-53.
52. Clavijo V, Baquero D, Hernandez S, Farfan JC, Arias J, Arévalo A, Donado-Godoy P, Vives-Flores M. Phage cocktail SalmoFREE® reduces

- Salmonella on a commercial broiler farm. *Poult Sci.* 2019 Oct 1;98(10):5054-5063.
53. Jäckel C, Hammerl JA, Hertwig S. *Campylobacter* Phage Isolation and Characterization: What We Have Learned So Far. *Methods Protoc.* 2019 Feb 15;2(1):18.
54. Sails AD, Wareing DR, Bolton FJ, Fox AJ, Curry A. Caratterizzazione di 16 batteriofagi di tipizzazione di *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. *J. Med. Microbiol.* 1998; 47 :123–128.
55. Hammerl JA, Jäckel C, Alter T, Janzcyk P, Stingl K, Knüver MT, Hertwig S. Reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chicken by successive application of group II and group III phages. *PLoS One.* 2014 Dec 9;9(12):e114785 .
56. Chinivasagam HN, Estella W, Maddock L, Mayer DG, Weyand C, Connerton PL, Connerton IF. Bacteriophages to Control *Campylobacter* in Commercially Farmed Broiler Chickens, in Australia. *Front Microbiol.* 2020 Apr 27; 11:632.
57. Tuomala H, Verkola M, Meller A, Van der Auwera J, Patpatia S, Järvinen A, Skurnik M, Heikinheimo A, Kiljunen S. Phage Treatment Trial to Eradicate LA-MRSA from Healthy Carrier Pigs. *Viruses.* 2021 Sep 22;13(10):1888.
58. Honegger, J; Lehnerr, H; Bachofen, Claudia; Stephan, Roger; Sidler, Xaver (2020). Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 162(5):307-317.
59. Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of

- subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Sep;50(9):2912-8.
60. Nale JY, McEwan NR. Bacteriophage Therapy to Control Bovine Mastitis: A Review. *Antibiotics (Basel).* 2023 Aug 10;12(8):1307.
61. <https://www.salute.gov.it/portale/medicinaliVeterinari/dettaglioContenutiMedicinaliVeterinari.jsp?lingua=italiano&id=5605&area=veterinari&menu=regolamento#:~:text=Stabilisce%20norme%20per%20la%20vendita,veterinari%20e%20aumentarne%20la%20disponibilit%C3%A0>
62. <https://www.anmvioggi.it/rubriche/farmaco/75026-batteriofagi-ad-uso-veterinario-linea-guida-ema.html>

## **8. Ringraziamenti**

Ringrazio la mia relatrice, la Dott.ssa Ilaria Rosorani, una persona estremamente competente e meticolosa. Ringrazio tutti i professori e miei compagni di corso che mi hanno accompagnato in questo tragitto. Non posso che ringraziare inoltre la mia famiglia che mi ha sostenuto in questi tre anni e mia moglie Federica, per la pazienza mostrata.