



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

**Caratterizzazione genotipica e fenotipica di nuovi micobatteriofagi e
studio dell’interazione delle cellule umane dell’immunità innata con
il fago Pisa4**

Relatori:

Prof.ssa Maria Rosalia Pasca

Prof.ssa Mariagrazia Di Luca

Dr. Andrea Bonacorsi

Tesi Sperimentale di

Sara Maccioni

Anno accademico 2024/2025

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| 1.1 Micobatteri: caratteristiche generali | 3 |
| 1.2 <i>Mycobacterium smegmatis</i> : organismo modello per i micobatteri patogeni | 4 |
| 1.3 <i>Mycobacterium abscessus</i> : patogenicità e rilevanza clinica | 5 |
| 1.4 Antibiotico-resistenza..... | 8 |
| 1.5 I fagi come alternativa agli antibiotici | 11 |
| 1.6 Terapia fagica..... | 15 |
| 1.7 Interazione tra fagi e sistema immunitario innato | 16 |
| 1.7.1 Neutrofili e NETosi | 17 |
| 1.7.2 Modulazione citochinica | 19 |
| 2.SCOPO DEL LAVORO | 20 |
| 3. MATERIALI E METODI | 22 |
| 3.2 Condizioni di crescita dei batteri..... | 22 |
| 3.2 Preparazione del Phage Buffer | 24 |
| 3.3 Preparazione dei tappeti batterici | 24 |
| 3.4 Isolamento dei fagi | 25 |
| 3.5 Titolazione dei fagi | 26 |
| 3.6 Amplificazione dei fagi | 26 |
| 3.7 Purificazione con Cloruro di Cesio (CsCl) | 27 |
| 3.8 Estrazione del DNA virale | 29 |
| 3.9 Caratterizzazione genotipica | 31 |
| 3.10 Caratterizzazione fenotipica | 32 |
| 3.10.1 Saggi di stabilità alla temperatura | 32 |
| 3.10.2 Saggi di stabilità al pH | 32 |
| 3.11 Host range and Efficiency Of Plating (EOP)..... | 33 |
| 3.12 Cinetica di lisi | 34 |
| 3.13 NETosi | 34 |
| 3.14 Analisi della produzione di citochine | 36 |
| 3.15 Analisi statistica..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 4. RISULTATI | 39 |
| 4. 1 Analisi del genoma | 39 |
| 4.2 Host range and Efficiency Of Plating Assay | 44 |
| 4.3 Stabilità alla temperatura | 45 |
| 4.4 Stabilità al pH | 46 |
| 4.5 Caratterizzazione del fago Pisa4 | 47 |
| 4.6 Cinetica di lisi | 48 |
| 4.7 Valutazione dell'induzione della NETosi | 50 |
| 4.8 Valutazione dell'induzione delle citochine | 52 |
| 5. DISCUSSIONE..... | 55 |
| 6. CONCLUSIONI..... | 60 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 61 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Micobatteri: caratteristiche generali

I micobatteri appartengono alla famiglia delle *Mycobacteriaceae* e sono inclusi nell'ordine degli *Actinomycetales*. Il genere *Mycobacterium* comprende oltre 200 specie (Daffé e Marrakchi 2019). Sono bacilli aerobi obbligati, immobili, asporigeni e privi di capsula. Inoltre, sono acido-resistenti e caratterizzati da una parete cellulare atipica che è molto importante per la loro patogenicità e per l'antibiotico-resistenza. La parete cellulare dei micobatteri presenta una complessa organizzazione che garantisce loro una straordinaria protezione (Pereira *et al.* 2020). Nello strato interno è presente il peptidoglicano, che conferisce rigidità e supporto strutturale alla parete cellulare. Al di sopra del peptidoglicano è presente uno strato composto da arabinogalattani, lipoarabinomannani e lipomannani. Queste molecole fungono da ponte strutturale tra lo strato interno e la porzione esterna della parete, ricca in polisaccaridi e lipidi complessi, alcuni dei quali proteggono i micobatteri dal sistema immunitario dell'ospite (Ishikawa *et al.* 2009). Gli acidi micolici rappresentano la componente più caratteristica della parete cellulare; si tratta di acidi grassi a lunga catena (60-90 atomi di C) con lunghe ramificazioni (Pereira *et al.* 2020). Questi acidi grassi sono molecole idrofobiche che possono legarsi covalentemente agli arabinogalattani, formando l'impalcatura strutturale della parete, oppure al trealosio, dando origine al trealosio dimicolato (TDM), noto come fattore cordale. La superficie esterna della parete cellulare, oltre agli acidi micolici, presenta ulteriori molecole: glicopeptidolipidi (GPL), sistemi di efflusso MmpL, sistemi di secrezione ESX (Figura 1); i GPL non sono universali nel genere e risultano assenti in *Mycobacterium tuberculosis*.

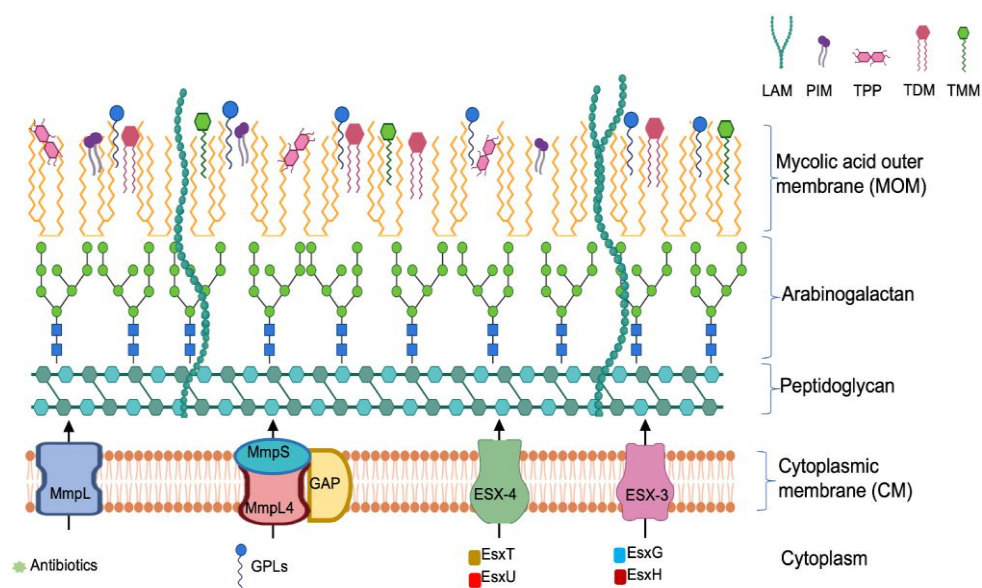


Figura 1: Parete cellulare dei micobatteri (Parmar e Tocheva 2023).

Tra queste molecole, il fattore cordale riveste una particolare importanza clinica poiché è tipicamente prodotta dai micobatteri patogeni; esso incrementa l'azione immunologica e favorisce la formazione dei granulomi, permettendo ai patogeni di persistere nei tessuti dell'ospite (Alderwick *et al.* 2015).

I micobatteri comprendono due gruppi principali: il complesso *Mycobacterium tuberculosis* e il complesso dei micobatteri non tubercolari (NTMs) (Zakhareva *et al.* 2025). Il complesso *M. tuberculosis* comprende specie a crescita lenta strettamente correlate dal punto di vista genetico, responsabili della tubercolosi nell'uomo e negli animali. Tra queste rientrano: *M. tuberculosis*, principale agente eziologico della tubercolosi umana; *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canettii*, entrambe associate alla tubercolosi nell'uomo; *Mycobacterium bovis*, responsabile della tubercolosi bovina e umana. Altre specie appartenenti al complesso sono: *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti*. Tra i micobatteri patogeni troviamo anche *Mycobacterium leprae*, responsabile della lebbra. Gli NTMs comprendono un ampio gruppo di specie ambientali, ubiquitarie nel suolo e nell'acqua, responsabili di infezioni non riconducibili alla tubercolosi (Lee *et al.* 2015). Generalmente si tratta di microrganismi opportunisti che possono causare infezioni soprattutto in soggetti immunocompromessi o con patologie polmonari preesistenti. In base alla velocità di crescita, possono essere ulteriormente suddivisi in micobatteri a crescita lenta e micobatteri a crescita rapida. Tra gli NTMs a crescita lenta, il complesso *Mycobacterium avium* (MAC) riveste particolare importanza clinica e comprende le 2 specie *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*. *M. avium* include le quattro sottospecie: *avium*, *hominissuis*, *paratuberculosis*, *silvaticum* e *intracellulare*. Tra gli NTMs a crescita rapida, vi è il complesso *Mycobacterium abscessus*.

1.2 *Mycobacterium smegmatis*: organismo modello per i micobatteri patogeni

Tra i micobatteri non tubercolari a crescita rapida, *Mycobacterium smegmatis* rappresenta il principale organismo modello per lo studio dei micobatteri patogeni. Si tratta di un micobatterio saprofito e non patogeno, ampiamente utilizzato in ambito sperimentale grazie alla sua rapida crescita e alla possibilità di essere manipolato in condizioni di sicurezza. L'impiego di *M. smegmatis* come organismo modello è giustificato dalla conservazione di caratteristiche strutturali, metaboliche e genetiche comuni ai micobatteri patogeni, rendendolo un modello affidabile per lo studio di processi cellulari conservati. Inoltre, *M. smegmatis* presenta un'elevata accessibilità genetica, che ha consentito lo sviluppo e l'ottimizzazione di numerosi approcci sperimentali (Danilchanka *et al.* 2008).

1.3 *Mycobacterium abscessus*: patogenicità e rilevanza clinica

M. abscessus è attualmente considerato uno degli NTMs di maggiore rilevanza clinica, soprattutto per la sua capacità di causare infezioni polmonari croniche e difficili da trattare (Bernut *et al.* 2016).

Negli ultimi anni è emerso come patogeno opportunisto di grande importanza, soprattutto in pazienti affetti da patologie polmonari preesistenti, come la fibrosi cistica, nei quali l'infezione è associata a un peggioramento accelerato della funzione polmonare e a una prognosi sfavorevole (Esther *et al.* 2010). *M. abscessus* causa anche infezioni nosocomiali e mucocutanee, colonizzando le cellule epiteliali e mantenendo la capacità di infettare macrofagi e neutrofili. Oltre al coinvolgimento polmonare, è in grado di colpire anche altri organi quali occhi, cervello e pelle. Raramente può colpire anche il sistema nervoso centrale e determinare ascessi cerebrali e meningiti, principalmente in soggetti immunocompromessi (Daher *et al.* 2025). Dal punto di vista ecologico, è ampiamente diffuso nell'ambiente e viene principalmente isolato dal suolo e da acque naturali e potabili, circostanza che ne favorisce l'esposizione e l'acquisizione. *M. abscessus* è suddiviso nelle tre sottospecie *abscessus*, *bolletii* e *massiliense* (Tortoli *et al.* 2016). Storicamente questa divisione si basava su criteri fenotipici e biochimici; attualmente, invece, la classificazione è fondata su approcci genomici, in particolare sul sequenziamento dell'intero genoma e di geni housekeeping come *rpoB*, che codifica per la subunità β dell'RNA polimerasi, oltre al gene dell'rRNA 16S (Lee *et al.* 2015 ; Kim *et al.* 2010). Inoltre, questa classificazione riveste un'importanza clinica rilevante ai fini della gestione terapeutica. Le sottospecie *abscessus* e *bolletii* possono sviluppare resistenza inducibile ai macrolidi a causa di mutazioni nel gene *erm (41)* (Heydari *et al.* 2013). La sottospecie *massiliense* invece, presenta una delezione di questo gene e risulta generalmente più sensibile alle terapie basate sui macrolidi (Nash *et al.* 2009).

M. abscessus viene acquisito prevalentemente attraverso l'esposizione ambientale; tuttavia, sono stati documentati anche casi associati a dispositivi medici contaminati e procedure invasive. La via di trasmissione più comune è rappresentata dall'inalazione di aerosol provenienti da diverse fonti, come sistemi idrici ospedalieri e impianti domestici. Studi basati sul sequenziamento dell'intero genoma hanno identificato cloni altamente correlati, con differenze minime a livello di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), suggerendo eventi di trasmissione indiretta mediati da aerosol o fomi. Un'analisi genomica su larga scala di isolati clinici provenienti da pazienti con fibrosi cistica di diversi paesi, ha dimostrato che la maggior parte delle infezioni deriva dalla diffusione di cloni dominanti recentemente emersi e capaci di trasmissione interumana. Questi ceppi sono associati a esiti clinici più gravi, presentano una maggiore virulenza in modelli di infezione cellulari e mostrano una superiore capacità di sopravvivenza all'interno dei macrofagi (Bryant *et al.* 2016).

Dopo l'esposizione, ci sono diversi fattori di rischio che possono predisporre l'ospite all'infezione. Si distinguono fattori acquisiti, tra i quali rientrano il fumo, l'enfisema correlato e l'uso di corticosteroidi inalatori e fattori genetici, che comprendono condizioni che predispongono a infezioni polmonari ricorrenti, come la fibrosi cistica, il deficit di elastina, la proteinosi alveolare polmonare. Inoltre, esistono fattori non direttamente riconducibili ad alterazioni polmonari o immunologiche, come malnutrizione e infezioni ricorrenti. Le conseguenze dovute a queste condizioni, tra cui danni strutturali del polmone, disfunzioni ciliari e stati di immunodeficienza, predispongono gli individui affetti alle infezioni. Come illustrato nella Figura 2, l'infezione da *M. abscessus* è il risultato di un'interazione complessa tra esposizione ambientale, fattori dell'ospite e risposta immunitaria.

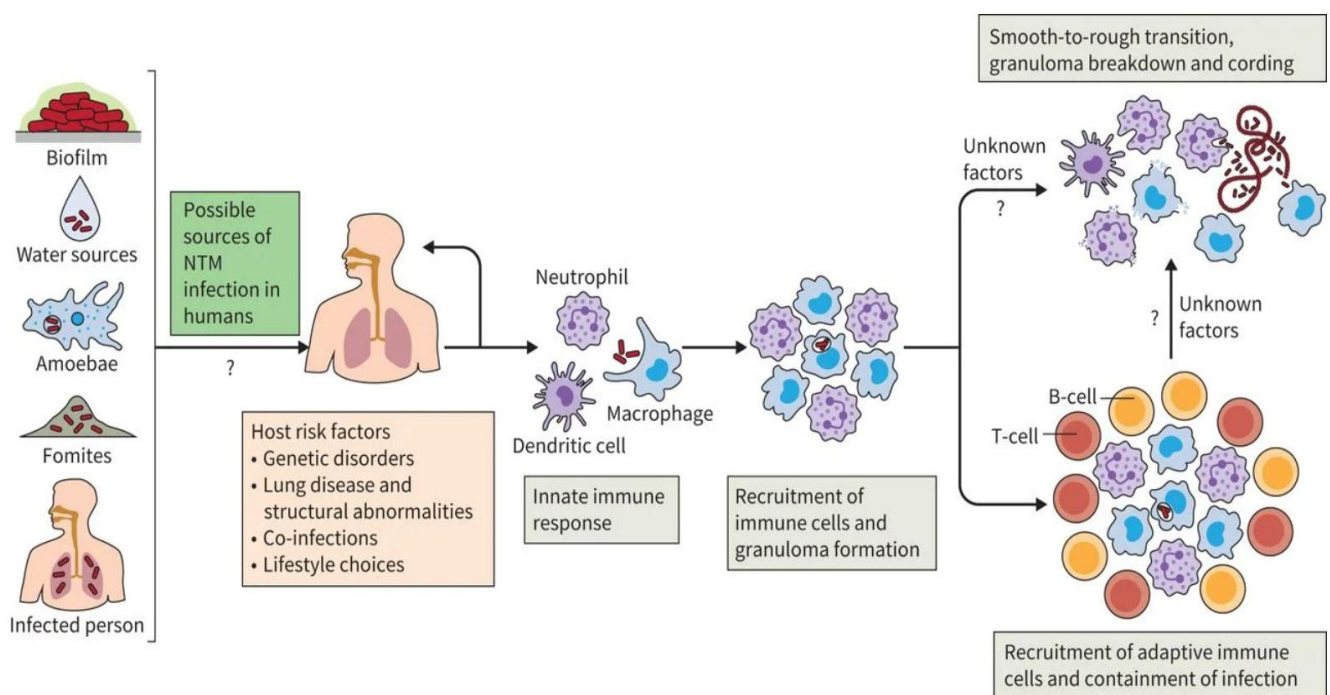


Figura 2: Rappresentazione schematica del ciclo di infezione di *M. abscessus* nell'uomo (Johansen et al. 2020).

Una volta acquisito, *M. abscessus* colpisce prevalentemente l'apparato respiratorio, aderendo alle cellule epiteliali delle vie aeree grazie ai glicopeptidolipidi, esposti sulla superficie cellulare. Successivamente, il batterio viene fagocitato dai macrofagi alveolari, all'interno dei quali può inibire la maturazione e l'acidificazione del fagosoma, consentendo la sopravvivenza e la replicazione intracellulare. A questo punto, il batterio è protetto dal riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite. La patogenicità di *M. abscessus* è strettamente correlata alle caratteristiche della sua parete cellulare e alla capacità di presentarsi in due morfotipi coloniali distinti: liscio (smooth o S) e rugoso (rough o R), associati a diversi stadi d'infezione (Figura 3).

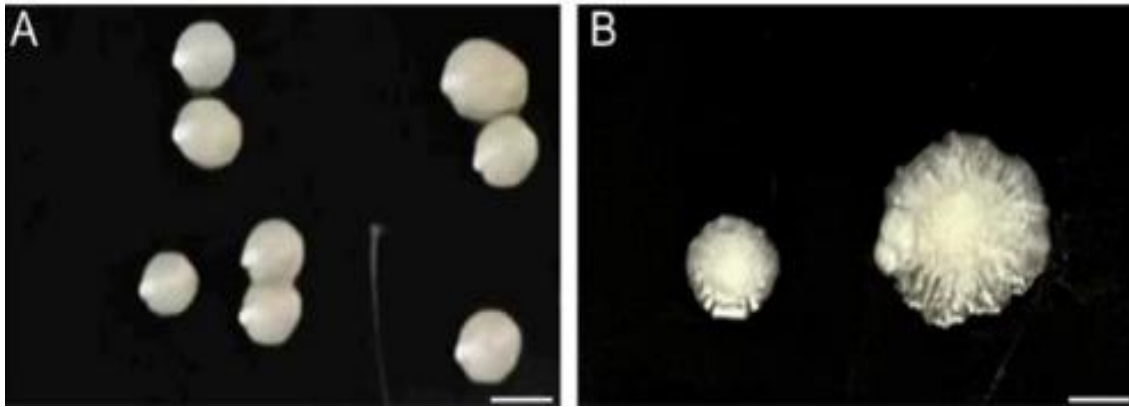


Figura 3: Morfotipo liscio (A) e rugoso (B) di *M. abscessus*. Le colonie del morfotipo liscio hanno bordi rotondi e regolari e superfici lucide, quelle del morfotipo rugoso invece presentano bordi irregolari e superfici opache ed asciutte (Parmar e Tocheva 2023).

Il morfotipo S, è caratterizzato dalla presenza di elevate quantità di GPL e bassi livelli di TDM. La presenza di GPL sulla superficie cellulare maschera componenti immunostimolatori della parete e modula le proprietà della superficie batterica, favorendo così l'adesione alle cellule epiteliali e la formazione di biofilm, che sono eventi cruciali nelle fasi iniziali dell'infezione (Gutiérrez *et al.* 2018). Tuttavia, i GPL possono essere riconosciuti dai macrofagi. Questo spiega perché il morfotipo S, pur facilitando la colonizzazione iniziale, presenta in genere una minore capacità di instaurare infezioni invasive rispetto al morfotipo rugoso. Quest'ultimo, invece, è associato a mutazioni genetiche nel locus *gpl* che determinano una ridotta o assente produzione di GPL sulla superficie cellulare, dovuta ad alterazioni nei processi di biosintesi o a deficit nei meccanismi di trasporto ed esposizione, con un aumento dei livelli di TDM (Kam *et al.* 2022). L'assenza di GPL e l'aumento dei TDM determinano una maggiore aggregazione batterica, che si manifesta con crescita extracellulare e produzione di fattore cordale. Quest'ultimo è più resistente alla fagocitosi ed è associato a un maggiore danno tissutale, contribuendo complessivamente ad un aumento della virulenza (Heydari *et al.* 2013 ; Gutiérrez *et al.* 2018). La virulenza di *M. abscessus* è strettamente associata anche alla sua capacità di formare biofilm, un meccanismo di protezione del batterio nei confronti delle difese immunitarie dell'ospite. Questo processo è particolarmente importante nelle infezioni polmonari croniche, nelle quali il biofilm di *M. abscessus* si accumula sulle superfici epiteliali e lungo le vie respiratorie, favorendo la persistenza dell'infezione (To *et al.* 2020). L'infezione da *M. abscessus* induce una risposta infiammatoria che può portare alla formazione del granuloma, una struttura organizzata composta da macrofagi, cellule epitelioidei e cellule multinucleate circondate da uno strato di linfociti T (Puissegur *et al.* 2004). Sebbene il granuloma rappresenti un meccanismo di difesa dell'ospite, finalizzato a contenere il patogeno, esso può anche costituire un microambiente favorevole alla sua persistenza e favorire la progressione dell'infezione (Ehlers e Schaible 2013). In questo contesto, i

sistemi di secrezione ESX hanno un ruolo centrale nella patogenesi di *M. abscessus*, che possiede i sistemi di secrezione ESX-3 ed ESX-4, ma è privo di ESX-1. Quest'ultimo è noto per il suo ruolo chiave nella virulenza di *M. tuberculosis*, in quanto induce la lisi della membrana del fagosoma e consente l'interazione dei componenti batterici con il citoplasma dei macrofagi. Nonostante l'assenza del sistema di secrezione ESX-1, *M. abscessus* mantiene un'elevata capacità patogenica, soprattutto grazie al sistema ESX-4. Quest'ultimo, infatti, contribuisce alla sopravvivenza intracellulare e alla modulazione della risposta immunitaria dell'ospite (Parmar e Tocheva 2023; Daher *et al.* 2025). Inoltre, possiede dimensioni maggiori rispetto a quello degli altri micobatteri e comprende il gene aggiuntivo *eccE4*; questi elementi ne sottolineano l'importanza nei processi infettivi. La presenza del gene *eccE4* sembra quindi contribuire a conferire al sistema ESX-4 funzioni in parte sovrapponibili a quelle mediate dal sistema ESX-1. Infine, ESX-3 è principalmente coinvolto nell'acquisizione del ferro e nell'omeostasi dei metalli, risultando essenziale per la crescita batterica (Daher *et al.* 2025). Nel complesso, questi meccanismi conferiscono a *M. abscessus* un'elevata capacità di persistenza nell'ospite, contribuendo alla cronicizzazione dell'infezione e rendendone particolarmente complessa l'eradicazione.

1.4 Antibiotico-resistenza

M. abscessus è considerato un patogeno emergente ed è uno degli NTMs più difficili da trattare a causa della sua marcata resistenza agli antibiotici, derivante dalla combinazione di meccanismi di resistenza intrinseca e acquisita (Saxena *et al.* 2021). Attualmente, la gestione terapeutica si basa su terapie antibiotiche di combinazione, spesso prolungate e associate a risultati clinici insoddisfacenti, in quanto i principali trattamenti impiegati sono gli stessi utilizzati per il trattamento di *M. tuberculosis*, ma risultano molto meno efficienti e richiedono tempistiche significativamente più lunghe (Griffith *et al.* 2007 ; Degiacomi *et al.* 2019). Le linee guida dell'American Thoracic Society e dell'Infectious Diseases Society of America raccomandano l'utilizzo di macrolidi (claritromicina o azitromicina), in associazione ad aminoglicosidi (amikacina), carbapenemi (imipenem) e antibiotici aggiuntivi come cefoxitina o tigeciclina (Wallace *et al.* 2014; Degiacomi *et al.* 2019) (Figura 4).

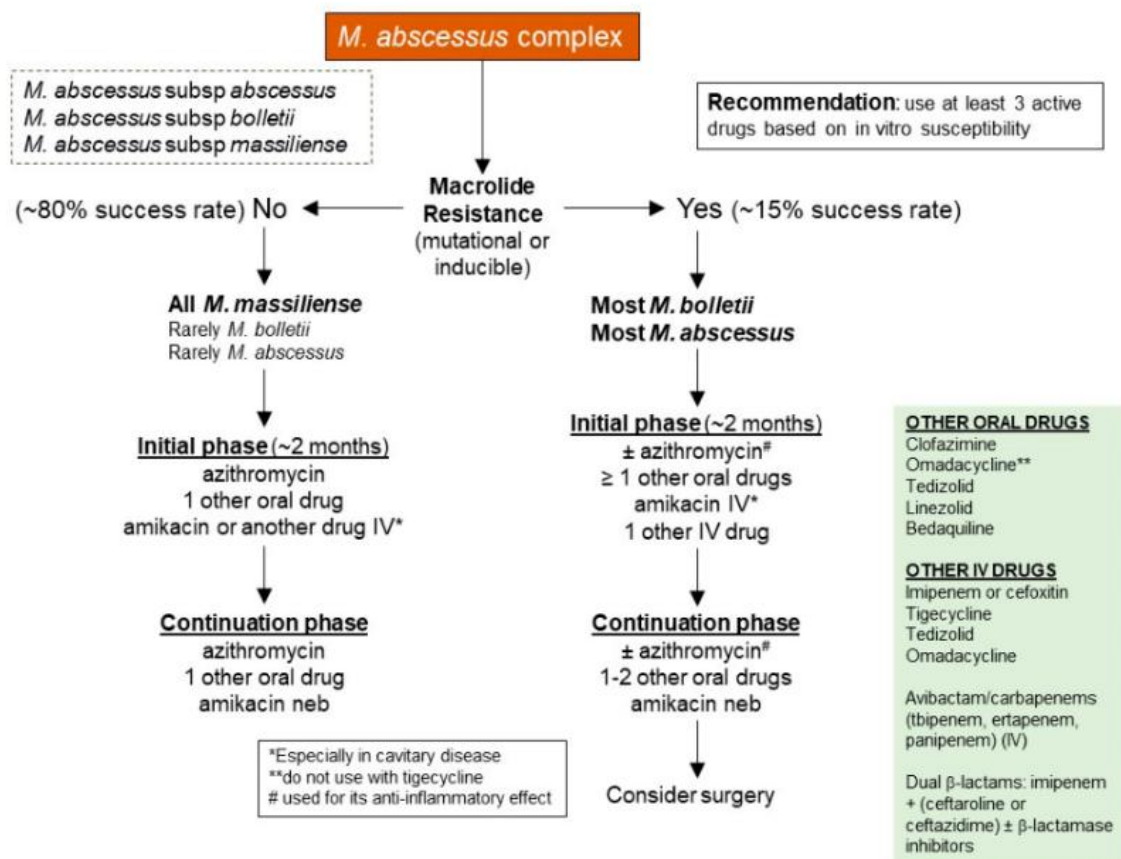


Figura 4: Rappresentazione schematica delle linee guida del trattamento antibiotico per *M. abscessus* (Abdelaal *et al.* 2022).

Il trattamento generalmente prevede una fase iniziale intensiva della durata di 3-12 settimane circa, finalizzata alla riduzione della carica batterica, seguita da una fase di continuazione prolungata. Nelle infezioni causate da NTMs, la terapia può estendersi fino a 12 mesi dopo la conversione delle colture, definita come l'ottenimento di tre campioni consecutivi negativi. Nello specifico, la fase intensiva include l'assunzione orale giornaliera di macrolidi (preferibilmente azitromicina), combinata all'amikacina per via endovenosa e uno o più dei seguenti antibiotici: tigeciclina, imipenem, cefoxitina. La fase di continuazione invece comprende l'amikacina per inalazione e due o tre antibiotici orali tra cui: minociclina, clofazimina, moxifloxacina e linezolid (Floto *et al.* 2016). È importante sottolineare che la tolleranza e l'efficacia della terapia possono essere influenzate dalle interazioni con altri farmaci assunti in modo cronico (Skolnik *et al.* 2016).

Nonostante l'aggressività di questi approcci, studi clinici evidenziano elevati tassi di fallimento terapeutico (Haworth *et al.* 2017). La scarsa efficacia delle terapie attualmente disponibili è strettamente correlata alla combinazione di meccanismi di resistenza (Daniel-Wayman *et al.* 2019) (Figura 5).

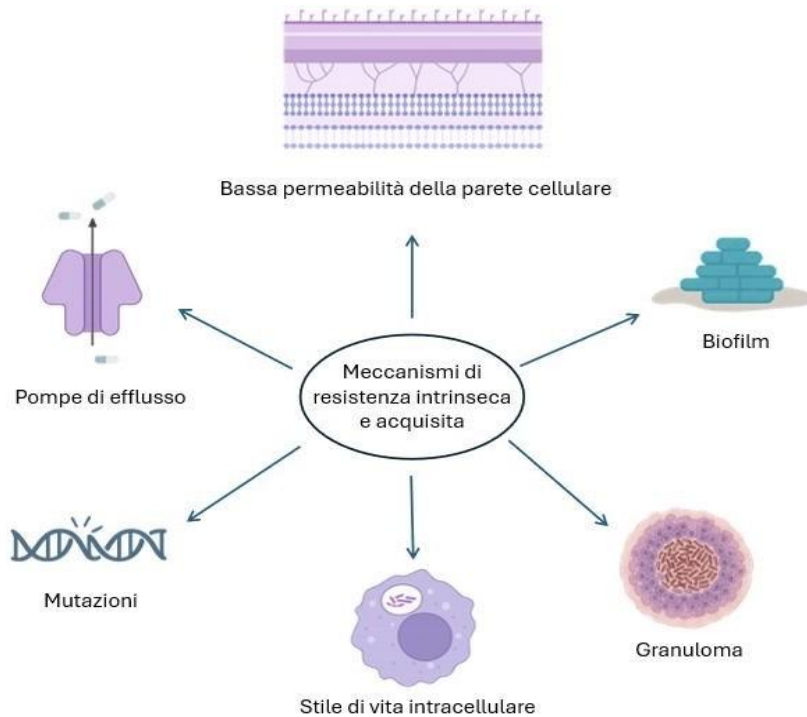


Figura 5: Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di protezione in *M. abscessus*.
L'immagine è stata creata utilizzando Biorender.

La resistenza antibiotica intrinseca è causata soprattutto dalla struttura della parete cellulare e dalla presenza di pompe di efflusso (Luthra *et al.* 2018) (Figura 6).

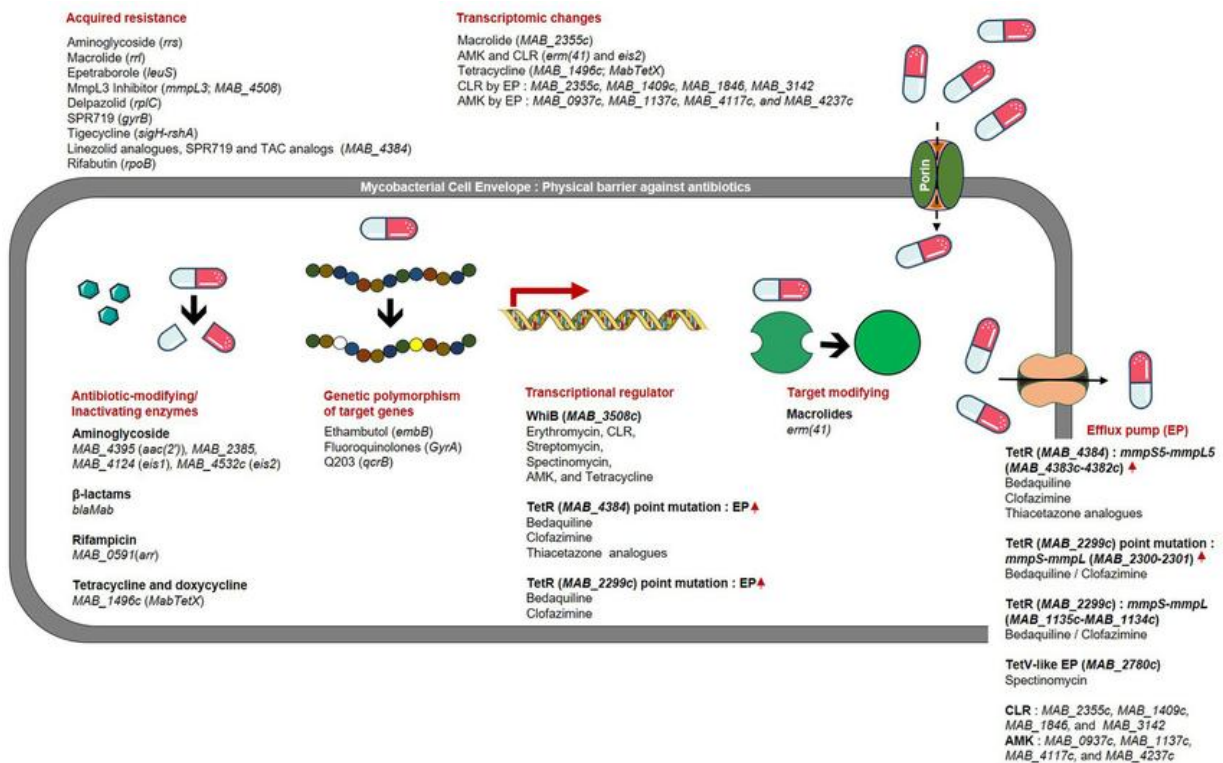


Figura 6: Meccanismi di resistenza ai farmaci e geni correlati in *M. abscessus* (Nguyen *et al.* 2024).

La parete cellulare è ricca di acidi micolici e GPL, che contribuiscono alla bassa permeabilità agli antibiotici (Gutiérrez *et al.* 2018). Le pompe di efflusso sono responsabili dell'espulsione attiva di numerose classi di antibiotici dalla cellula batterica verso l'ambiente extracellulare e riducono la concentrazione intracellulare (Nasiri *et al.* 2017). Esempi di queste pompe includono i trasportatori ABC (ATP-binding cassette), che riconoscono farmaci come isoniazide e rifampicina, e le proteine MmpL, che conferiscono resistenza alla clofazimina (López-Roa *et al.* 2022). Inoltre, *M. abscessus* produce diversi enzimi in grado di modificare strutturalmente alcuni antibiotici, come la penicillina e la cefamicina, bloccandone l'attività e rendendoli inefficaci nel trattamento delle infezioni. Tra questi enzimi, la β -lattamasi Bla_Mab (codificata da *MAB_2875*) è responsabile della limitata attività dei β -lattamici comunemente utilizzati in terapia. *M. abscessus* può sviluppare anche meccanismi di resistenza acquisita, soprattutto nei confronti dei macrolidi. Nelle sottospecie *abscessus* e *bolletii*, l'espressione del gene *erm (41)* determina la metilazione dell'rRNA 23S, impedendo il legame dei macrolidi al loro bersaglio, i ribosomi (Degiacomi *et al.* 2019). La resistenza acquisita ai macrolidi può insorgere anche durante il trattamento, in seguito a mutazioni nel gene *rrl*, codificante per l'rRNA 23S. Tali mutazioni provocano l'alterazione del sito di legame dei macrolidi sul ribosoma, impedendo l'azione antibiotica e determinando una resistenza ad alto livello. I ceppi con mutazioni nel gene *rrl* risultano resistenti fin dalle prime fasi dei test di sensibilità e mantengono stabilmente tale fenotipo (Bastian *et al.* 2011). Nel complesso, la capacità di *M. abscessus* di sopravvivere in ambiente intracellulare, formare biofilm e persistere all'interno dei granulomi, insieme ai meccanismi di resistenza intrinseca ed acquisita, contribuiscono a proteggerlo dall'azione degli antibiotici e dalla risposta immunitaria dell'ospite.

1.5 I fagi come alternativa agli antibiotici

Alla luce della crescente diffusione di micobatteri resistenti agli antibiotici e dei limitati progressi nello sviluppo di nuovi agenti antimicrobici, emerge la necessità di individuare strategie terapeutiche alternative. In questo contesto, la terapia fagica sta riemergendo come un approccio promettente (Pirnay 2020). Essa si basa sull'utilizzo di virus batterici chiamati batteriofagi o più semplicemente fagi, capaci di infettare e lisare specie o ceppi batterici specifici (Luong *et al.* 2020). I fagi sono le entità biologiche più abbondanti al mondo, sono stimate circa 10^{31} unità (Comeau *et al.* 2008 ; Cobián Güemes *et al.* 2016). Possono essere trovati ovunque e isolati facilmente da qualsiasi ambiente in cui siano presenti anche i batteri poiché, in quanto parassiti obbligati, non possono esistere in assenza dei loro ospiti (Comeau *et al.* 2008). In questo contesto, i micobatteriofagi si distinguono come virus capaci di infettare selettivamente i micobatteri (Hatfull 2022). Essi possono essere isolati facilmente da campioni ambientali, come il suolo e le acque reflue (Satish e Desouza 2019 ; Cao Yao *et al.* 2024).

Per il loro isolamento viene utilizzato *M. smegmatis* come ospite; in quanto privo di patogenicità e a crescita rapida (Sparks *et al.* 2023). Generalmente, il ceppo scelto è *M. smegmatis* mc²155 poiché è privo di profagi e consente l'isolamento dei fagi senza rischio di contaminazioni (Hatfull 2023a). (Hatfull 2023b). La loro ampia distribuzione ambientale è alla base dell'elevata diversità genetica e fenotipica osservata all'interno di questo gruppo di virus. In questo contesto, nel 2010 Hatfull e collaboratori hanno istituito l'Actinobacteriophage Database (PhagesDB), un database dedicato alla raccolta e alla condivisione sistematica delle informazioni sui fagi (Russell e Hatfull 2017). I micobatteriofagi appartengono alla classe *Caudoviricetes* e mostrano prevalentemente due diversi morfotipi: myovirus e siphovirus. Sono caratterizzati da un genoma a DNA a doppio filamento (dsDNA), racchiuso all'interno di un capsido proteico (testa) attaccato ad una lunga coda, rispettivamente contrattile nei myovirus e non contrattile nei siphovirus (Strathdee *et al.* 2023). Ad oggi non sono ancora stati isolati e caratterizzati micobatteriofagi con genoma a DNA a singolo filamento (ssDNA) o a RNA. Inoltre, non sono ancora stati descritti morfotipi podovirali, caratterizzati da code corte e non contrattili. Considerato l'elevato numero di micobatteriofagi osservati al microscopio dal punto di vista morfologico, è plausibile che questa morfologia sia effettivamente assente nei micobatteriofagi. Probabilmente la peculiare struttura della parete cellulare dei micobatteri costituisce una barriera fisica, ostacolando così l'accesso alla membrana e quindi l'instaurarsi di un'infezione produttiva da parte di fagi a coda corta (Hatfull 2018; Bonacorsi *et al.* 2024). Il 92% circa dei micobatteriofagi presenta morfologia siphovirale, mentre solo circa l'8% mostra morfologia myovirale (Hatfull 2014). La maggior parte dei siphovirali possiede capsidi isometrici (50-80 nm di diametro), una minoranza invece possiede capsidi prolatti con rapporti lunghezza/larghezza compresi tra 2.5:1 e 4:1 (Figura 7).

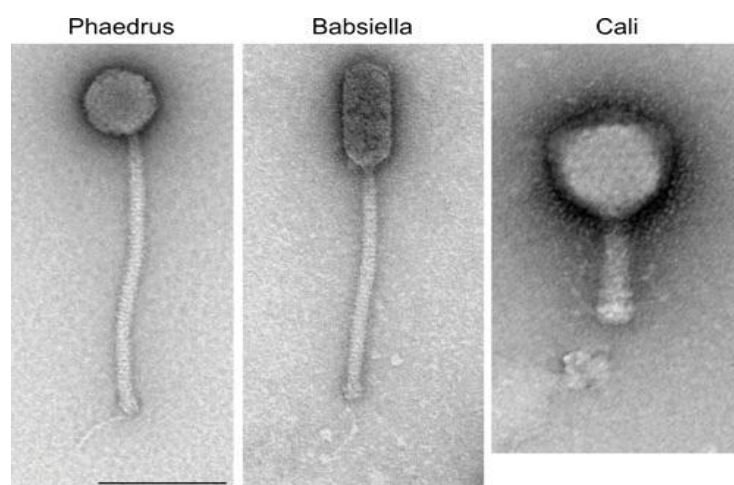


Figura 7: Morfologie dei micobatteriofagi. Sono illustrati tre esempi: i fagi Phaedrus e Babsiella presentano morfologie siphovirali, mentre il fago Cali presenta morfologia myovirale. Il capsido del fago Phaedrus è isometrico, quello del fago Babsiella è prolato (Hatfull 2014). [Scale bar = 100 nm].

I batteriofagi possono adottare due meccanismi biologici distinti per replicarsi; i fagi virulenti adottano il ciclo litico, mentre i fagi temperati possono sfruttare il ciclo lisogenico, in aggiunta a quello litico (Figura 8).

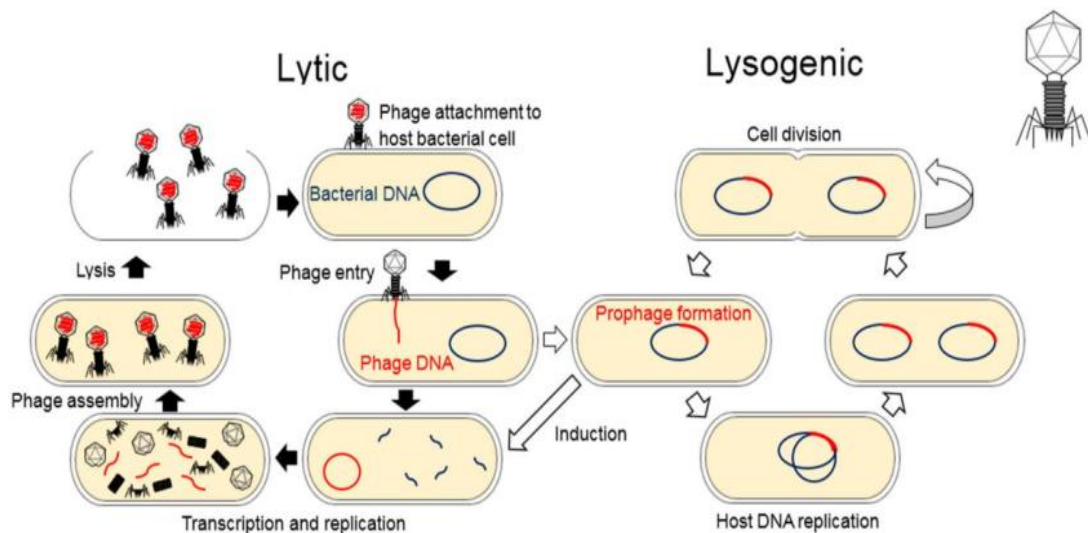


Figura 8: Rappresentazione schematica dei passaggi del ciclo litico e lisogenico (Batinovic *et al.* 2019).

Il ciclo litico rappresenta la strategia più rapida e aggressiva. Inizia con la fase di adsorbimento ai recettori della cellula batterica, seguita poi dalla fase di iniezione del materiale genetico (Schmalstig *et al.* 2024). Una volta all'interno della cellula ospite, i fagi dirottano il macchinario replicativo batterico e avviano la replicazione del proprio genoma nel citoplasma per produrre nuove progenie virali (Gordillo Altamirano e Barr 2019). Contemporaneamente, i fagi inducono la sintesi delle proteine virali, come quelle del capsido, che vanno incontro ad un processo di maturazione e assemblaggio nelle nuove particelle fagiche. A questo punto, vengono utilizzati enzimi litici codificati dal fago che causano la lisi della cellula ospite, con successivo rilascio dei nuovi fagi nell'ambiente, pronti ad infettare nuove cellule e ripetere il ciclo litico. D'altra parte, l'infezione causata da fagi temperati può portare al ciclo litico oppure al ciclo lisogenico, nel quale il genoma virale penetra all'interno della cellula ospite e si integra nel cromosoma batterico, prendendo il nome di profago. Il DNA profagico viene replicato insieme al DNA batterico durante ogni divisione cellulare, senza arrecare danni alla cellula ospite (Howard-Varona *et al.* 2017). In determinate condizioni, come in presenza di stress cellulare o scarsa disponibilità di nutrienti per l'ospite, il profago può essere indotto: viene escisso dal cromosoma e può avviare il ciclo litico (Hobbs e Abedon 2016). L'induzione del passaggio dal ciclo lisogenico al ciclo litico è spesso associata all'attivazione della risposta SOS dell'ospite, che comporta l'inattivazione dei repressori della lisogenia e la conseguente attivazione dei geni litici (Bruce *et al.* 2026). Nei fagi temperati la lisogenia è controllata dalla cassetta di

lisogenia, costituita da geni regolatori come integrasi ed escissionasi, rispettivamente responsabili dell'integrazione e dell'escissione del genoma fagico e repressori trascrizionali, necessari per mantenere la lisogenia (Hatfull 2022). Dal ciclo lisogenico i fagi possono quindi passare al ciclo litico, con conseguente lisi della cellula ospite.

L'analisi genotipica è cruciale per identificare le principali caratteristiche del fago in esame, tra cui il ciclo replicativo e l'eventuale presenza di geni associati alla resistenza antibiotica o a fattori di virulenza; quindi, rappresenta il primo passo fondamentale verso un potenziale impiego in terapia (Strathdee *et al.* 2023). Basandosi su queste analisi del genotipo, i micobatteriofagi sono classificati in diversi cluster (per esempio cluster A, B, C...), ulteriormente suddivisi in sottocluster (per esempio sottocluster A1, A2, A3...) oppure indicati come singleton quando non hanno parenti stretti (Hatfull *et al.* 2010 ; Hatfull 2020). Ad oggi sono stati identificati oltre 30 cluster principali; si tratta di un numero in costante aumento con l'identificazione di nuovi genomi fagici, riflettendo l'elevata diversità genetica di questi virus (Hatfull 2015). Poiché i cluster sono definiti sulla base della percentuale di geni condivisi, pari al 35%, l'appartenenza ad uno specifico cluster è associata a caratteristiche biologiche comuni, come la morfologia del virione, la preferenza d'ospite ed il ciclo replicativo (Hatfull 2020). In particolare, tutti i micobatteriofagi con morfologia myovirale appartengono al cluster C, suggerendo una minore diversità genetica all'interno di questo gruppo rispetto ai micobatteriofagi siphovirali, distribuiti in cluster diversi (Hatfull 2018). La caratterizzazione fenotipica è altrettanto fondamentale per valutare il potenziale clinico di un fago; in quanto permette di determinare parametri biologici essenziali come lo spettro d'ospite, ovvero l'insieme di specie o ceppi batterici suscettibili all'infezione da parte di un singolo fago (Bonacorsi *et al.* 2024). I micobatteriofagi presentano spettri d'ospite variabili, ma nei confronti degli NTMs risultano generalmente ristretti, rendendo necessaria un'accurata valutazione per selezionare i fagi più idonei da utilizzare in terapia (Hatfull 2022). La caratterizzazione fenotipica consente anche di valutare la cinetica di lisi, che fornisce informazioni sull'attività battericida e sulla rapidità con cui un fago infetta e lisa il batterio, importante per valutare l'attività dei fagi nei confronti di ceppi clinici, consentendo la selezione di quelli più idonei ed efficaci per il trattamento. Viene valutata anche la stabilità ambientale dei fagi a variazioni di temperatura e pH, per la corretta conservazione e la successiva applicazione clinica (Sinha *et al.* 2020 ; Nayak *et al.* 2023). Un aspetto rilevante emerso dalla caratterizzazione fenotipica riguarda l'interazione dei fagi con la morfologia della colonia batterica. In particolare, i fagi mostrano un tasso di infezione superiore nei ceppi R rispetto ai ceppi S. Quest'ultimi presentano GPL sulla loro superficie, che tendono a mascherare i recettori fagici, ostacolandone l'infezione. I ceppi rugosi invece, presentano mutazioni genetiche che bloccano la produzione di GPL, rendendoli più vulnerabili all'attacco dei fagi (Dedrick *et al.* 2021).

1.6 Terapia fagica

I fagi furono scoperti indipendentemente da Frederick Twort nel 1915 e da Félix d'Herelle nel 1917, che coniò il termine “batteriofago” e ne intuì per primo il potenziale terapeutico (Duckworth 1976 (Dublanche e Bourne 2007) (Fruciano e Bourne 2007). Dalla sua scoperta fino ad oggi, la terapia fagica è stata ampiamente studiata e utilizzata nei paesi dell'Europa orientale, come Georgia e Polonia (Rohde *et al.* 2018). Al contrario, l'avvento degli antibiotici a largo spettro portò i paesi occidentali ad abbandonare progressivamente l'uso terapeutico dei fagi (Davies e Davies 2010). Oggi, di fronte al problema dell'antibiotico-resistenza, la terapia fagica sta riemergendo come una valida strategia terapeutica (Pirnay 2020). Tuttavia, l'impiego clinico è ancora limitato e avviene prevalentemente in regime di terapia compassionevole; quindi, in pazienti con infezioni gravi o croniche refrattarie agli antibiotici tradizionali (McCallin *et al.* 2019).

Non tutti i fagi sono adatti all'impiego clinico. L'utilizzo di fagi lisogenici in terapia è sconsigliato per diversi motivi; essi mostrano una minore efficienza di killing rispetto ai fagi litici, poiché l'integrazione del genoma fagico nel cromosoma batterico ne consente la sopravvivenza e la replicazione. Inoltre, la lisogenia è associata al rischio di trasferimento genico orizzontale di geni coinvolti nella resistenza agli antibiotici o di fattori di virulenza (Hatfull 2023b). Questo fenomeno potrebbe aumentare la difficoltà di eradicazione del batterio. Questo aspetto è particolarmente rilevante nel caso dei micobatteriofagi, poiché la maggior parte degli isolati ambientali risulta temperato. Tuttavia, i fagi temperati possono essere geneticamente ingegnerizzati ottenendo fagi strettamente litici e più sicuri in terapia (Dedrick *et al.* 2021). Come detto in precedenza, è necessario eseguire una caratterizzazione genotipica e fenotipica completa per selezionare i fagi da impiegare in terapia. Una volta selezionati i fagi più idonei, essi possono essere somministrati attraverso diverse vie, tra cui quella endovenosa, inalatoria mediante nebulizzazione, topica, orale o intralesionale, a seconda del sito di infezione e delle condizioni cliniche del paziente. Nel caso delle infezioni da micobatteri, soprattutto quelle polmonari croniche, le modalità più usate sono la somministrazione endovenosa, con effetto sistemico, oppure mediante nebulizzazione, che consente una distribuzione mirata a livello dell'apparato respiratorio (Dedrick, Abad, et al. 2023).

L'efficacia e la sicurezza della terapia fagica nelle infezioni da *M. abscessus* sono state documentate in diversi casi clinici. In una delle più importanti applicazioni, un cocktail di micobatteriofagi è stato somministrato a una paziente affetta da fibrosi cistica con infezione disseminata da *M. abscessus* a coinvolgimento polmonare e cutaneo dovuta al trapianto polmonare, refrattaria alle terapie convenzionali. Il cocktail era costituito da tre fagi selezionati per la loro attività litica verso il ceppo clinico del paziente, di cui uno naturale e due geneticamente ingegnerizzati, rendendoli adatti

all'impiego terapeutico. Il trattamento è stato ben tollerato e non ha indotto effetti avversi significativi né una neutralizzazione immunitaria rilevante e ha portato a una marcata regressione delle lesioni cutanee e a un miglioramento della funzione polmonare. Questo caso ha segnato la prima applicazione clinica di micobatteriofagi per uso terapeutico in un'infezione micobatterica umana (Dedrick *et al.* 2019). Una revisione successiva ha incluso 20 casi di terapia fagica compassionevole nelle infezioni causate da micobatteri non tubercolari mostrando che la maggior parte dei pazienti, soprattutto affetti da *M. abscessus*, ha ottenuto benefici clinici significativi, con riduzione della carica batterica e miglioramento dei sintomi, sempre in associazione alla terapia antibiotica (Dedrick, Abad, et al. 2023) (Dedrick, Smith, *et al.* 2023).

La terapia fagica offre diversi vantaggi rispetto agli antibiotici convenzionali. I fagi presentano un'elevata specificità per il batterio bersaglio, permettendone l'eliminazione selettiva senza alterare in modo significativo il microbiota dell'ospite (Opperman e Brink 2025). Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla loro capacità di autoreplicarsi in presenza dell'ospite batterico che può potenziarne l'efficacia terapeutica senza la necessità di somministrazioni continue. Inoltre, è stato osservato che lo sviluppo di resistenza ai fagi è meno frequente rispetto agli antibiotici e che ci sono casi in cui le mutazioni che conferiscono resistenza fagica possono comportare un aumento della sensibilità agli antibiotici (Dedrick, Abad, *et al.* 2023). La combinazione di fagi e antibiotici può produrre effetti sinergici e migliorare l'efficacia in terapia. Infine, a differenza degli antibiotici, i fagi possono adattarsi alle difese batteriche e mantenere la loro efficacia nel tempo.

1.7 Interazione tra fagi e sistema immunitario innato

In questo contesto, la comprensione dell'interazione tra i micobatteriofagi e il sistema immunitario dell'ospite rappresenta un aspetto fondamentale per la valutazione del reale potenziale terapeutico. È noto che i fagi siano in grado di interagire con il sistema immunitario dell'ospite ed essere internalizzati dalle cellule eucariotiche attraverso meccanismi di macropinosi non specifica e, in misura minore, di fagocitosi mediata da recettore (Bonacorsi *et al.* 2024). Questi meccanismi consentono l'ingresso di particelle di dimensioni compatibili con quelle dei virioni all'interno delle cellule. La fagocitosi è generalmente innescata dal riconoscimento di modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) da parte dei recettori di riconoscimento del pattern (PRR) espressi sulle cellule dell'ospite. Esempi di PAMP includono: lipopolisaccaride, beta-glucani e mannani. Tuttavia, ad oggi non sono ancora stati identificati PAMP associati ai fagi che possano interagire con i PRR di superficie delle cellule umane. È quindi probabile che l'ingresso dei fagi nelle cellule umane avvenga indirettamente, in seguito alla lisi delle cellule batteriche e all'interazione con i PAMP derivanti dai detriti batterici, innescando la fagocitosi, che può essere eventualmente facilitata da meccanismi di

opsonizzazione mediati da anticorpi e proteine del complemento (Miernikiewicz e Dąbrowska 2022 ; Mendoza-Trujillo *et al.* 2025). Una volta all'interno delle cellule umane, il comportamento dei fagi non è ancora completamente chiarito. Essi possono persistere all'interno di vescicole derivati dalla membrana plasmatica, in grado di fondersi tra loro o di interagire con compartimenti fagosomiali contenenti micobatteri, creando dei microambienti intracellulari complessi in cui avvengono interazioni fago-batterio-cellula umana (Mendoza-Trujillo *et al.* 2025). I batteriofagi non sono in grado di utilizzare le cellule eucariotiche come ospite per la propria replicazione; tuttavia, in presenza di batteri nei compartimenti intracellulari, possono replicarsi infettando il patogeno anche in ambiente intracellulare. L'efficacia dei fagi nei confronti dei micobatteri intracellulari dipende quindi dalla capacità dei virioni di raggiungere questi compartimenti, mantenendo la loro attività litica. Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che alcuni micobatteriofagi possano essere internalizzati dalle cellule dell'ospite e quindi contribuire alla riduzione della vitalità di *M. abscessus* localizzato nei macrofagi e nelle cellule epiteliali polmonari. Tali osservazioni sottolineano come l'accesso al compartimento intracellulare rappresenti un fattore estremamente cruciale per l'efficacia della terapia fagica (Broxmeyer *et al.* 2002).

1.7.1 Neutrofili e NETosi

L'attivazione dei macrofagi e la conseguente produzione di mediatori pro-infiammatori determinano il reclutamento e l'attivazione di altre cellule dell'immunità innata, in particolare i neutrofili, che costituiscono un elemento chiave nella risposta immunitaria contro *M. abscessus*. Essi rappresentano la prima linea di difesa dell'immunità innata e vengono rapidamente reclutati nel sito di infezione (Bernut *et al.* 2016). Nelle infezioni polmonari sostenute da NTMs, l'infiltrazione neutrofilica è osservata spesso ed è associata a uno stato infiammatorio persistente. I neutrofili contribuiscono al controllo dei patogeni attraverso diversi meccanismi, tra cui la fagocitosi, la produzione di ROS e il rilascio di enzimi antimicrobici (Sollberger *et al.* 2018 ; Malcolm *et al.* 2018). Tuttavia, uno dei meccanismi più peculiari dei neutrofili definito NETosi è il rilascio di Neutrophil Extracellular Traps (NETs), strutture extracellulari costituite da DNA e proteine granulari come l'elastasi neutrofila, e la mieloperossidasi, con attività antimicrobica (Brinkmann *et al.* 2004 ; Papayannopoulos *et al.* 2010). Questo processo agisce prevalentemente nello spazio extracellulare e risulta particolarmente efficace contro patogeni difficili da eliminare o presenti in aggregati (Melbouci *et al.* 2023). Tuttavia, non è un meccanismo privo di conseguenze; infatti, un'eccessiva produzione di NETs può causare danno tissutale e amplificare lo stato infiammatorio (Delgado-Rizo *et al.* 2017 ; Melbouci *et al.* 2023). In questo contesto, è importante distinguere diverse modalità di formazione delle NETs, aventi meccanismi cellulari e conseguenze funzionali differenti (Figura 9).

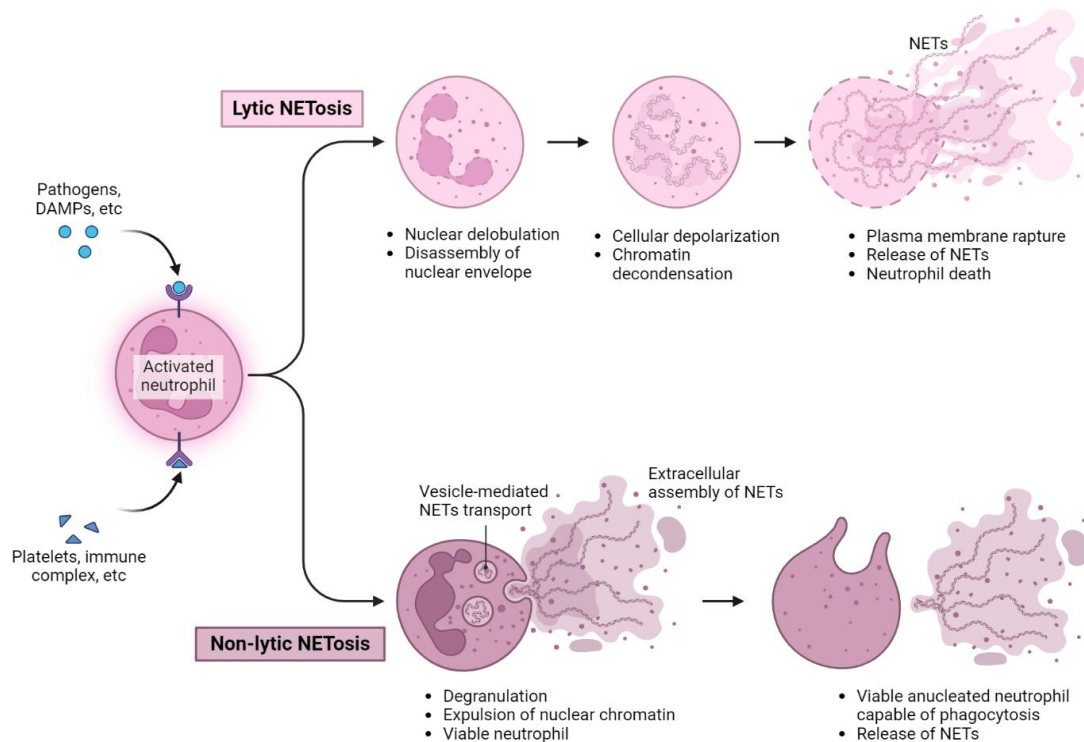


Figura 9: Rappresentazione schematica delle due principali modalità di formazione delle NETs da parte dei neutrofili: NETosi apoptotica e NETosi non apoptotica. L'immagine è stata realizzata con Biorender.

In particolare, la NETosi può avvenire attraverso due modalità:

1. una forma apoptotica, caratterizzata da: disgregazione dell'involucro nucleare, decondensazione della cromatina, rottura della membrana plasmatica e successiva morte del neutrofilo.
2. una forma non apoptotica, in cui l'estruzione delle NETs è causata da meccanismi che preservano però la vitalità cellulare (Delgado-Rizo *et al.* 2017; Melbouci *et al.* 2023).

Le due modalità differiscono per l'esito cellulare, i meccanismi molecolari e i tempi di attivazione: la prima forma è generalmente associata a stimoli infiammatori più intensi, mentre la seconda di solito è indotta dal contatto diretto con microrganismi. Questa distinzione è particolarmente rilevante nelle infezioni polmonari croniche sostenute da micobatteri non tubercolari come *M. abscessus*, nelle quali la persistente attivazione neutrofilica contribuisce enormemente al danno tissutale e al conseguente deterioramento della funzione respiratoria (Alkarni *et al.* 2023).

Nel contesto della terapia fagica, il ruolo primario dei batteriofagi consiste nell'eliminazione batterica. Tuttavia, alcuni studi indicano che i fagi e il sistema immunitario dell'ospite possono agire in modo sinergico nel controllo dell'infezione. Dunque, gli effetti osservati sulla risposta immunitaria potrebbero derivare dalla riduzione della carica batterica e da interazioni dirette tra fagi e cellule dell'immunità (Górski *et al.* 2017).

1.7.2 Modulazione citochinica

L'attivazione dei macrofagi e dei neutrofili nel corso delle infezioni è accompagnata da una significativa modulazione del profilo citochinico, che rappresenta un elemento fondamentale nel coordinamento tra l'immunità innata e adattativa (Górski *et al.* 2017). Le citochine prodotte nelle fasi iniziali dell'infezione hanno un ruolo cruciale nel contenimento del patogeno e nella regolazione dell'intensità e della durata della risposta infiammatoria. Nello specifico, la complessa interazione tra *M. abscessus* e le cellule immunitarie innate e adattive contribuisce alla formazione di un microambiente infiammatorio dinamico, in cui i meccanismi di difesa dell'ospite e le strategie di evasione batterica coesistono e determinano l'esito dell'infezione (Mendoza-Trujillo *et al.* 2025). In particolare, mediatori pro-infiammatori come il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) e l'interleuchina-6 (IL-6) sono essenziali per l'attivazione dei fagociti, il reclutamento delle cellule immunitarie e l'amplificazione della risposta innata, mentre l'Interferon-gamma (IFN- γ) è una citochina chiave per l'attivazione dei macrofagi. Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione ai fagi è in grado di alterare il profilo citochinico di macrofagi, cellule mononucleate del sangue periferico e altre cellule dell'immunità innata, inducendo variazioni nei livelli di IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ (Souza *et al.* 2023). Questi effetti possono essere attribuiti alla riduzione della carica batterica e a interazioni indirette tra i fagi e le cellule immunitarie. È importante sottolineare che la lisi batterica mediata dai fagi può portare anche all'esposizione di PAMPs, potenzialmente in grado di modulare ulteriormente la risposta infiammatoria dell'ospite. Dunque, l'impatto complessivo della terapia fagica sul profilo citochinico dipende dall'equilibrio tra il controllo dell'infezione e la stimolazione immunitaria. Nel contesto delle infezioni micobatteriche, la modulazione citochinica indotta dai micobatteriofagi potrebbe avere implicazioni rilevanti per l'equilibrio tra il controllo dell'infezione e il danno tissutale. Una riduzione dei livelli di citochine pro-infiammatorie può contribuire a limitare l'attivazione eccessiva di neutrofili, mentre il mantenimento di una risposta da parte dell'IFN- γ dipendente adeguata è essenziale per l'attivazione efficace dei macrofagi e l'eliminazione dei micobatteri intracellulari. Tuttavia, l'effetto immunomodulatorio dei fagi non è uniforme e può variare in funzione delle caratteristiche del singolo fago, della dose somministrata e dello stato del sistema immunitario (Cianci *et al.* 2025). Nel contesto terapeutico, soprattutto nelle infezioni da *M. abscessus*, è fondamentale che i fagi non inducano una stimolazione infiammatoria significativa, in quanto i pazienti presentano già uno stato di iperinfiammazione cronica; di conseguenza un'ulteriore attivazione immunitaria potrebbe peggiorare il danno tissutale. Inoltre, una forte stimolazione immunitaria può portare all'attivazione di un gran numero di linfociti B, i quali possono a loro volta produrre anticorpi neutralizzanti diretti contro i fagi. Questi anticorpi possono legarsi alle particelle fagiche, impedendone l'interazione con il batterio bersaglio.

2. SCOPO DEL LAVORO

La crescente diffusione delle infezioni sostenute dai micobatteri non tubercolari, in particolare *Mycobacterium abscessus*, e la loro resistenza intrinseca e acquisita a numerosi antibiotici rappresentano una sfida rilevante per la pratica clinica (Saxena *et al.* 2021). In questo contesto, la terapia fagica sta riemergendo come strategia alternativa o complementare agli approcci terapeutici convenzionali (Pirnay 2020). Nonostante il crescente interesse, si conosce ancora relativamente poco sull'interazione tra i batteriofagi e il sistema immunitario innato, un aspetto chiave per comprendere i meccanismi biologici alla base dell'efficacia e della sicurezza di questi approcci terapeutici (Kapoor *et al.* 2025). Inoltre, l'isolamento e la caratterizzazione di nuovi micobatteriofagi attivi contro ceppi di *M. abscessus* sono fondamentali per supportarne il potenziale impiego in terapia, considerando il loro ristretto spettro d'ospite (Druszczynska *et al.* 2025).

L'obiettivo generale di questa tesi è stato quello di contribuire allo studio di micobatteriofagi potenzialmente utilizzabili in ambito terapeutico contro *M. abscessus*, attraverso un'analisi di fagi già disponibili presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa e l'isolamento e la caratterizzazione di nuovi micobatteriofagi.

La prima parte di questo lavoro è stata dedicata all'isolamento e alla caratterizzazione genotipica e fenotipica di quattro nuovi micobatteriofagi; Amelia, John Lord, Kurisu e Okabe. Il fine ultimo di questa parte è stato ampliare la fagoteca del laboratorio e definire le principali caratteristiche biologiche dei micobatteriofagi di nuovo isolamento, fornendo basi utili per il loro potenziale impiego in terapia.

Gli obiettivi di questa sezione sono stati i seguenti:

- Isolare nuovi micobatteriofagi da campioni ambientali;
- Eseguire la caratterizzazione genotipica mediante l'estrazione del DNA virale, il sequenziamento, l'annotazione e l'analisi del genoma;
- Valutare lo spettro d'ospite e l'efficienza di piastratura su 28 ceppi clinici di *M. abscessus*;
- Studiare la stabilità dei fagi a diverse condizioni di temperatura e pH.

Nella seconda parte della tesi è stata completata la caratterizzazione fenotipica del micobatteriofago Pisa4, precedentemente isolato in laboratorio. Le precedenti analisi dello spettro d'ospite e dell'efficienza di piastratura (EOP) avevano evidenziato che il fago Pisa4 risultava attivo contro diversi ceppi clinici di *M. abscessus*; in alcuni casi era stata osservata anche la presenza di aloni di lisi, indicativi di un'attività litica non necessariamente associata a una replicazione fagica produttiva (Abedon 2011). Sulla base di queste osservazioni, sono stati approfonditi i meccanismi di interazione fago-batterio e l'interazione del fago con le cellule del sistema immunitario innato, analizzando il

rilascio di NET e la modulazione dell'espressione delle citochine IL-6, IFN- γ e TNF- α da parte di neutrofili e cellule mononucleate del sangue periferico.

In particolare, gli obiettivi sono stati:

- Distinguere l'infezione fagica produttiva dal fenomeno di "lysis from without" mediante saggi di infezione in terreno liquido;
- Selezionare, sulla base dei risultati ottenuti, dei ceppi clinici di *M. abscessus* per valutare l'attività battericida di Pisa4;
- Valutare l'impatto di Pisa4 sul processo di NETosi come indicatore dell'attivazione dei neutrofili;
- Analizzare la modulazione dell'espressione di alcune delle principali citochine indotta da Pisa4.

3. MATERIALI E METODI

3.2 Condizioni di crescita dei batteri

Il ceppo di *M. smegmatis* mc² 155, acquisito dall'American Type Culture Collection e 28 isolati clinici di *M. abscessus* (Tabella 1) sono stati coltivati e mantenuti in terreni Middlebrook 7H9 Broth e 7H10 Agar, preparati e integrati secondo protocolli consolidati per i micobatteri (Piuri et al. 2013).

Tabella 1. Elenco dei 28 isolati clinici di *M. abscessus* utilizzati in questo lavoro.

| ID ceppo | Centro di isolamento | Morfotipo |
|--------------------|----------------------|-----------|
| R2S | FPG | S |
| R2R | FPG | R |
| R3S1 | FPG | S |
| R3S2 | FPG | S |
| R3S3 | FPG | S |
| R4S1 | FPG | S |
| R4S2 | FPG | S |
| R5S | FPG | S |
| R5R | FPG | R |
| R6S | FPG | S |
| R6R | FPG | R |
| R7S | FPG | S |
| R7R | FPG | R |
| R8S1 | FPG | S |
| R8S2 | FPG | S |
| R9S1 | FPG | S |
| R9R1 | FPG | R |
| R9S2 | FPG | S |
| R9R2 | FPG | R |
| R9S3 | FPG | S |
| R9S4 | FPG | S |
| MABS R | AOUP | R |
| MABS L | AOUP | S |
| <i>M. ab.</i> AB S | ISMETT | S |
| <i>M. ab.</i> AB R | ISMETT | R |
| 3154 R | AOUP | R |
| 2792 S | AOUP | S |
| 2794 S | AOUP | S |

Note: Morfotipo: S: smooth (Liscio), R: rough (Rugoso). FPG: Fondazione Policlinico Gemelli (Roma), ISMETT: Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad alta specializzazione (Palermo), AOUP: Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Presidio di Cisanello (Pisa).

Il terreno Middlebrook 7H9 Broth (Liofilchem) è un terreno di coltura liquido costituito da composti inorganici, vitamine e cofattori che rappresentano fattori essenziali per la crescita microbica. Per la preparazione sono state seguite le indicazioni fornite dal produttore, la polvere di terreno è stata risospesa in acqua deionizzata e addizionata con glicerolo alla concentrazione finale di 2 mL/L. A seguito della sterilizzazione in autoclave a 121°C, una volta raggiunto il raffreddamento, la preparazione è stata integrata con il 10% di Albumin-Dextrose Complex (ADC). La preparazione dell'ADC prevede la sospensione di 50 g di Bovine Serum Albumin (BSA), 20 g di destrosio e 8,5 g di NaCl in 1 L di acqua deionizzata. Nello specifico, la BSA funge da fonte proteica supplementare e allo stesso tempo lega gli acidi grassi tossici che potrebbero inibire la crescita dei micobatteri; mentre, il destrosio, funge da fonte di carbonio (Lynn *et al.* 1979). La sterilizzazione è stata effettuata mediante filtrazione su membrana da 0.22 µm (Euroclone), garantendo l'eliminazione dei contaminanti batterici. La soluzione filtrata è stata quindi conservata a 4°C fino al momento dell'uso.

Il Middlebrook 7H10 Agar (Liofilchem) è un terreno di coltura solido costituito dalla stessa base del 7H9 Broth Base, con l'aggiunta di 1.5% di agar che ne permette la solidificazione. Tale formulazione fornisce il supporto necessario per lo sviluppo dei microrganismi e associato a tecniche di semina consente l'isolamento di colonie distinte. Per la preparazione, la polvere di terreno è stata risospesa seguendo le istruzioni del produttore e integrando con 5 mL/L di glicerolo. Al termine della sterilizzazione in autoclave e, una volta raffreddato, il terreno è stato supplementato con l'ADC al 10%. Infine, il terreno è stato colato in piastre Petri (Sampson *et al.* 2009).

Le colture batteriche sono state allestite partendo da stock in glicerolo al 20%, conservati a -80°C. Lo scongelamento è avvenuto rapidamente a temperatura ambiente, per prevenire lo stress termico. L'intera procedura è stata eseguita in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare. Per l'avvio delle colture primarie, sono stati inoculati 500 µL di sospensione batterica in 5 mL di terreno 7H9 completo, supplementato con Polisorbato 80 al 0,25% (Tween 80, Sigma) prima dell'autoclavaggio (Sampson *et al.* 2009). Questo agente tensioattivo non ionico riduce l'aggregazione e favorisce una crescita omogenea e riproducibile. Tali colture, sono state incubate in condizioni statiche a 37°C e periodicamente propagate in 7H9 con Tween 80 con una diluizione 1:10. *M. smegmatis* e *M. abscessus* sono stati propagati ogni settimana. Le colture secondarie impiegate per gli esperimenti sono state preparate a partire dalle colture primarie. L'allestimento è avvenuto in terreno 7H9 completo senza Tween 80, poiché può interferire con l'adsorbimento fagico (Piuri *et al.* 2013). (Piuri *et al.* 2013). Le colture sono state mantenute in incubazione a 37°C sotto agitazione costante su shaker orbitale (110 rpm). I tempi di incubazione sono stati differenziati in base alla specie e in relazione alla variabilità di crescita dei singoli ceppi. Nello specifico, per *M. smegmatis* mc² 155 è stata

sufficiente un'incubazione overnight, mentre per *M. abscessus* il periodo di incubazione è variato da 3 a 5 giorni per i ceppi a crescita più lenta. Gli stock sono stati preparati partendo da inoculi batterici freschi, sottoposti a verifica prima della conservazione. L'assenza di contaminanti è stata accertata mediante piastratura su Agar sangue permettendo di escludere la presenza di eventuali contaminanti che, grazie a tempi di duplicazione significativamente inferiori rispetto ai micobatteri, sono risultati facilmente identificabili su questo terreno non selettivo. 1 mL di inoculo batterico è stato trasferito in apposite criovials sterili (Sarstedt), preparate in duplicato. Successivamente, è stato aggiunto glicerolo sterile per ottenere una concentrazione finale al 20% (v/v). L'utilizzo del glicerolo come agente crioprotettore è risultato fondamentale per impedire la formazione di cristalli di acqua durante il congelamento. Tali cristalli, potrebbero causare danni irreversibili alle membrane cellulari, compromettendo la vitalità dei batteri durante lo scongelamento (Tedeschi e De Paoli 2011).

3.2 Preparazione del Phage Buffer

Il Phage buffer è stato utilizzato come preparato standard per la diluizione, l'isolamento e lo stoccaggio dei fagi. La preparazione è avvenuta seguendo il protocollo SEA-PHAGES (<https://discoveryguide.seaphages.org/>) miscelando:

- 10 mL di Tris-HCl 1 M a pH 7.5,
- 10 mL di MgSO₄ 1 M,
- 14 mL di NaCl 5 M,
- 100 µL di CaCl₂ 1 M.

A soluzione ultimata, il pH è stato aggiustato a 7.5 per garantire la stabilità virale; è stato utilizzato NaOH per correggere l'eventuale acidità e HCl per abbassare il valore. Infine, la soluzione è stata portata a volume finale di 1 L e sterilizzata mediante autoclavaggio a 121°C.

3.3 Preparazione dei tappeti batterici

L'allestimento di un tappeto batterico uniforme è fondamentale per la rilevazione dei fagi. Questo strato di crescita batterica rende visibile l'attività virale che si manifesta attraverso la formazione di placche di lisi, ovvero aree circolari di completa inibizione della crescita o chiarificazione del tappeto (Green e Sambrook 2012).

Per la preparazione dei tappeti è stato utilizzato il Soft Agar; per un volume finale di 360 mL sono stati risospesi 1.88 g di polvere di terreno Middlebrook 7H9 e 2 g di Agar in acqua deionizzata. In questa formulazione non è stato aggiunto glicerolo; il terreno è stato invece integrato con CaCl₂ ad una concentrazione finale di 1 mM per favorire l'adsorbimento fagico. Dopo la sterilizzazione in

autoclave a 121°C, il terreno è stato mantenuto in bagnetto termostatico a 50°C fino al momento dell'utilizzo, per evitarne la prematura solidificazione. Per la preparazione del tappeto, l'inoculo batterico privo di Tween 80 è stato omogeneizzato mediante vortex mixer. Il volume dell'inoculo batterico è stato standardizzato a seconda del ceppo batterico utilizzato, per ottenere un tappeto liscio e uniforme. Per *M. smegmatis* mc² 155, è stato utilizzato un volume di 500 µL. Per *M. abscessus*, la quantità di inoculo è stata calibrata in base alla morfologia coloniale; i ceppi lisci sono stati standardizzati a un volume pari a 500 µL, analogamente a *M. smegmatis* mc² 155. Diversamente, i ceppi rugosi hanno richiesto un volume di inoculo maggiore di 700 µL a causa della loro tendenza all'aggregazione. Al volume batterico, sono stati aggiunti 500 µL di ADC, utilizzato come supplemento nutritivo. Infine, è stato aggiunto il Soft Agar, in quantità sufficiente per raggiungere il volume totale di 5 mL per piastra. La sospensione è stata agitata e colata su piastre Petri contenenti 7H10. Le piastre sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente fino alla completa solidificazione (Hatfull *et al.* 2016).

3.4 Isolamento dei fagi

In questo studio sono stati impiegati cinque fagi: Amelia, John Lord, Okabe, Kurisu e Pisa4. Il fago Pisa4, precedentemente isolato e caratterizzato, è stato selezionato per i test di modulazione della risposta immunitaria umana in quanto già impiegato in un modello d'infezione intracellulare. Gli altri quattro fagi sono stati invece isolati e caratterizzati *ex novo*. Nello specifico, i fagi Amelia, John Lord e Okabe sono stati isolati da campioni di suolo, mentre il fago Kurisu è stato isolato da acque reflue. Per il loro isolamento e propagazione è stato utilizzato *M. smegmatis* mc² 155 come ospite.

Il processo di isolamento è stato svolto seguendo un protocollo standard di eluizione, arricchimento, filtrazione e verifica con spot assay, apportando specifiche modifiche (Nayak *et al.* 2023).

Per i campioni di suolo, sono stati pesati 5 g di matrice, risospesi in 10 mL di Phage buffer. La sospensione è stata posta su un agitatore per 3 ore a temperatura ambiente, per favorire il distacco delle particelle virali dal sedimento. Il surnatante è stato quindi raccolto, centrifugato per 20 minuti e filtrato (0.22 µm) per eliminare detriti e contaminanti. È seguita una fase di arricchimento, volta a favorire la replicazione fagica; 10 mL di filtrato sono stati mescolati a 10 mL di terreno 7H9 Broth concentrato 2x e a 500 µL di una coltura secondaria di *M. smegmatis* mc² 155. Il preparato è stato incubato overnight a 37°C, in agitazione. Il giorno successivo, la coltura di arricchimento è stata centrifugata e filtrata (0.22 µm). Le piastre sono state incubate come in precedenza ed esaminate a occhio nudo. Le placche singole di differenti morfologie sono state prelevate utilizzando una punta sterile, poi trasferite su tappeto batterico fresco. Per ottenere placche isolate sulla nuova piastra, i fagi

sono stati diluiti usando strisce di carta sterile, in seguito le piastre sono state nuovamente incubate. La procedura di isolamento è stata ripetuta fino a quando non sono state ottenute solo placche della stessa morfologia. Ottenuta una piastra pura, sono stati aggiunti 5 mL di Phage buffer e le piastre sono state incubate overnight a 4°C, in agitazione. Il giorno successivo, il Phage buffer è stato raccolto, centrifugato e filtrato per ottenere lo stock, infine diluito e piastrato per la titolazione finale.

3.5 Titolazione dei fagi

La titolazione fagica è stata impiegata per quantificare le particelle virali infettive presenti nel campione, esprimendo il titolo come Unità Formanti Placca per mL (PFU/mL).

I fagi sono stati diluiti serialmente in base 10 utilizzando il Phage buffer come diluente. In seguito, 10 µL di ciascuna diluizione sono stati depositati a gocce sulla superficie del tappeto batterico di *M. smegmatis* precedentemente allestito, secondo la tecnica dello spot assay. Le piastre sono state lasciate asciugare sotto cappa a flusso laminare e poi incubate overnight a 37°C. Il giorno successivo, sono state identificate le diluizioni con placche di lisi ben distinte, poi contate per determinare il titolo fagico, secondo la seguente equazione:

$$\text{PFU/mL} = \frac{n \times \text{DF}}{V}$$

n: numero di unità formanti placca (Plaque Forming Units, PFU)

DF: fattore di diluizione, corrispondente all'inverso della diluizione alla quale sono state contate le placche

V: volume del campione di batteriofago (mL)

3.6 Amplificazione dei fagi

Questo processo è stato necessario per produrre stock ad alto titolo, fondamentali per i successivi esperimenti, ed è stato condotto attraverso protocolli in fase liquida e in fase solida, selezionando il metodo più idoneo in base alla coppia fago-batterio.

Per l'amplificazione in fase liquida, sono stati utilizzati volumi compresi tra 20 e 30 mL di terreno Middlebrook 7H9. A questo volume, è stato aggiunto l'inoculo batterico overnight fino a raggiungere una densità cellulare ottimale per l'infezione. Successivamente, è stata aggiunta la sospensione fagica rispettando una Molteplicità d'Infezione (MOI) di 0.1. Questo parametro indica il rapporto tra il numero di particelle virali e il numero di cellule ospiti, garantendo in questo caso che in media solo un batterio su dieci venga infettato. Dopo l'incubazione overnight a 37°C, la coltura è stata

centrifugata a 5000 x g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato quindi filtrato mediante filtri da 0.22 µm, titolato e conservato a 4°C. Per l'amplificazione in solido, il tappeto batterico è stato preparato mescolando 500 µL di ADC e di inoculo batterico, 100 µL di fagi e 4 mL di Soft Agar versando un volume finale di 5 mL in piastra. Il titolo della sospensione fagica utilizzata è stato differenziato per ogni coppia fago-batterio, al fine di garantire una lisi ottimale per il recupero dei virioni. In seguito all'incubazione overnight a 37°C, sono stati aggiunti 5-8 mL di Phage buffer per eluizione. Successivamente, le piastre sono state incubate overnight a 25°C in agitazione. Il giorno successivo, il Phage buffer contenente i fagi rilasciati è stato recuperato, centrifugato, filtrato e titolato. Per l'amplificazione in solido di grandi volumi, sono state utilizzate fiasche (T75, Euroclone) al posto delle piastre adattando i precedenti volumi. Sono stati utilizzati 2.5 mL di ADC e di inoculo batterico, 300 µL di fagi e 20 mL di Soft Agar. Dopo l'incubazione, l'eluizione è stata eseguita con 20 mL di Phage buffer, mantenendo la fiasca in agitazione non orbitale overnight. I passaggi restanti del protocollo sono stati eseguiti come descritto sopra.

3.7 Purificazione con Cloruro di Cesio (CsCl)

Per concentrare e purificare i fagi, i lisati sono stati sottoposti a ultracentrifugazione in gradiente di densità di CsCl, seguendo il protocollo descritto da Fausti e colleghi (Fausti *et al.* 2025). Tale procedura ha consentito la rimozione dei detriti cellulari e degli antigeni della parete batterica che potrebbero indurre risposte immunitarie aspecifiche nei successivi test. Le diverse soluzioni di CsCl usate per creare il gradiente sono state allestite sciogliendo una quantità di cesio cloruro in acqua secondo le indicazioni riportate nella Tabella 2.

Tabella 2. Proprietà chimico-fisiche delle soluzioni di CsCl

| d (g/mL) | CsCl (g/mL) |
|-----------------|--------------------|
| 1.20 | 0.275 |
| 1.25 | 0.342 |
| 1.30 | 0.410 |
| 1.40 | 0.546 |
| 1.45 | 0.614 |
| 1.50 | 0.683 |
| 1.60 | 0.820 |
| 1.70 | 0.959 |

La procedura è stata svolta in due giornate; inizialmente è stato sciolto gradualmente CsCl solido (0.5 g/mL) nel campione di lisato fagico, per evitare shock osmotici. Il gradiente a fasi è stato preparato utilizzando provette per ultracentrifuga tipo Thinwall Polyallomer (Beckman Coulter).

Per ogni frazione di densità, partendo dalla meno densa (1.20 g/mL) fino ad arrivare alla più densa (1.70 g/mL), sono stati stratificati circa 1.5 mL di ciascuna soluzione di CsCl. Il caricamento delle soluzioni è avvenuto con l'ausilio di una siringa avente un ago a cannula lungo, inserito in fondo alla provetta per aggiungere ogni strato al di sotto del precedente, senza compromettere le interfacce. Dopo aver completato il gradiente, la sospensione fagica è stata stratificata sulla sommità dello stesso. Le provette sono state equilibrate e sottoposte a ultracentrifugazione a 29.600 rpm per 24 ore a 4°C, usando un rotore SW41 Ti (Beckman Coulter). Al fine di preservare l'integrità del gradiente, la corsa è stata impostata con accelerazione "SLOW" e decelerazione "no BRAKE". Trascorse 24 ore, le particelle fagiche hanno formato una banda di colore bianco e blu sotto illuminazione, tra le densità 1.45 e 1.5 g/mL. Tale banda corrisponde alla frazione contenente i fagi integri.

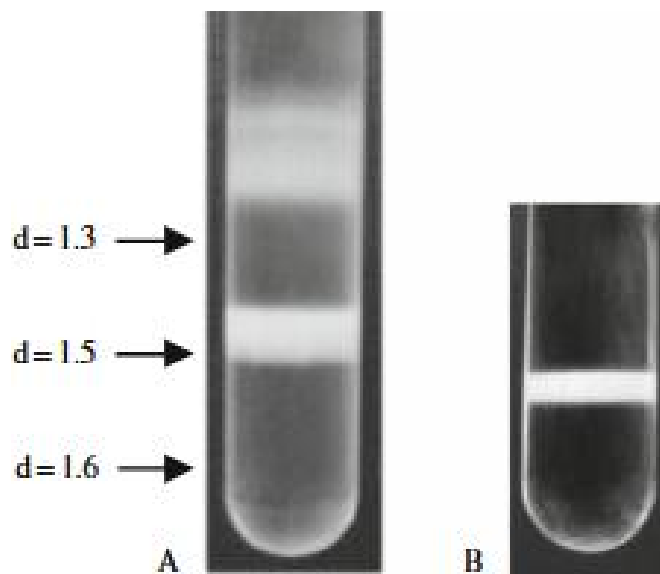


Figura 10: Rappresentazione del gradiente a fasi (A) e formazione della banda opalescente contenente le particelle virali addensate all'interfaccia tra gli strati di differente densità (B) (Boulanger 2009).

Per il recupero, la provetta è stata forata lateralmente con un ago ipodermico da 21 gauge e una siringa da 2.5 mL. Per individuare con precisione il punto di inserimento dell'ago il tubo è stato illuminato dall'alto utilizzando uno sfondo nero per evidenziare il contrasto. La sospensione è stata poi sottoposta a due cicli di dialisi a 4°C, rimuovendo così il CsCl residuo. Sono state utilizzate membrane tubulari con Molecular Weight Cut-Off (MWCO) di 10 kDa (Thermo Fisher). Le estremità delle membrane sono state sigillate utilizzando apposite clip e il sistema è stato mantenuto sfruttando un supporto galleggiante. La procedura di dialisi ha previsto due step ed è stata eseguita sotto costante

leggera agitazione, favorendo la diluizione del CsCl. La prima sessione è durata 4 ore, in un becher contenente 1.5 L di Phage buffer, mentre la seconda sessione è stata condotta overnight in egual volume di Phage buffer fresco. La procedura di dialisi è stata condotta in un ambiente non sterile, per questo motivo al termine del processo il fago è stato filtrato utilizzando filtri da 0.22 µm da centrifuga (Millipore). Gli stock purificati ottenuti sono stati titolati e conservati a 4°C.

3.8 Estrazione del DNA virale

L'estrazione del DNA è stata eseguita a partire da lisato fagico ad alto titolo, seguendo il protocollo del Graham Hatfull Lab (PhagesDB). La metodica integra i principi di purificazione chimica descritti da Green e colleghi (Green e Sambrook 2012) e si basa su un trattamento enzimatico e separazione con fenolo, cloroformio e alcol isoamilico, con successiva precipitazione alcolica, per ottenere DNA puro e ad alta concentrazione. Per ciascun campione, è stato trasferito 1 mL di lisato in una provetta da 1.5 mL, addizionato con 12.5 µL di MgCl₂ 1 M. Dopo aver miscelato delicatamente, per degradare gli acidi nucleici liberi e l'RNA, sono stati addizionati 40 µL di DNasi I (2000 U/mL, Fisher Scientific) e 1 µL di RNasi A (100 mg/mL, Sigma-Aldrich). Il campione è stato vortexato, poi incubato a temperatura ambiente per circa 30 minuti. Per avviare la digestione proteica, i reagenti sono stati aggiunti seguendo un ordine preciso, fondamentale per proteggere il genoma virale. L'EDTA 0.5 M (40 µL) è stato aggiunto per primo, per chelare gli ioni Mg²⁺ e inattivare la DNasi I. Dopo l'inattivazione della nucleasi, sono stati aggiunti 50 µL di Proteinasi K (10 mg/mL, Fisher Scientific) e 50 µL di SDS al 10%. L'SDS denatura le proteine strutturali del capsido e le rende accessibili all'azione proteolitica della Proteinasi K (Green e Sambrook 2012). A questo punto, il campione è stato miscelato e incubato a 55 °C per 60 minuti. Per favorire l'azione dei reagenti la soluzione è stata rimescolata energeticamente a intervalli di 20 minuti. La fase di estrazione chimica è stata eseguita sotto cappa chimica. La soluzione è stata distribuita in due provette da ultracentrifuga da 1.5 mL (500 µL ciascuna) e addizionata con lo stesso volume (500 µL) di Phenol, Chloroform, Isoamyl alcohol (PCI) (25:24:1). Le provette sono state capovolte ripetutamente per ottenere un'emulsione omogenea e centrifugate a 13.000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, per favorire la separazione delle diverse fasi (Figura 2).

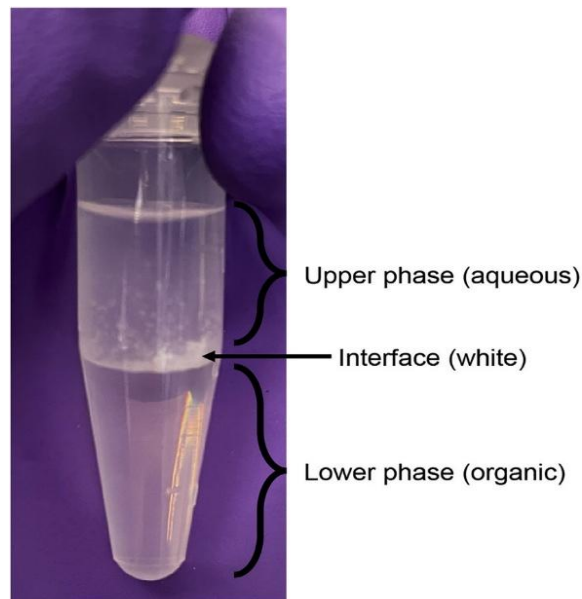


Figura 11: È possibile osservare la fase acquosa superiore contenente il DNA, l'interfase proteica di colore bianco (nel mezzo) e la fase organica inferiore (Whetstine e Van Rechem 2022).

La fase acquosa è stata recuperata senza prelevare l'interfaccia proteica/fase organica. Nel caso di lisati ad alto titolo ($>10^9$ PFU/mL), sono stati ripetuti i precedenti passaggi fino alla scomparsa dell'interfase proteica, lasciando una zona tampone nell'ultimo passaggio per evitare contaminazioni. Per promuovere la precipitazione del DNA, sono stati aggiunti 1 mL di etanolo 95% e 50 μ L di acetato di sodio 3 M. I campioni sono stati tenuti in ghiaccio per 5 minuti, miscelando fino ad ottenere un precipitato di DNA simile ad una "cotton ball". Per consolidare la precipitazione, è stata eseguita la centrifugazione a 13.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. A questo punto, il sovrantante è stato decantato e il pellet è stato lavato aggiungendo 500 μ L di etanolo 70% per rimuovere i residui dei sali e di fenolo-cloroformio. È stata eseguita un'ulteriore centrifugazione a 13.000 rpm per 10 minuti e il pellet è stato lasciato asciugare all'aria per 10-20 minuti, evitando un'essiccazione eccessiva che ne avrebbe reso difficile la dissoluzione. Il DNA è stato risospeso in 50 μ L di acqua distillata e incubato per 10 minuti a 37°C per favorirne la completa solubilizzazione. Per valutare la resa e la purezza del DNA, è stata inizialmente utilizzata la spettrofotometria su NanoDrop, monitorando i rapporti di assorbanza 260/280 per escludere contaminazioni proteiche. In caso di contaminazione da fenolo (riduzione del rapporto A260/230 e alterazioni dello spettro), la procedura di lavaggio è stata ripetuta per rimuovere il fenolo residuo, poi è stata eseguita una nuova centrifugazione e successivo recupero. Successivamente, per ottenere una quantificazione più accurata per il DNA a doppio filamento (dsDNA), è stata eseguita una misurazione fluorimetrica tramite Qubit (Thermo Fisher Scientific). Infine, i campioni sono stati mantenuti a 4°C se utilizzati nel breve periodo e a -20°C per una conservazione a lungo termine.

3.9 Caratterizzazione genotipica

Il DNA fagico estratto è stato sottoposto a sequenziamento mediante tecnologia Illumina, utilizzando il kit di preparazione delle librerie Illumina DNA prep. Questa tecnologia si basa sulla generazione di frammenti di DNA (reads) di dimensioni tipicamente pari a circa 150 nucleotidi, che vengono poi riassemblate nella fase di analisi bioinformatica. A partire dalle reads, è stata eseguita la ricostruzione del genoma utilizzando la piattaforma BV-BRC (versione 3.55.17), che integra strumenti avanzati di bioinformatica per l'analisi dei dati genomici batterici e virali (Olson *et al.* 2023). Le sequenze sono state caricate in modalità paired-end sequenziando ogni frammento di DNA da entrambe le estremità, generando due file di dati definiti R1 (Forward read) e R2 (Reverse read). L'utilizzo di reads paired-end consente la risoluzione di eventuali regioni ripetitive del genoma, garantendo una ricostruzione accurata della sequenza circolare. Per l'assemblaggio è stato usato Unicycler (versione 0.5.0), usato principalmente per genomi circolari come quelli dei fagi. Permette anche la rimozione di eventuali sequenze non appartenenti al genoma fagico (Wick *et al.* 2017). Il controllo di qualità dell'assemblaggio è stato effettuato analizzando diversi parametri: la copertura (coverage), la profondità della sequenza, la lunghezza media delle reads e la lunghezza dei contigs, se ce ne sono più di uno. L'obiettivo dell'assemblaggio è ottenere una sequenza circolare completa ad anello, associata ad un file di testo che contiene la successione delle basi azotate (file FASTA). Poiché in un genoma circolare non esistono veri punti di inizio o fine biologica, la sequenza FASTA è stata riorientata manualmente selezionando un punto di inizio convenzionale. Questo punto è stato stabilito attraverso la subunità grande della terminasi (TerL), che consente di determinare la strategia di impacchettamento del DNA fagico. Successivamente, è stata caricata la sequenza riorganizzata sul database BLASTn per confrontarla con i database pubblici e cercare le sequenze più simili. Dopo aver ottenuto una lunga lista di fagi simili, con punteggi basati su coverage e percentuale di identità, è stato ordinato per total score, questo valore ha consentito di classificare i fagi come nuova specie, nuovo genere o specie già nota. Nello specifico, applicando i cut-off standard: identità > 95% (per specie note), identità compresa tra 70-95% (per nuove specie dello stesso genere) e identità < 70% per i nuovi generi (Turner *et al.* 2021). L'annotazione delle sequenze codificanti (CDS) è stata eseguita inizialmente in modalità automatica sulla piattaforma BV-BRC, utilizzando lo strumento RASTtk (Olson *et al.* 2023). Per rifinire manualmente le annotazioni è stato eseguito il confronto delle CDS predette contro il database non-ridondante di GenBank, utilizzando BLASTp. Per ogni gene sono stati analizzati gli open reading frames (ORF), inoltre sono stati verificati i siti di inizio e di fine (start/stop codons). A questo punto, i file GenBank sono stati rifiniti graficamente utilizzando i software Unipro UGENE v52.1 (Okonechnikov *et al.* 2012) e Artemis v18.0 (Carver *et al.* 2012). Per nominare le CDS è stato seguito l'identificativo del fago seguito da una numerazione progressiva,

assegnando quindi ad ognuna una funzione biologica basata sull'omologia proteica. Il software Easyfig (versione 2.2.5) ha consentito il confronto dei file GenBank rifiniti, con i genomi fagici scelti come riferimento. In questo modo, sono state generate immagini rappresentative dei genomi nelle quali sono presenti frecce che indicano i diversi geni, classificati e colorati in base alla propria categoria funzionale (Sullivan *et al.* 2011). Al fine di valutare l'assenza di geni potenzialmente dannosi, è stata eseguita l'analisi di tossine, geni di virulenza e fattori di resistenza agli antibiotici. L'analisi è stata svolta utilizzando la piattaforma Galaxy, con il tool ABRICate (versione 1.0.1). Per escludere la presenza di sequenze codificanti pericolose per l'utilizzo dei fagi per applicazioni terapeutiche, i genomi sono stati confrontati con database di riferimento; sono stati usati: Virulence Factor Database (VFDB), ResFinder, Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD). Tale analisi ha permesso di confermare la sicurezza degli isolati per un potenziale uso clinico (Yukgehaish *et al.* 2022).

3.10 Caratterizzazione fenotipica

I fagi isolati sono stati caratterizzati fenotipicamente, per valutarne la tolleranza agli stress ambientali e per studiarne l'attività litica. Nello specifico, sono stati condotti saggi di stabilità termica, saggi di stabilità al pH e studi per determinare la capacità dei fagi di infettare gli isolati clinici di *M. abscessus*.

3.10.1 Saggi di stabilità alla temperatura

Tutti i fagi sono stati diluiti in Phage Buffer fino a raggiungere un titolo finale pari a 10^8 PFU/mL. Partendo da queste soluzioni, sono state prelevate aliquote di 1 mL, poi trasferite in tubi da 1.5 mL (Eppendorf) e incubate per un'ora. È stata valutata la capacità dei fagi di mantenere l'attività litica a sette temperature: 4°C, 15°C, 25°C, 37°C, 45°C, 55°C e 65°C. Terminata l'incubazione, i campioni sono stati diluiti serialmente in Phage buffer e titolati con spot assay su tappeti di *M. smegmatis* mc² 155. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore; il giorno successivo sono state conteggiate le placche di lisi formatesi (Nayak *et al.* 2023). Tutti i saggi sono stati condotti in triplicato biologico.

3.10.2 Saggi di stabilità al pH

Gli isolati fagici sono stati diluiti 1:10 in Phage buffer, aggiustato a differenti valori di pH da 1 a 12 (titolo fagico finale pari a 10^8 PFU/mL) ed incubati a temperatura ambiente per un'ora. Terminata l'incubazione, i campioni sono stati diluiti serialmente e titolati come descritto per il saggio precedente. Il saggio è stato condotto in triplicato biologico (Sinha *et al.* 2020).

3.11 Host range and Efficiency Of Plating (EOP)

Per valutare la capacità dei fagi di infettare e lisare i 28 isolati clinici di *M. abscessus* (Tabella 1), sono stati analizzati lo spettro d'ospite e l'efficienza di piastramento. I fagi sono stati diluiti serialmente, poi è stato eseguito lo spot assay. Per il calcolo dell'EOP, è stato diviso il numero di placche ottenute sul ceppo batterico del test per il numero di placche ottenute sul ceppo ospite di riferimento, *M. smegmatis* mc² 155, sfruttando la seguente formula:

$$EOP = \frac{\text{PFU/mL ceppo testato}}{\text{PFU/mL ceppo ospite}}$$

Il valore di EOP indica l'efficienza di piastramento relativa; indica quindi quanto il fago sia in grado di replicarsi sull'ospite testato rispetto al ceppo di riferimento. Un valore di EOP maggiore di 1 indica che l'efficienza sull'isolato clinico è maggiore rispetto al ceppo di riferimento; un valore pari a 1 indica che il fago infetta l'isolato clinico con la stessa efficienza di *M. smegmatis* mc² 155. Valori di EOP compresi tra 0 e 1 indicano invece un'efficienza ridotta. Infine, un valore di EOP uguale a 0 indica che il batterio è resistente e che non è stato infettato (Dedrick *et al.* 2019). In alcuni casi, sono stati rilevati aloni di lisi in corrispondenza delle zone a maggiore concentrazione di sospensione fagica, senza tuttavia riscontrare la presenza di placche singole nelle diluizioni seriali successive. Poiché in laboratorio era stato precedentemente osservato che la presenza di un alone non esclude necessariamente la capacità del fago di replicarsi, è stato condotto un test di infezioni in terreno liquido per poter distinguere la vera replicazione virale dal fenomeno di lysis from without. In questo fenomeno, l'elevata densità di fagi determina la morte batterica, senza che avvenga un ciclo replicativo virale (Abedon 2011). A questo punto, sono stati allestiti tubi contenenti 4.5 mL di terreno Middlebrook 7H9 addizionato con ADC. In ogni Falcon, sono stati aggiunti 500 µL di inoculo batterico. Infine, sono stati aggiunti 50 µL di fagi per ottenere una MOI di 0.1. A questo punto, i campioni sono stati sottoposti ad agitazione (110 rpm) a 37°C per 24 ore. Terminata l'incubazione, le colture sono state recuperate e centrifugate per 10 minuti per separare i fagi da detriti cellulari e batterici. A questo punto, i supernatanti sono stati raccolti e titolati mediante spot assay dopo diluizioni seriali in Phage buffer. È stato determinato il titolo fagico al tempo 0 (t₀), prelevando un'aliquota immediatamente dopo l'aggiunta del fago all'inoculo batterico e al tempo 24 ore (t₂₄), prelevando un'aliquota al termine dell'incubazione. Per ciascun tempo, le diluizioni sono state spottate e le piastre sono state incubate fino alla comparsa delle placche; il titolo (PFU/mL) è stato

quindi calcolato e confrontato tra t0 e t24. Un aumento significativo del titolo ($\leq 1 \text{ Log}_{10}$) a t24 rispetto a t0 è stato interpretato come evidenza di replicazione virale, mentre l'assenza di incremento è risultata compatibile con fenomeni di lisi non produttiva (Fausti *et al.* 2025).

3.12 Cinetica di lisi

Per valutare l'attività del fago Pisa4, sono stati condotti saggi di cinetica di lisi utilizzando i ceppi di *M. abscessus* R2R e R2S. Inizialmente, i ceppi sono stati inoculati e fatti crescere per raggiungere la fase esponenziale per circa 48 ore. Successivamente, sono stati sottoposti ad un processo di disaggregazione, mediante agitazione su vortex per 15 minuti con biglie di vetro lisce (diametro di circa 4 mm). Questo passaggio è stato eseguito per ottenere una sospensione batterica omogenea e prevenire interferenze nella misurazione della densità ottica dovute alla naturale aggregazione dei micobatteri. La sospensione batterica è stata lasciata sedimentare per 30 minuti, terminata l'incubazione sono stati recuperati 5 mL di surnatante mantenendosi in prossimità della superficie per non recuperare eventuali aggregati residui. La densità ottica (OD) è stata quindi misurata mediante uno spettrofotometro a 600 nm. La coltura è stata diluita con terreno 7H9 completo per raggiungere un valore di OD₆₀₀ pari a 0.4, che corrispondeva a una carica batterica di circa 2.5×10^7 CFU/mL per il ceppo R2R e 3×10^8 CFU/mL per il ceppo R2S. Le sospensioni sono state ulteriormente diluite per ottenere una concentrazione finale di circa 5×10^5 CFU/mL. L'esperimento è stato allestito aggiungendo il fago Pisa4 a differenti MOI (0.1, 1, 10), mantenendo una coltura di soli batteri come controllo di crescita. I campioni sono stati incubati a 37°C, in agitazione su shaker. Ad intervalli di 0, 3, 6, 24, 48, e 72 ore è stato prelevato 1 mL da ciascuna condizione. Per prevenire l'infezione dei batteri, i campioni sono stati centrifugati, il surnatante è stato scartato e il pellet è stato risospeso in Phage Inactivation Buffer (PIB: 40 mM acido citrico, 10 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 3) (Schmalstig *et al.* 2024). Il PIB garantisce l'inattivazione dei virioni liberi e di quelli che non hanno ancora completato l'iniezione del materiale genetico all'interno dell'ospite. Il buffer è stato integrato con Tween 80 (0.05%) per prevenire l'aggregazione batterica. Infine, i campioni sono stati diluiti in PBS-Tween 80 e piastrati su terreno 7H10. A questo punto, le piastre sono state incubate per 3-4 giorni a 37°C, per la determinazione della carica batterica residua espressa in CFU/mL.

3.13 NETosi

I neutrofilii sono stati purificati a partire da sangue periferico di donatori sani mediante centrifugazione su doppio gradiente di densità utilizzando Histopaque-1119 e Histopaque-1077 (Merck), in accordo con le procedure standard. Il sangue è stato diluito in rapporto 1:1 in PBS, stratificato sui gradienti e centrifugato a 500 giri per 40 minuti a 22°C. La centrifuga è stata impostata

con decelerazione minima (senza freno), preservando l'integrità dei gradienti e garantendo la separazione netta delle popolazioni cellulari. Al termine della corsa, sono stati distinti, partendo dal basso verso l'alto: eritrociti, neutrofilo, cellule mononucleate del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) e siero. La frazione di interesse è stata raccolta in una nuova provetta, lavata in PBS e centrifugata a 300 x g per 8 minuti a 20°C, permettendo la formazione del pellet cellulare. I neutrofilo, essendo in prossimità degli eritrociti, sono stati sottoposti ad eritrolisi per rimuovere eventuali contaminazioni eritrocitarie attraverso l'utilizzo di una soluzione ipotonica (Erythrolysis buffer, costituita da NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM), incubando a 4°C per 10 minuti. Il processo di eritrolisi è stato ripetuto (≥ 2) per ottenere un pellet cellulare bianco e privo di tracce rosse dovute alla presenza di eritrociti. I neutrofilo sono quindi stati sottoposti a due lavaggi in PBS, intervallati da centrifugazioni (300 x g per 8 minuti a 20°C). Infine, il pellet è stato risospeso in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Merck), una soluzione salina bilanciata utilizzata per mantenere il pH e la vitalità cellulare durante il saggio (Kapoor *et al.* 2025). Per valutare la vitalità cellulare e procedere con il conteggio, è stata utilizzata la camera di Burker dopo aver colorato il campione con Trypan Blue. Questo colorante penetra esclusivamente nelle cellule non vitali a causa della perdita di integrità della loro membrana, permettendo di distinguerle per contrasto cromatico dalle cellule vive. I polimorfonucleati (PMN) sono stati seminati alla densità di 1×10^5 cellule/pozzetto in un volume finale di 200 μ L di HBSS, su vetrini circolari sterili da 13 mm. Quest'ultimi sono stati posizionati sul fondo di una piastra da 24 pozzetti, utilizzando pinzette sterili. A questo punto, la piastra è stata incubata per un'ora a 37°C in incubatore con 5% CO₂ per consentire la precipitazione e adesione dei neutrofilo al vetrino. Terminata la fase di adesione, i neutrofilo sono stati sottoposti a diversi stimoli per 4 ore a 37°C in incubatore con 5% CO₂. Per valutare i livelli di NETosi basale, è stato incluso un controllo negativo con le cellule mantenute in HBSS addizionato con CaCl₂ 2 mM. Per il trattamento sperimentale, una concentrazione di PMA è stato somministrato ad una concentrazione pari a 10^3 PFU/neutrofilo in HBSS e CaCl₂ 2 mM. Infine, è stato incluso un controllo positivo stimolando i neutrofilo con Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) alla concentrazione finale di 100 nM. Il PMA, infatti, è un noto induttore di NETosi ed è comunemente usato come controllo positivo negli studi sulla NETosi (Urban *et al.* 2009). Terminata l'incubazione, i PMN sono stati lavati e fissati in PBS con paraformaldeide (PFA) al 4% per 10 minuti e poi conservati a 4°C in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) fino all'analisi di immunofluorescenza. Per visualizzare le NET, le cellule fissate sono state sottoposte per un'ora a una fase di blocco, utilizzando una soluzione di PBS pH 7.4 contenente BSA all'1% e siero normale di capra (Normal Goat Serum, NGS) al 2.5%. Successivamente, i campioni sono stati incubati con un anticorpo primario policlonale di coniglio anti-mieloperossidasi (MPO, Dako) diluito 1:300 nello

stesso buffer di blocco. Dopo tre lavaggi in PBS per rimuovere l'eccesso di anticorpo, le cellule sono state incubate per 1 ora con un anticorpo secondario Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher), diluito 1:300 nello stesso buffer. L'inclusione del siero normale di capra nel buffer di blocco e di diluizione ha permesso di ridurre il legame aspecifico dell'anticorpo secondario. Sono stati effettuati altri tre lavaggi con PBS, poi sono stati marcati i nuclei (counterstaining) con un'incubazione di 15 minuti con DAPI (Thermo Fisher), diluito 1:2000 in PBS. Infine, i vetrini sono stati lavati, montati in glicerolo e conservati in frigorifero a 4°C fino al momento dell'analisi. Per l'osservazione microscopica, è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza Olympus BX-41, con ingrandimenti a 20x. Per ogni campione sono stati analizzati cinque campi scelti casualmente, garantendo così la rappresentatività dei dati ottenuti. Per quantificare la NETosi è stata eseguito il rapporto tra il numero di cellule doppie positive marcate nello stesso momento per DNA e MPO e il numero totale di nuclei identificati tramite DAPI.

3.14 Analisi della produzione di citochine

A partire dai campioni di sangue impiegati per la valutazione della NETosi sono state prelevate anche le cellule Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), isolate contestualmente ai neutrofili tramite la stessa centrifugazione su gradiente di densità, lavate due volte in D-PBS e poi risospese in terreno Roswell Park Memorial Institute (RPMI) con Fetal Bovine Serum (FBS) al 10%. Le PBMC sono state infine seminate in piastre da 96 pozzetti, in triplicato per ogni condizione sperimentale.

Le cellule sono state sottoposte a diverse condizioni di stimolazione:

- un controllo negativo con cellule non trattate;
- un controllo con cellule esposte al Phage buffer, per escludere eventuali interferenze del tampone sul profilo citochinico;
- un controllo positivo con *M. smegmatis* mc² 155, per valutare l'induzione della risposta immunitaria;
- un trattamento in cui le PBMC sono state esposte a tre diverse concentrazioni di Pisa4 ad una concentrazione di 10³, 10² e 10¹ PFU/cellula, per valutare se il fago inducesse un'alterazione del profilo citochinico delle PBMC.

L'incubazione è avvenuta a 37°C, con 5% di CO₂ per 48 ore. Al termine dell'incubazione, il contenuto di ogni pozzetto della multiwell a fondo piatto è stato prelevato e trasferito in una multiwell round (con fondo a U). L'utilizzo della multiwell round è stato dettato dalla necessità di ottimizzare la sedimentazione del materiale cellulare, ottenendo un surnatante privo di contaminanti. È seguita quindi la centrifugazione a 2080 rpm per 10 minuti a 4°C. A questo punto, il surnatante è stato

recuperato e trasferito nuovamente in una multiwell a fondo piatto per la conservazione. Infine, i campioni sono stati congelati e conservati a -80°C . Al momento dell'analisi, le piastre sono state scongelate a temperatura ambiente. Le concentrazioni di interleuchina-6 (IL-6), interferone-gamma (IFN- γ) e TNF-alfa (TNF- α), sono state misurate mediante kit R&D System Duo Set (Bio-Techne), seguendo il protocollo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) a sandwich fornito dal produttore (Kapoor *et al.* 2025). La sera precedente l'analisi, le multiwell sono state preparate mediante la procedura del coating: in ogni pozzetto sono stati inseriti 100 μL di anticorpo di cattura specifico, consentendo il legame alla superficie della multiwell. Dopo l'incubazione overnight a temperatura ambiente, è stato rimosso l'anticorpo in eccesso eseguendo due lavaggi con 75 μL di PBS. Successivamente, è stata eseguita la fase di blocking aggiungendo 50 μL di PBS addizionato con BSA all'1% per un'ora a temperatura ambiente. Questo passaggio è fondamentale per saturare i siti di legame non occupati nella multiwell ed evitare interazioni aspecifiche, garantendo un'alta specificità del segnale. Parallelamente, sono state preparate le curve standard per ogni citochina con diluizioni seriali a partire dagli stock concentrati forniti dal produttore. Queste sono state preparate a sette punti in duplicato, diluendo 1:2 nel reagente diluente specifico, oltre ad un punto di bianco (zero standard). In conformità con i protocolli dei kit, le concentrazioni del punto più alto della curva sono state fissate a 600 pg/mL per IFN- γ e IL-6 e a 1000 pg/mL per TNF- α . Dopo la fase di saturazione e i relativi lavaggi, sono stati caricati 25 μL di standard e delle citochine in esame. I campioni di IL-6 e IFN- γ sono stati testati tal quali, mentre per il TNF- α è stata applicata una diluizione di 1:3. A questo punto, la multiwell è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente per consentire il legame delle citochine agli anticorpi di cattura. Una volta terminata l'incubazione, sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS, successivamente è stato aggiunto l'anticorpo di rilevazione biotinalato, poi è stata fatta un'ulteriore incubazione di 2 ore a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS addizionato con Tween, poi sono stati aggiunti 25 μL per pozzetto di Streptavidina coniugata all'enzima perossidasi (Horseradish Peroxidase, HRP). La Streptavidina è stata preparata diluendo 75 μL di stock in 15 mL di PBS. La multiwell è stata incubata per 15 minuti. Finita l'incubazione, sono stati effettuati un'altra serie di lavaggi in PBS con Tween, poi sono stati aggiunti 40 μL di substrato cromogeno Tetra-Metil-Benzidina (TMB). Trascorsi circa 5 minuti, questa reazione enzimatica ha prodotto una colorazione blu. Sono stati aggiunti 20 μL di Acido Solforico, che ha inibito il pH della soluzione inibendo la perossidasi, a questo punto si ottiene una colorazione gialla. Per misurare l'intensità di colore è stata eseguita una lettura allo spettrofotometro impostato alla lunghezza d'onda di 450 nm, con correzione del background a 540 nm (o 570 nm) per correggere eventuali imperfezioni della piastra stessa. I valori di assorbanza risultanti sono stati convertiti in

concentrazioni (pg/mL) mediante l'interpolazione con una curva standard a quattro parametri calibrata per ciascuna citochina.

3.15 Analisi statistica

Per l'elaborazione dei dati e la costruzione delle rappresentazioni grafiche è stato utilizzato il software GraphPad Prism (versione 8.0.2). I risultati di tutti gli esperimenti eseguiti sono stati ottenuti da almeno tre replicati biologici indipendenti e sono stati rappresentati come media \pm deviazione standard (SD). La valutazione della significatività statistica è stata eseguita in modo differente, in base alla complessità dei confronti eseguiti. Per comparare direttamente due singole condizioni, come nel caso del controllo rispetto ad uno specifico stimolo, è stato utilizzato il t-test di Student. Per l'analisi delle NETosi, finalizzata alla valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti (Pisa4 e PMA) rispetto al controllo basale, è stata utilizzata l'analisi della varianza ANOVA One-way. Per l'analisi della produzione delle citochine e degli effetti di Pisa4 su *M. abscessus*, è stata utilizzata l'analisi della varianza ANOVA Two-way.

Nei test condotti per confronti multipli, la significatività statistica è stata calcolata sulla base dell'adjusted p-value (p-value aggiustato). Per tutti i saggi condotti, sono stati considerati risultati statisticamente significativi quelli con un valore di $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 Analisi del genoma

Il punto di partenza del presente lavoro è stato ampliare la fagoteca del laboratorio per coprire un maggior numero di ceppi di *M. abscessus*. A questo scopo, i fagi Amelia, John Lord, Kurisu e Okabe analizzati in questo studio sono stati precedentemente isolati a partire da campioni di suolo e acque reflue raccolti nell'area di Pisa. Dopo l'isolamento, i fagi sono stati amplificati al fine di ottenere lisati ad alto titolo, dai quali è stato successivamente estratto il DNA virale. Il DNA ottenuto è stato quindi sequenziato e le sequenze risultanti sono state assemblate per consentire l'analisi genomica. Tutti i fagi analizzati presentano un genoma costituito da DNA a doppio filamento (dsDNA). L'analisi dei dati di sequenziamento ha permesso la classificazione e l'annotazione dei genomi dei quattro fagi. Il confronto delle sequenze genomiche con i database di riferimento ha consentito l'identificazione dei best match e ha evidenziato una significativa variabilità in termini di dimensioni genomiche e di appartenenza ai cluster (Tabella 3).

Tabella 3: Caratteristiche genetiche dei fagi Amelia, John Lord, Kurisu e Okabe.

| Bacteriophage | Size (bp) | Annotation Reference | Coverage | Identity | Genus | Cluster |
|----------------------|------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|----------------|
| Amelia | 63.730 | <i>Mycobacterium</i> phage Sejanus | 83% | 98.03% | Unclassified | AD |
| John Lord | 66.441 | <i>Mycobacterium</i> phage Mask | 75% | 98.79% | Unclassified | AD |
| Kurisu | 82.428 | <i>Mycobacterium</i> phage Bipper | 7% | 79.91% | New | Singleton |
| Okabe | 54.392 | <i>Mycobacterium</i> phage Donkeykong | 67% | 96.02% | New | F |

La percentuale di copertura (coverage) indica la percentuale della sequenza assemblata che risulta allineata alla sequenza di riferimento, mentre la percentuale di identità (identity) rappresenta la percentuale di nucleotidi identici nella regione allineata tra le due sequenze (Shang *et al.* 2023).

Per stabilire se gli isolati rappresentino nuove specie o nuovi generi, sono state seguite le linee guida tassonomiche proposte da Turner e colleghi (Turner *et al.* 2021). Seguendo questo approccio, il prodotto tra la percentuale di copertura e quella di identità definisce il livello di classificazione: un valore inferiore al 95% identifica una nuova specie, mentre un valore inferiore al 70% identifica un

nuovo genere. Sulla base di questi criteri, tutti i fagi analizzati risultano essere una nuova specie all'interno dei rispettivi gruppi.

I fagi Amelia e John Lord presentano rispettivamente dimensioni di 63.730 bp e 66.441 bp e appartengono entrambi al cluster AD. L'analisi BLAST ha mostrato che Amelia presenta la maggiore affinità con il fago *Mycobacterium* Sejanus (Accession Number: OP172873), con una copertura dell'83% e un'identità del 98.03%. Allo stesso modo, John Lord ha mostrato una stretta similarità con il fago *Mycobacterium* Mask (Accession Number: OP172874), con cui condivide il 98.79% di identità su una copertura del 75%. Considerata l'appartenenza dei due isolati allo stesso cluster, è stata valutata la possibilità che Amelia e John Lord potessero appartenere alla stessa specie. È stato quindi effettuato un confronto genomico diretto mediante BLASTn whole-genome. Tale confronto ha evidenziato una percentuale di identità del 97.08% su una copertura complessiva pari al 77%, corrispondente ad un prodotto copertura (query coverage, QC) x identità (identity, ID) pari a circa 74.8%. Pertanto, Amelia e John Lord sono classificati come due specie distinte, entrambe nuove all'interno del cluster AD.

Il fago Kurisu ha una lunghezza media del genoma di 82.428 bp ed è classificato come un Singleton. Tale classificazione indica l'assenza di fagi aventi un'affinità genomica significativa all'interno di PhagesDB, la risorsa di riferimento ufficiale curata dal gruppo del Prof. Hatfull presso l'università di Pittsburgh. Infatti, la sua migliore corrispondenza è stata riscontrata con il fago *Mycobacterium* Bipper (Accession Number: KU728633), con il 7% di copertura e il 79.91% di identità. Il valore di $QC \times ID$ estremamente basso (5.59%) conferma l'appartenenza a un nuovo genere e ne supporta la classificazione come Singleton, considerata la grande distanza genomica da qualsiasi fago precedentemente inserito nel database.

Infine, il fago Okabe ha una dimensione pari a 54.392 bp e appartiene al cluster F. Quest'ultimo ha mostrato una maggiore affinità con il fago *Mycobacterium* Donkeykong (Accession Number: MN586001), con una copertura del 67% e un'identità del 96.02%. Il prodotto risultante pari a 64.33%, essendo inferiore al cut-off del 70% avvalorava l'ipotesi della scoperta di un nuovo genere all'interno del cluster F. Successivamente, i genomi sono stati riorientati e allineati utilizzando il software Easyfig, utilizzando il fago individuato come riferimento per evidenziare le regioni di omologia.

Nel caso di Amelia, come si osserva nella Figura 12, si riscontra un'elevata similarità rispetto al fago di riferimento. L'analisi dei dati ha consentito di individuare 110 CDS per Amelia e 98 CDS per *Mycobacterium* Sejanus. Questa differenza numerica è da attribuire principalmente all'identificazione di proteine ipotetiche di piccole dimensioni nel genoma di Amelia, assenti nel fago di riferimento. L'analisi ha consentito di mappare i principali geni che compongono il genoma di Amelia. Nella porzione iniziale, sono localizzati i geni essenziali per la formazione dei virioni, tra questi si distinguono la terminasi, la proteina portale, la proteina maggiore del capsido e il complesso delle proteine della coda. Lungo il genoma, è stata identificata una cassetta di lisogenia funzionale, caratterizzata dalla presenza del gene per la tirosina-integrasi, del gene per l'escissionasi e del gene per il repressore trascrizionale. A valle dei geni strutturali, si colloca il modulo di lisi, che comprende i geni essenziali per la fase terminale del ciclo litico. Questo modulo include l'olina, che destabilizza la membrana citoplasmatica, creando pori che permettono alle endolisine di raggiungere il peptidoglicano e la membrana esterna. Nello specifico, la lisina A (LysA) idrolizza il peptidoglicano, mentre la lisina B (LysB) idrolizza il legame tra gli acidi micolici e l'arabinogalattano. Infine, la parte terminale del genoma comprende geni coinvolti nella replicazione del DNA, tra cui la DNA elicasi e la DNA primasi, seguiti da numerose proteine ipotetiche, la cui funzione rimane ancora da caratterizzare. L'analisi condotta tramite lo strumento ABRicate non ha rivelato la presenza di geni associati alla resistenza antibiotica o di sequenze codificanti per fattori di virulenza.

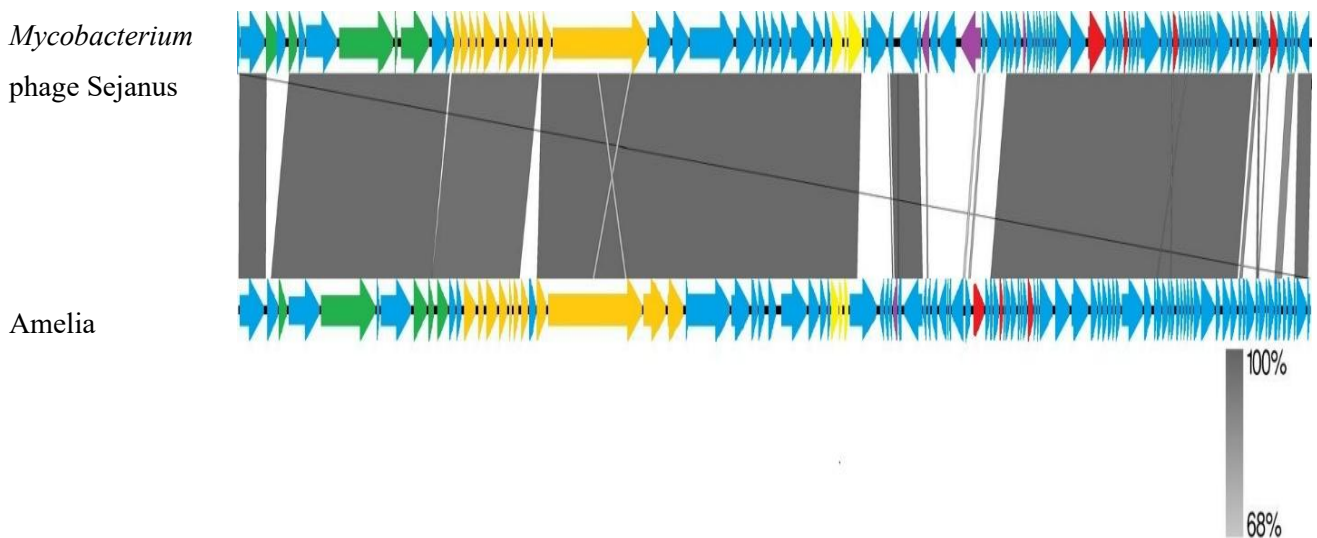


Figura 12: Genoma del fago Amelia allineato con il fago di riferimento Sejanus.

Legenda: Hypothetical protein → Capsid and scaffold protein → Tail protein → Lysis →
Lysogeny → Phage metabolism →

Come illustrato nella Figura 13, il confronto genomico tra John Lord e *Mycobacterium* Mask rivela un'organizzazione genica con alto grado di similarità e conservazione dell'ordine dei geni lungo l'intera sequenza. L'annotazione ha permesso di identificare 106 CDS e una sequenza di tRNA (tRNA-Tyr-GTA) per John Lord e 96 CDS per *Mycobacterium* Mask che invece è risultato privo di geni per il tRNA. La differenza numerica dei geni tra i due fagi è da attribuire, anche in questo caso, alla presenza di diverse proteine ipotetiche presenti in John Lord. L'analisi funzionale ha confermato un'organizzazione modulare analoga a quella osservata per Amelia. Nella porzione iniziale, si trovano la terminasi, la proteina portale e le proteine del capsido, seguite dalle proteine della coda. Il modulo di lisi è presente in posizione centrale e comprende geni per l'endolisina (lisina A e B). Nel genoma di John Lord, a differenza del riferimento, non è stata annotata un'olina. È stata identificata anche una cassetta di lisogenia completa: tirosina-integrasi, repressore di immunità, anti-repressore, escissionasi. Infine, la regione terminale comprende geni deputati alla replicazione del DNA, come la DNA elicasi e la DNA primasi. L'analisi condotta tramite lo strumento ABRicate e il controllo manuale delle CDS non ha rivelato la presenza di geni associati alla resistenza antibiotica o di sequenze codificanti per fattori di virulenza.

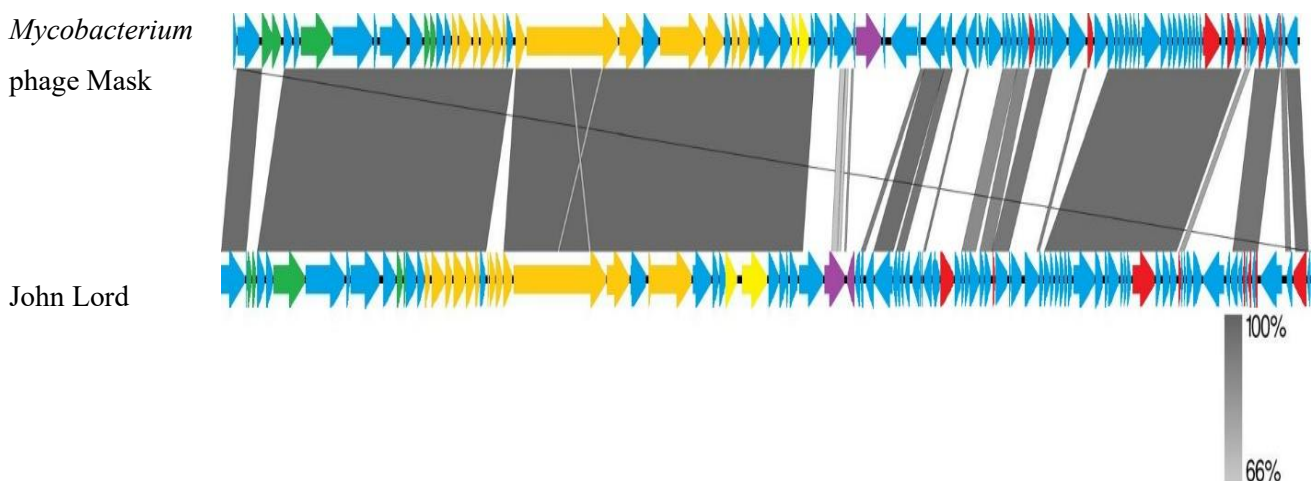


Figura 13: Genoma del fago John Lord allineato con il fago di riferimento Mask.

Legenda: Hypothetical protein \rightarrow Capsid and scaffold protein \rightarrow Tail protein \rightarrow Lysis \rightarrow Lysogeny \rightarrow Phage metabolism \rightarrow

L'analisi di Kurisu ha rilevato una marcata divergenza rispetto agli altri fagi isolati. L'annotazione del genoma ha consentito di identificare 162 CDS, in numero ben superiore rispetto alle 135 CDS annotate per il riferimento. Coerentemente con la sua classificazione da Singleton, oltre il 70% di questi geni è costituito da proteine ipotetiche attualmente prive di funzioni note. Un dato di particolare rilievo emerso dall'analisi è la presenza di un set diversificato di quattro sequenze di tRNA (tRNA-Met, tRNA-Arg, tRNA-Ser e tRNA-Undet), a differenza del fago di riferimento che ne possiede

invece solo una (tRNA-Met). L'analisi funzionale ha permesso di identificare anche la presenza di una tirosina-integrasi, di un repressore trascrizionale e di un escissionasi, a conferma della natura lisogenica del fago. È stata individuata anche una cassetta di lisi, contenente le proteine essenziali per la degradazione dell'intero envelope cellulare. L'assenza di geni associati alla resistenza antibiotica e di fattori di virulenza ne garantisce un profilo di sicurezza.

Il fago Okabe è stato inquadrato come rappresentante di un nuovo genere all'interno del cluster F. Il confronto con il riferimento *Mycobacterium* Donkeykong (Figura 14) mostra un'organizzazione genomica che evidenzia variazioni nelle regioni accessorie, contenenti un gran numero di proteine non caratterizzate, giustificando il valore di distanza intergenomica del 64.33%. L'annotazione ha rilevato 108 CDS per Okabe e 110 CDS per *Mycobacterium* Donkeykong. Nella porzione iniziale risulta altamente conservato il modulo strutturale, contenente i geni per la terminasi, il capsid e la coda. Sono presenti anche la cassetta di lisi, contenente l'olina e due varianti di endolisina (lisina A e B) e di lisogenia, contenente l'integrasi, il repressore, l'anti-repressore e l'escissionasi, a conferma del potenziale ciclo replicativo temperato del fago. In corrispondenza della porzione finale del genoma, l'allineamento mostra la divergenza più significativa rispetto a quella del fago di riferimento.

In linea con gli altri fagi analizzati, l'analisi condotta tramite lo strumento ABRicate non ha rivelato di geni associati alla resistenza antibiotica o di sequenze codificanti per fattori di virulenza.

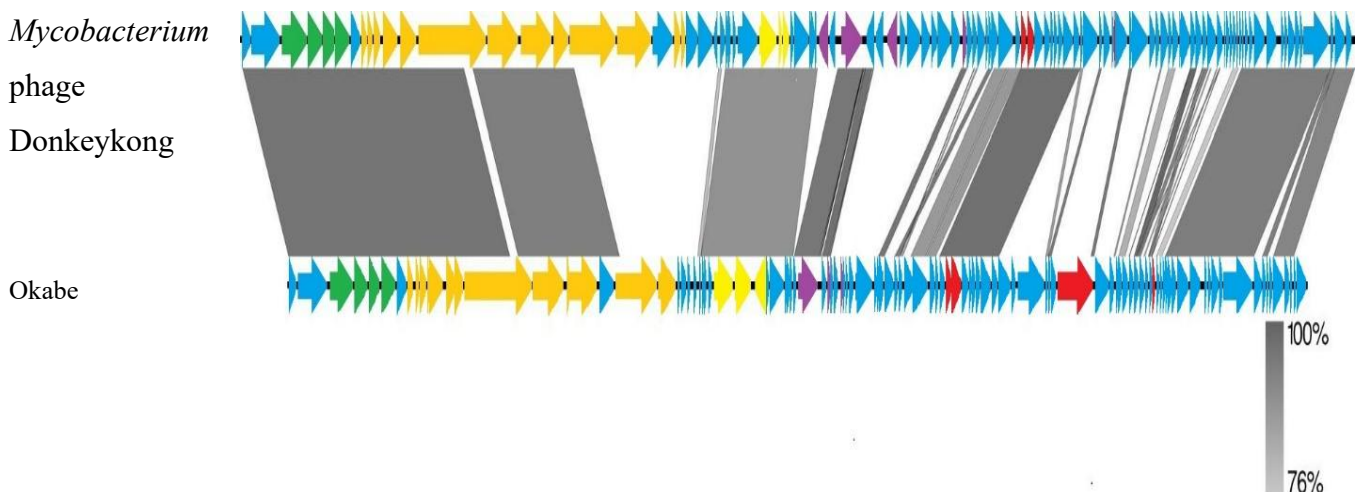


Figura 14: Genoma del fago Okabe allineato con il fago di riferimento Donkeykong.

Legenda: Hypothetical protein → Capsid and scaffold protein → Tail protein → Lysis →
Lysogeny → Phage metabolism →

4.2 Host range and Efficiency Of Plating Assay

I quattro fagi sono stati testati contro i 28 ceppi clinici di *M. abscessus*, appartenenti al morfotipo liscio (S) e rugoso (R). Come mostrato in Figura 6, nessuno dei fagi ha evidenziato un'infezione litica produttiva (EOP > 0) sui ceppi clinici testati. Tuttavia, il fago Kurisu ha mostrato la formazione di aloni di lisi (Halo) su diversi isolati appartenenti a entrambi i morfotipi, suggerendo attività litica non necessariamente associata a replicazione fagica produttiva. In particolare, la formazione di Halo è stata osservata nei ceppi: R2R, R7R, R9R1, R9R2, *M. ab.* AB (R), R4S2, R5S e R6S.

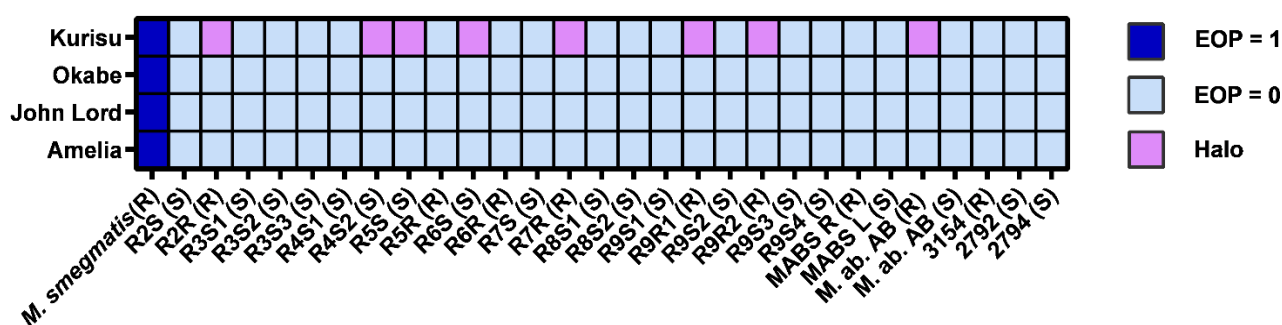


Figura 15: Host range e dell'Efficiency Of Plating per i quattro fagi testati sui diversi ceppi clinici di *M. abscessus*. Il test è stato condotto tre volte, in duplicato tecnico. Nella parte inferiore dell'immagine, sono stati riportati gli ID dei ceppi testati e il relativo morfotipo (R: Rough/Rugoso, S: Smooth/Liscio). È indicata anche la legenda cromatica, indicativa del grado di suscettibilità: EOP=1 in blu scuro per indicare l'efficienza litica standard sull'ospite di riferimento *M. smegmatis* mc² 155, EOP = 0 in azzurro per indicare l'assenza di infezione litica produttiva e Halo in rosa per indicare la presenza di aloni di lisi.

Gli otto ceppi di *M. abscessus* in cui è stata osservata la presenza di aloni di lisi sono stati sottoposti a test di infezioni in terreno liquido. Trascorse 24 ore dall'infezione, i titoli fagici sono stati analizzati per individuare eventuali incrementi rispetto agli inoculi iniziali. Nessuno dei ceppi ha mostrato un aumento del titolo fagico. I dati evidenziano che il fago Kurisu non è in grado di replicare; la presenza degli aloni di lisi è quindi indicativa di fenomeni di lisi non produttiva.

4.3 Stabilità alla temperatura

Al termine dell'incubazione dei fagi in Phage buffer a differenti temperature, è stata valutata la capacità dei fagi di mantenere l'attività litica attraverso titolazione. L'analisi dei dati sottolinea una notevole stabilità di tutti i fagi, che mantengono titoli costanti tra 4 e 55°C. Il punto critico per la stabilità virale è stato riscontrato a 65°C; in questa condizione si rilevano le principali differenze tra i fagi. Nello specifico, Amelia, John Lord e Okabe hanno subito un calo del titolo, fino a circa 3 Log₁₀, mentre Kurisu è risultato il più sensibile allo shock termico, si osserva infatti totale inattivazione a tale temperatura.

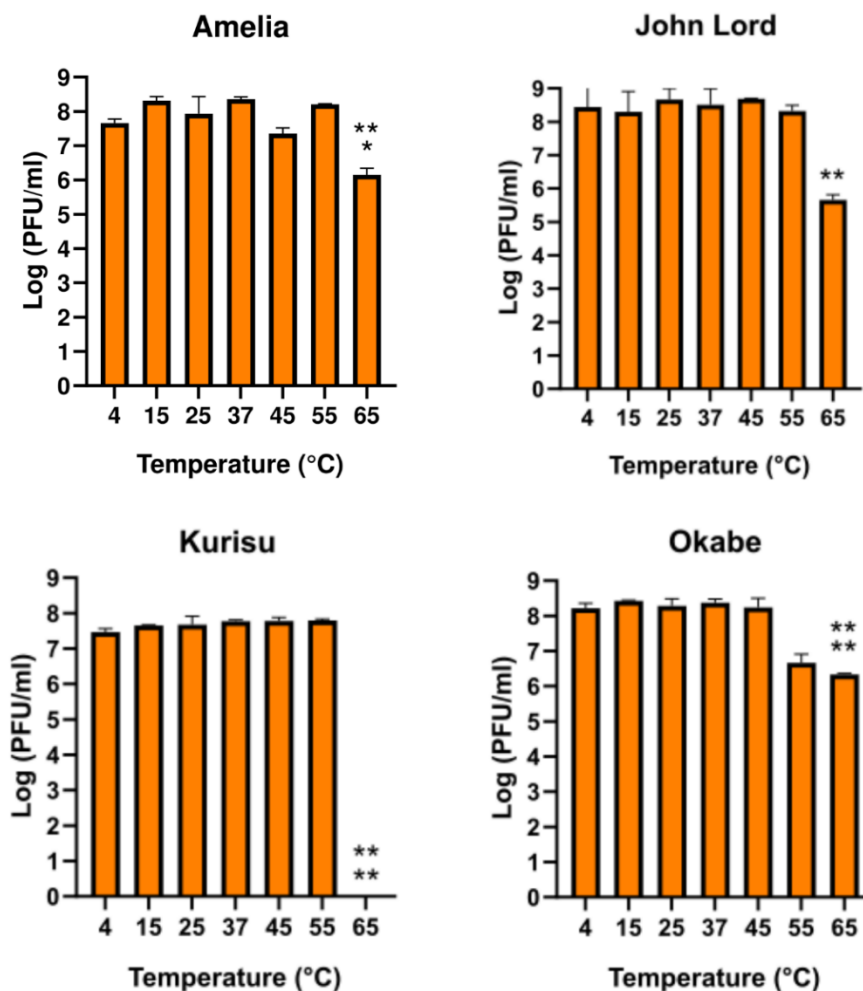


Figura 16: Stabilità dei fagi valutata a diverse temperature. I dati ottenuti sono il risultato della media di tre replicati biologici indipendenti. La significatività statistica è stata calcolata con one-sample t-test rispetto alla temperatura di riferimento (4°C) (** p-value < 0.05, *** p-value < 0.001, **** p-value < 0.0001).

4.4 Stabilità al pH

Dopo l'incubazione in Phage buffer a livelli di pH compresi da 1 a 12, è stata testata l'attività dei quattro fagi tramite spot assay. Tutti i fagi mostrano una buona resistenza in un ampio range di pH, mantenendo titoli simili a quelli iniziali. Amelia, John Lord e Okabe risultano stabili tra pH 3 e 11, il fago Kurisu invece rimane stabile tra pH 4 e 11. In corrispondenza dei pH estremi 1, 2 e 12, si osserva al contrario una totale inattivazione dei virioni. Il fago Kurisu risulta maggiormente sensibile agli ambienti acidi, subendo una perdita totale di attività già a pH 3.

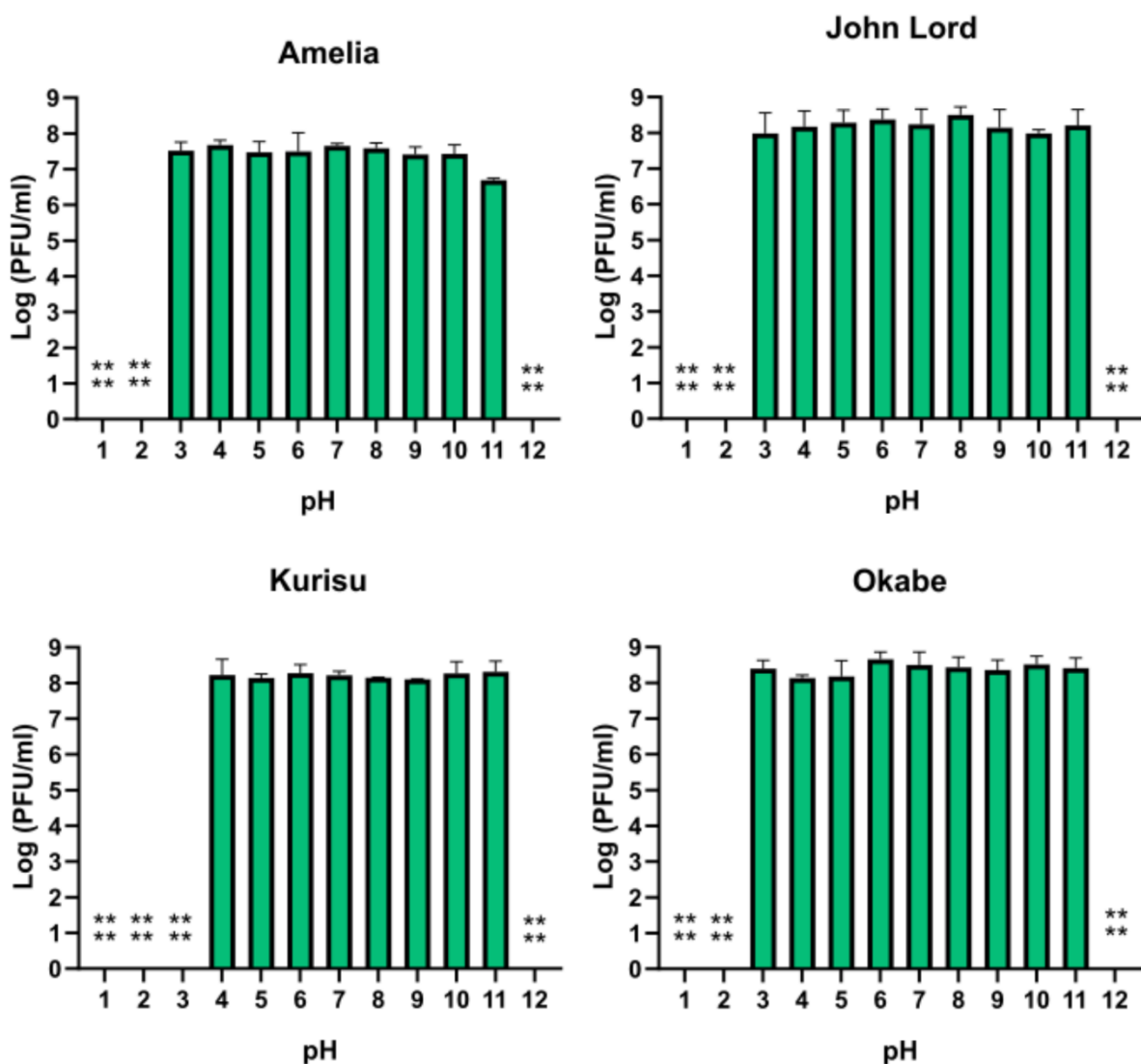


Figura 17: Stabilità dei fagi analizzata in funzione del pH. Questo test è stato eseguito in triplicato biologico. I dati sono stati analizzati con one-sample t-test rispetto al pH di riferimento (pH 7) (**** p-value < 0.0001).

4.5 Caratterizzazione del fago Pisa4

Parallelamente alla caratterizzazione dei quattro nuovi fagi, è stato studiato il fago Pisa4, precedentemente isolato e caratterizzato nel Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa. Pisa4 possiede un repressore trascrizionale tronco, differentemente dagli altri fagi presenti nella collezione, caratteristica che ne suggerisce un ciclo strettamente litico, rendendolo un candidato per la fagoterapia contro *M. abscessus*.

Precedenti analisi dello spettro d'ospite e dell'efficienza di piastratura (Efficiency Of Plating EOP), condotte in laboratorio avevano mostrato che Pisa4 risultava attivo contro diversi ceppi di *M. abscessus*. Limitatamente al pannello di ceppi utilizzati nel presente studio, il fago ha mostrato la formazione di placche solo sul ceppo R2S, con valori di EOP compresi tra 0 e 0.1. Nei seguenti ceppi clinici: R2R, R2S, R3S1, R3S2, R3S3, R4S1, R4S2 e R9S3 invece, Pisa4 aveva mostrato la presenza di alone di lisi, indicativi di un'attività litica non necessariamente associata a replicazione produttiva. Sulla base di queste osservazioni, sono stati condotti test in terreno liquido, per distinguere l'infezione fagica dal fenomeno di lysis from without. I risultati riportati nella Tabella 4 hanno confermato la capacità replicativa di Pisa4 sulla maggior parte dei ceppi clinici testati, con incrementi del titolo fagico compresi tra 1.3 e 2.2 Log₁₀ dopo 24 ore di incubazione. Le migliori performance sono state osservate nei ceppi R2R (incremento Log₁₀ = 2.2 PFU/mL) e R4S1 (incremento Log₁₀ = 2.1 PFU/mL). Per i ceppi R3S3 e R4S2 invece, l'assenza di incremento del titolo indica che la lisi osservata in precedenza su piastra non è riconducibile ad una replicazione produttiva.

Tabella 4: Incremento Log₁₀ dei titoli di Pisa4 dopo 24 ore dall'infezione su ceppi di *M. abscessus*.

| Ceppo di <i>M. abscessus</i> | Incremento Log ₁₀ (PFU/mL) | Esito infezione |
|------------------------------|--|-----------------|
| R2R | 2.2 | Replicativo |
| R2S | 1.7 | Replicativo |
| R3S1 | 1.7 | Replicativo |
| R3S2 | 1.3 | Replicativo |
| R3S3 | / | Non replicativo |
| R4S1 | 2.1 | Replicativo |
| R4S2 | / | Non replicativo |
| R9S3 | 1.8 | Replicativo |

Note: I dati rappresentano tre esperimenti indipendenti, eseguiti in duplicato tecnico. I valori presenti nella colonna centrale della tabella sono il risultato della differenza tra il titolo finale a 24 ore ed il titolo iniziale.

4.6 Cinetica di lisi

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti nei saggi di infezione in terreno liquido, i ceppi R2R ed R2S sono stati selezionati per i test di valutazione dell'attività battericida di Pisa4. L'esperimento è stato condotto monitorando la carica batterica (CFU/mL) a tre diverse MOI (0.1, 1, 10) per 72 ore, parallelamente al controllo di crescita.

Pisa4 ha mostrato un'elevata efficacia nel controllare la crescita del ceppo R2R (Figura 18A). Si osserva una riduzione della carica batterica già a partire dalle 6 ore post-infezione per la MOI 10, con una diminuzione di circa 1 ordine di grandezza rispetto al controllo di crescita. L'effetto battericida risulta massimo tra 24 e 48 ore; in questo caso la carica batterica si riduce complessivamente di circa 3 Log_{10} , passando da 10^6 a 10^3 CFU/mL. Questa riduzione viene mantenuta fino a 72 ore, evidenziando un controllo prolungato nella crescita batterica. A MOI di 0.1 e 1 si osserva una riduzione significativa della carica batterica, anche se meno marcata rispetto alla MOI 10 (circa 1.5-2 Log_{10} rispetto al controllo di crescita). I risultati relativi al ceppo R2S non mostrano attività battericida da parte del fago, in quanto i livelli di CFU/mL risultano essere sovrapponibili a quelli del controllo di crescita (Figura 18B).

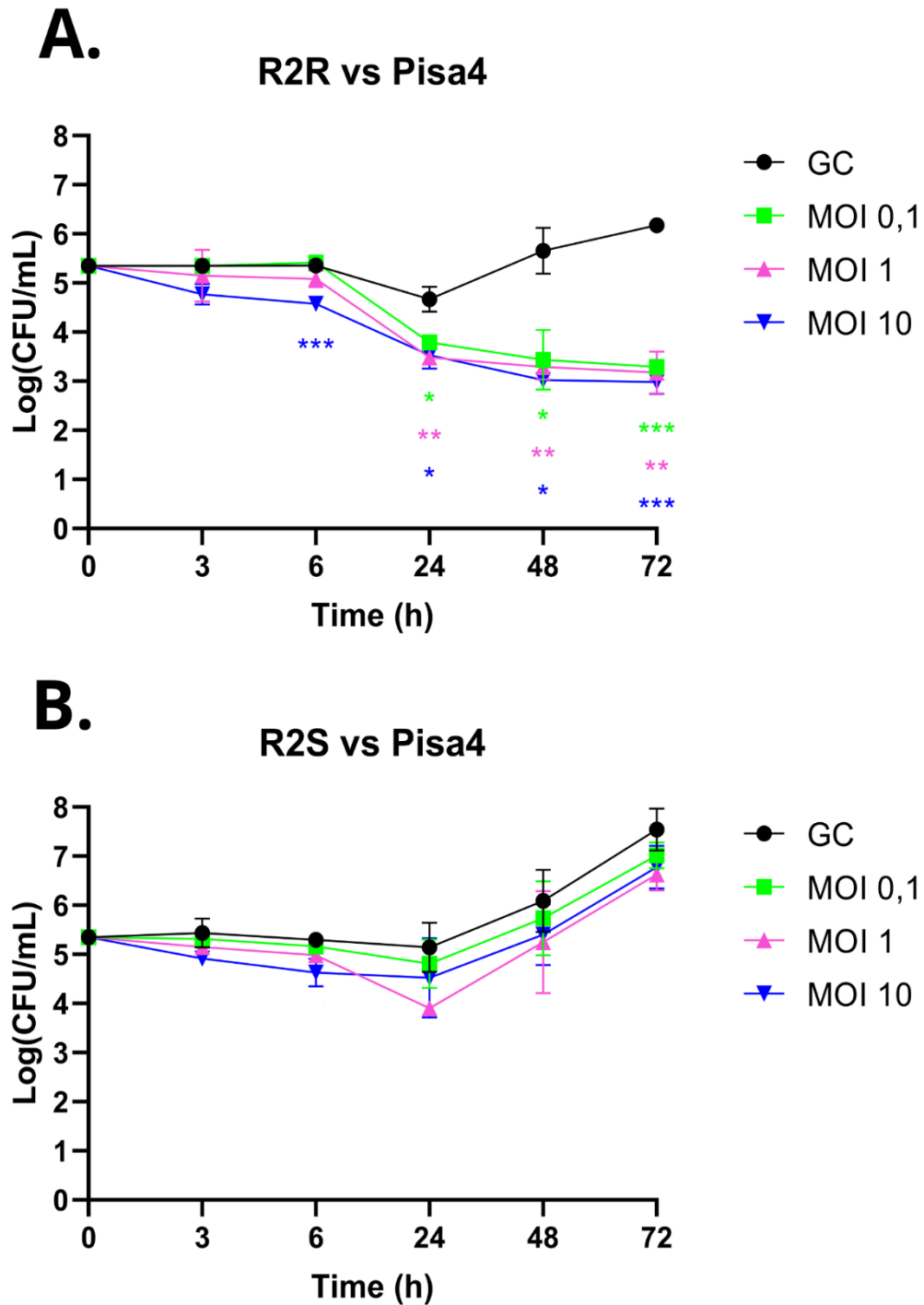


Figura 18: Cinetica di lisi del fago Pisa4 sui ceppi di *M. abscessus* R2R (A) e R2S (B). L'analisi statistica è stata condotta mediante Two-way ANOVA, seguita dal test di confronto multiplo di Dunnett; per il ceppo R2R sono state riscontrate differenze statisticamente significative a diverse MOI e tempi (* p-value < 0,05, ** p-value < 0,01, *** p-value < 0,001), mentre per il ceppo R2S non è stata osservata significatività.

4.7 Valutazione dell'induzione della NETosi

Oltre all'efficacia litica, è stata indagato il profilo di sicurezza del fago Pisa4, valutandone la capacità di modulare alcuni aspetti della risposta immunitaria innata. Per valutare se Pisa4 fosse in grado di indurre NETosi, neutrofilo isolati da sei individui sani sono stati esposti a 10^3 fagi/cellula. È stata condotta un'analisi mediante microscopia a immunofluorescenza, utilizzando il DAPI per la marcatura del DNA e un anticorpo anti-mieloperossidasi (MPO, un marker della NETosi) coniugato con Alexa-488, per andare a identificare questa proteina. L'osservazione dei campi microscopici, come riportato in un'immagine rappresentativa (Figura 19), ha mostrato che i neutrofilo trattati con Pisa4 presentano un pattern di fluorescenza e una morfologia cellulare sovrapponibili al controllo negativo. Al contrario, il controllo positivo stimolato con PMA a 100 nM ha mostrato un'evidente distribuzione extracellulare della MPO e del DNA, indicativa di un attivo rilascio di NETs.

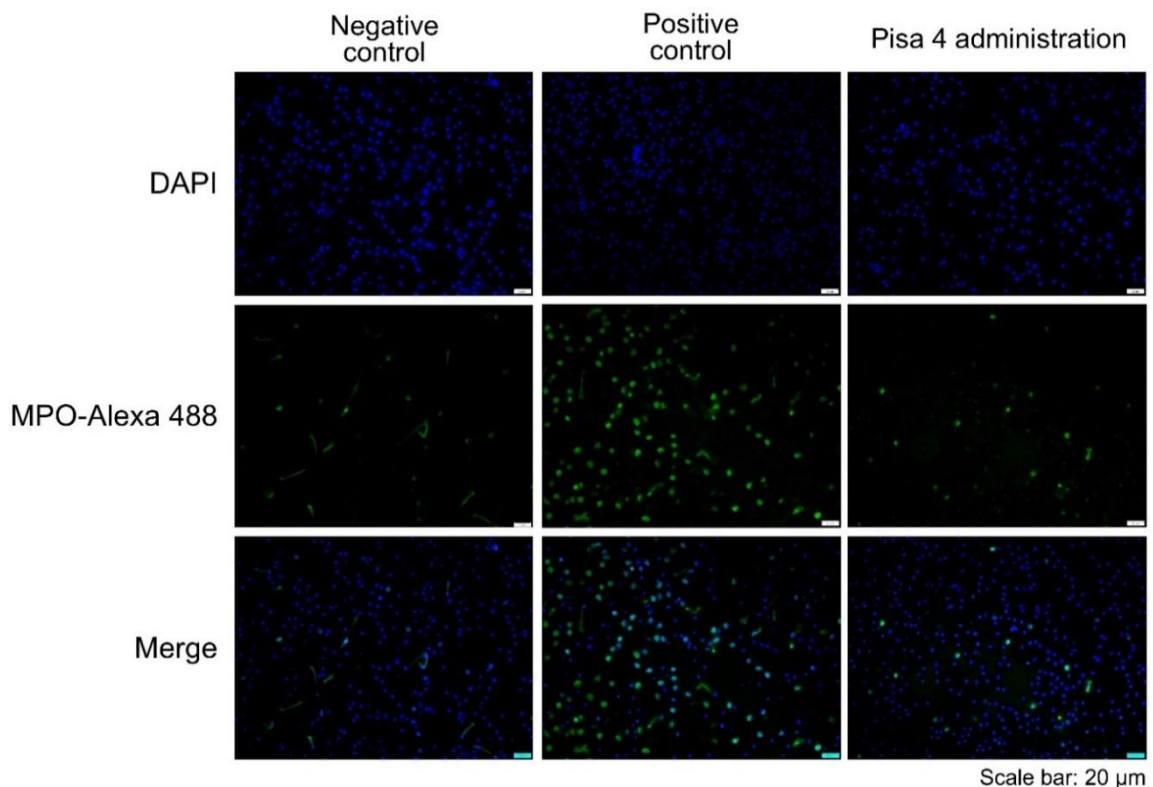


Figura 19: Analisi qualitativa della NETosi mediante immunofluorescenza in neutrofilo umani trattati con il fago Pisa4. I neutrofilo sono stati marcati con DAPI per il DNA (blu) e con un anticorpo anti-mieloperossidasi (MPO) coniugato con Alexa-488 (verde). Le immagini sono rappresentative di: controllo negativo, controllo positivo e trattamento con Pisa4. [Barra di scala = 20 μ m]

Sulla base dell'analisi di tutte le immagini di immunofluorescenza ottenute dal trattamento dei neutrofili di ciascun donatore, è stata eseguita la quantificazione della NETosi, contando per ciascun campione la percentuale di cellule doppie positive per DAPI e MPO su più campi microscopici per donatore. L'analisi quantitativa, che è stata riportata nella Figura 20, mostra che l'esposizione al fago Pisa4 non induce un incremento significativo delle NETosi rispetto al controllo negativo, con valori medi intorno al 6%. Il controllo positivo con PMA invece, determina un aumento significativo della percentuale di cellule NET-positive, raggiungendo circa il 12,5 %.

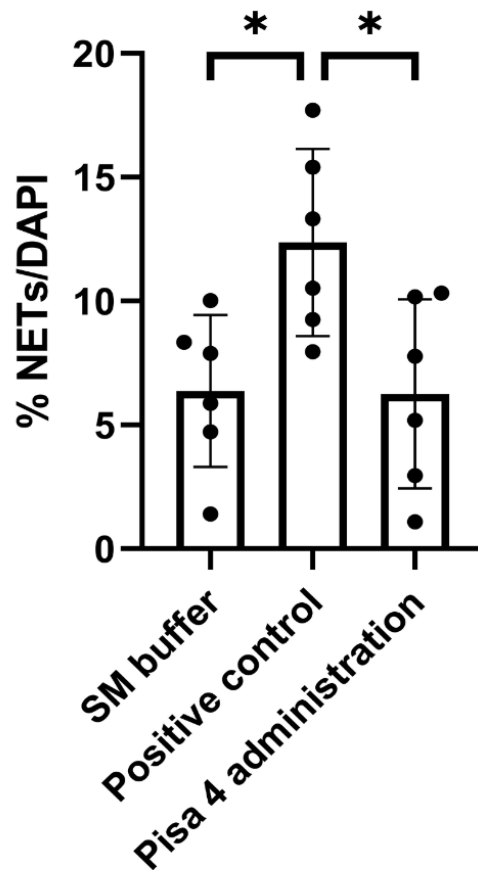
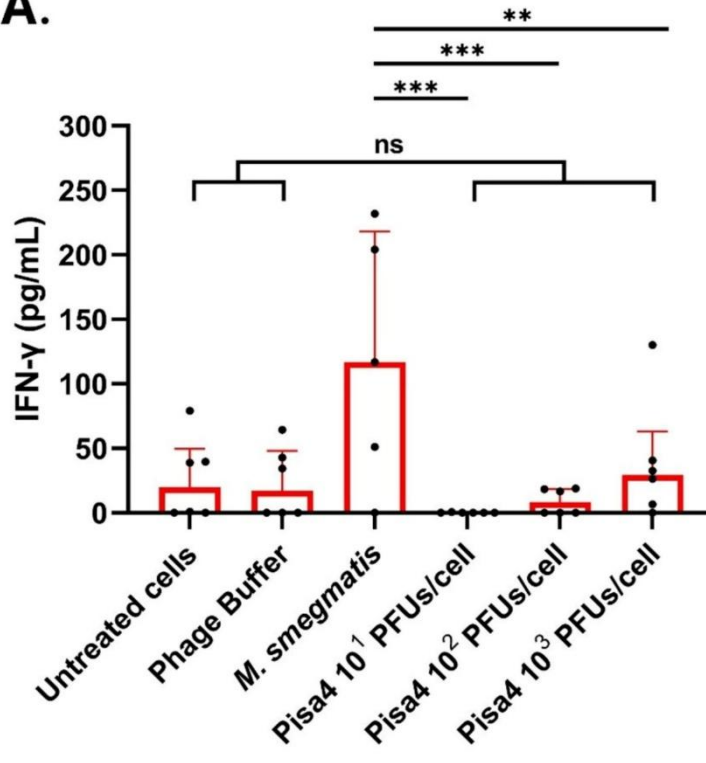
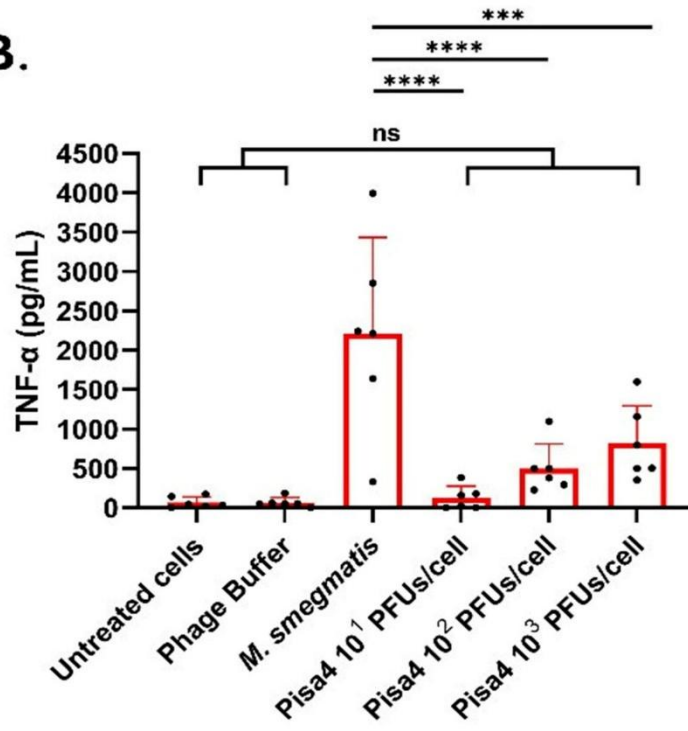


Figura 20: Quantificazione della NETosi in neutrofili umani trattati con il fago Pisa4. La significatività statistica è stata calcolata tramite One-way ANOVA, seguita dal test di confronto multiplo di Tukey, sulla base dell'adjusted p-value (* p-value < 0,05).

4.8 Valutazione dell'induzione delle citochine

Per valutare una potenziale attività immunomodulatoria del fago Pisa4 è stata quantificata la produzione delle citochine IL-6, IFN- γ e TNF- α da PBMC isolate da sei donatori sani. Le cellule sono state stimulate per 48 ore con tre diverse concentrazioni del fago Pisa4 (10^3 , 10^2 e 10^1 PFU/cellula). Sono stati inclusi due controlli negativi (cellule non trattate e cellule trattate con Phage buffer) e un controllo positivo con *M. smegmatis* mc² 155. La concentrazione delle citochine è stata determinata tramite saggio ELISA a sandwich. Come mostrato nella Figura 20, l'esposizione delle PBMC al fago Pisa4 non determina un aumento significativo della produzione di IFN- γ e TNF- α rispetto ai controlli negativi, indipendentemente dalla concentrazione di fago utilizzata. I livelli delle due citochine sono infatti comparabili a quelli osservati nelle cellule non trattate e nel controllo con il Phage buffer. Al contrario, il controllo positivo con *M. smegmatis* mc² 155 induce un incremento della loro produzione, con valori medi di IFN- γ superiori a circa 100-150 pg/mL e concentrazioni di TNF- α che raggiungono diverse migliaia di pg/mL. Per quanto riguarda IL-6, si osserva un aumento significativo della produzione dopo il trattamento con il fago Pisa4. In particolare, le concentrazioni più alte del fago (10^3 , 10^2 PFU/cellula) comportano un incremento della secrezione di IL-6 rispetto ai controlli negativi, con valori che passano da poche decine di pg/mL nei controlli a diverse centinaia fino a oltre 1000 pg/mL nei campioni trattati. La concentrazione più bassa di Pisa4 (10^1 PFU/cellula) non determina invece alcuna differenza significativa rispetto ai controlli.

A.**B.**

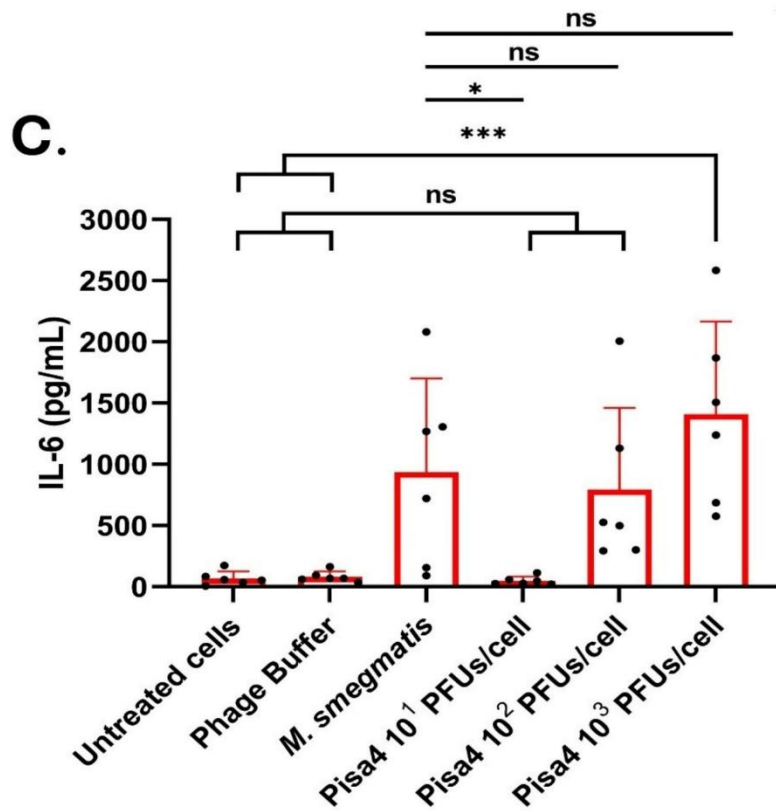


Figura 20: Produzione delle citochine IFN- γ (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) in PBMC umane a 48 ore dal trattamento. La significatività statistica è stata valutata mediante Two-way ANOVA, seguita dal test di confronto multiplo di Tukey, con adjusted p-value (* p-value < 0.05, ** p-value < 0.01, *** p-value < 0.001, **** p-value < 0.0001).

5. DISCUSSIONE

Le infezioni sostenute da *M. abscessus* sono in aumento a livello globale e la grande diffusione di ceppi resistenti agli antibiotici ne complica notevolmente il trattamento. Le principali difficoltà riscontrate nel trattare questo batterio sono associate ad alcune sue caratteristiche peculiari, tra cui la parete cellulare ricca di lipidi che ostacola l'ingresso dei farmaci, la capacità di formare biofilm, l'elevata resistenza intrinseca e acquisita a molti antibiotici e il suo potenziale stile di vita intracellulare (Abdelaal *et al.* 2022). A causa di queste problematiche, la necessità di sviluppare nuovi trattamenti sta diventando sempre più urgente. In questo panorama, la terapia fagica, basata sull'utilizzo dei batteriofagi e somministrata in combinazione con gli antibiotici tradizionali si è dimostrata efficace in molti casi nel trattamento delle infezioni da *M. abscessus* (Bhargava *et al.* 2021). In questo lavoro sono stati studiati cinque micobatteriofagi che potrebbero essere potenzialmente utilizzati in terapia.

La prima parte di questo lavoro è stata dedicata all'isolamento e alla caratterizzazione dei quattro nuovi micobatteriofagi: Amelia, John Lord, Kurisu e Okabe, con l'obiettivo di ampliare la collezione del laboratorio e studiarne le principali caratteristiche in previsione di un potenziale impiego in terapia. Tutti i fagi analizzati presentano un genoma costituito da DNA a doppio filamento, in linea con quanto descritto in letteratura per la maggior parte dei micobatteriofagi caratterizzati finora (Hatfull 2014). Le dimensioni genomiche rientrano nel range tipico dei micobatteriofagi, compreso tra circa 40 e 160 kb, con una lunghezza media intorno ai 70 kb (Suarez *et al.* 2019). Nel complesso, i genomi analizzati mostrano un'organizzazione modulare tipica dei micobatteriofagi, sono presenti moduli funzionali coinvolti nella struttura del virione, nella replicazione e nei processi di lisi e di lisogenia (Hatfull 2014). L'analisi condotta sui quattro isolati ha mostrato l'assenza di geni di resistenza agli antibiotici e di fattori di virulenza, ma risultano probabilmente lisogenici, a causa della presenza di una cassetta di lisogenia completa. I fagi potenzialmente impiegabili a scopo terapeutico devono essere strettamente litici, questa caratteristica ne limita quindi la possibile applicazione in ambito clinico (Strathdee *et al.* 2023). In questo contesto, un possibile sviluppo futuro consiste nell'ingegnerizzazione di tali fagi, finalizzata alla generazione di derivati strettamente litici. Approcci di questo tipo sono già stati applicati con successo nel trattamento di infezioni da *M. abscessus*, dimostrando come i fagi ingegnerizzati possano essere impiegati in modo efficace in terapia (Dedrick *et al.* 2019). In seguito alla caratterizzazione genotipica, sono stati valutati lo spettro d'ospite e l'EOP, passaggi fondamentali ai fini di un possibile impiego terapeutico dei fagi caratterizzati. Nel complesso, l'attività litica produttiva dei fagi nei confronti dei ceppi clinici usati nel presente studio è risultata assente. Tale osservazione non appare inattesa, in quanto i micobatteriofagi presentano

generalmente uno spettro d'ospite ristretto e un'elevata specificità nei confronti degli NTMs (Druszczynska *et al.* 2025). La presenza di aloni di lisi osservata in alcuni degli isolati è stata ulteriormente analizzata eseguendo test in liquido, che però non hanno evidenziato incrementi del titolo fagico, indicando che questi fenomeni non sono associati alla produzione di nuova progenie virale (Abedon 2011). Tali risultati confermano la complessità dell'interazione tra micobatteriofagi e *M. abscessus*. È importante sottolineare che l'assenza di attività litica nei confronti del pannello di batteri analizzati non implica necessariamente che questi fagi non siano in grado di infettare altri isolati di *M. abscessus* o specie di micobatteri differenti. Considerando l'elevata specificità dei micobatteriofagi, la loro efficacia deve essere quindi valutata su un ampio numero di ceppi clinici ed è plausibile che i fagi valutati nel presente studio possano essere attivi su specie e ceppi differenti da quelli esaminati.

Un ulteriore aspetto importante in vista di un possibile impiego terapeutico dei nuovi fagi riguarda la loro stabilità in condizioni fisiologicamente rilevanti e in condizioni sperimentali estreme impiegate per valutare la tolleranza allo stress. Nel complesso, i fagi analizzati mostrano una buona stabilità a temperature comprese tra 4 e 55°C e in un ampio range di pH, mantenendo l'attività litica in condizioni comprese tra pH 4 e 11. La riduzione dell'attività litica osservata in condizioni estreme di temperatura e pH è coerente con la natura proteica del capsido fagico, sensibile a denaturazione e alterazioni conformazionali che possono compromettere l'integrità del virione e la sua capacità di adsorbimento alla cellula batterica (Jończyk *et al.* 2011). Questi risultati indicano una buona robustezza dei fagi dal punto di vista biologico e applicativo. Per quanto riguarda la temperatura, ad esempio, i fagi risultano attivi alla temperatura corporea. Per quanto riguarda il pH, invece, la stabilità dei fagi in ambienti moderatamente acidi è rilevante considerando che i micobatteri instaurano infezione all'interno del fagosoma dei macrofagi, dove il pH è generalmente compreso tra 4.5 e 6 (Vandal *et al.* 2008). Inoltre, nelle vie respiratorie i fagi entrano in contatto con il liquido di superficie delle vie aeree che in condizioni fisiologiche ha un pH lievemente acido (Fischer e Widdicombe 2006). In condizioni patologiche, come nella fibrosi cistica, la ridotta secrezione di bicarbonato mediata da CFTR può contribuire a rendere il pH a livello dell'epitelio polmonare ulteriormente più acido (Coakley *et al.* 2003). I dati ottenuti sulla stabilità termica risultano in linea con quanto riportato da Sinha e colleghi, che sottolineano il mantenimento dell'attività fagica in un range compreso tra 4 e 55°C, con una riduzione significativa osservata solo a 65°C (Sinha *et al.* 2020). Altri studi invece evidenziano una maggiore sensibilità alle alte temperature, riportando l'inattivazione dei fagi già a 55°C (Nayak *et al.* 2023 ; Fausti *et al.* 2025). Anche per il pH emergono differenze significative rispetto alla letteratura: sono generalmente descritti range più ristretti e una maggiore stabilità in condizioni neutre e alcaline, con perdita di attività in ambiente fortemente acido. Nel complesso, la

stabilità osservata nei fagi caratterizzati rappresenta un elemento favorevole per un possibile impiego in modelli di infezione e, in prospettiva futura, in ambito terapeutico.

La seconda parte della tesi si è concentrata sulla caratterizzazione del fago Pisa4. I risultati delle precedenti analisi dello spettro d'ospite e dell'efficienza di piastratura avevano indicato attività del fago nei confronti di diversi ceppi clinici di *M. abscessus*. La presenza di placche su piastra ha confermato la capacità del fago di infettare e replicarsi, mentre la comparsa di aloni di lisi non consente di distinguere con certezza tra un'infezione fagica produttiva e fenomeni di lysis from without. L'analisi condotta in terreno liquido ha quindi permesso di chiarire meglio questo aspetto, mostrando la capacità di Pisa4 di replicare in modo produttivo in sei dei ceppi testati. L'incremento del titolo fagico osservato indica infatti che il fago può completare il proprio ciclo replicativo all'interno del batterio. Si tratta di un risultato promettente, in quanto la replicazione fagica rappresenta un requisito importante per il mantenimento dell'attività antibatterica nel tempo. Al contrario, nei ceppi in cui non è stato osservato un incremento del titolo fagico, la lisi individuata su piastra è apparsa compatibile con fenomeni di lysis from without, descritti in letteratura come eventi di lisi batterica mediati dall'adsorbimento di particelle fagiche non associati alla produzione di nuova progenie virale (Abedon 2011). Questi risultati sottolineano come la sola evidenza di aloni di lisi su piastra non basti a predire la reale capacità replicativa di un fago e confermano che l'interazione fago-ospite è fortemente ceppo specifica. Lo stesso fenomeno era stato precedentemente osservato nel nostro laboratorio sul batterio *Klebsiella pneumoniae*, dove la presenza di zone di lisi non era sempre da attribuire a infezione produttive e pertanto richiedeva la validazione attraverso saggi in terreno liquido (Fausti *et al.* 2025). Nel complesso, questi dati sottolineano come la valutazione combinata di saggi su piastra ed esperimenti in terreno liquido rappresenti un passaggio fondamentale nella selezione di potenziali candidati fagici per applicazioni in terapia, riducendo il rischio di sottostimare la reale capacità replicativa dei fagi che, pur mostrando solo aloni di lisi su piastra, possono risultare produttivi nel ceppo bersaglio.

L'analisi della cinetica di lisi condotta su due ceppi isolati dallo stesso paziente, con morfologia di colonia differente ed entrambi suscettibili a Pisa4 (in solido oppure attraverso infezione in liquido e determinazione dell'aumento del titolo fagico dopo 24 ore di incubazione), ha fornito ulteriori informazioni sull'attività battericida di Pisa4. I risultati hanno evidenziato un comportamento differente nei due ceppi analizzati. Nei confronti del ceppo R2R, Pisa4 ha mostrato un'elevata attività battericida, con una riduzione significativa e prolungata della carica batterica. La diminuzione è stata osservata già nelle prime ore post-infezione ed è stata mantenuta fino a 72 ore, suggerendo una replicazione efficiente del fago e una sostenuta capacità di controllo della crescita batterica nel tempo.

Al contrario, nel ceppo R2S non è stata osservata una riduzione significativa della carica batterica, nonostante la replicazione fagica precedentemente evidenziata nei saggi in terreno liquido. Questa differenza è coerente con quanto riportato in letteratura: è noto che i batteriofagi tendono a esercitare un'attività battericida maggiore verso ceppi di *M. abscessus* con morfotipo rugoso, rispetto a quelli con morfotipo liscio. Questa differenza è principalmente attribuita alla presenza di GPL sulla superficie dei ceppi S, che possono ostacolare l'adsorbimento fagico e quindi ridurre l'efficacia del ciclo infettivo. In queste condizioni, l'infezione fagica può comunque verificarsi e consentire l'amplificazione del fago, ma coinvolgere solo una parte della popolazione batterica, limitando così l'impatto sulla carica batterica totale. Al contrario, i ceppi R risultano generalmente più suscettibili all'azione litica dei fagi (Dedrick *et al.* 2021). La selezione dei fagi potenzialmente utilizzabili in terapia dovrebbe quindi considerare il morfotipo batterico e le caratteristiche specifiche dell'isolato clinico. Tuttavia, anche la valutazione della cinetica di lisi rappresenta solo un primo livello di analisi, condotto in condizioni controllate. Nell'infezione reale, *M. abscessus* è frequentemente localizzato in contesti più complessi ed è in grado di sopravvivere a livello intracellulare. In queste condizioni, l'efficacia dei batteriofagi dipende dalla capacità di infettare, lisare e raggiungere il batterio nel sito di infezione, interagendo con le cellule dell'ospite e mantenendo la propria attività in ambiente intracellulare. In studi futuri, sarà pertanto necessario valutare l'attività di Pisa4 in modelli di infezione più complessi, al fine di comprendere se sia in grado di controllare efficacemente i batteri a livello intracellulare e stimarne quindi il potenziale in terapia (Broxmeyer *et al.* 2002).

In questo contesto, è fondamentale analizzare anche le interazioni tra i fagi e le cellule del sistema immunitario. È noto che i fagi possano influenzare la risposta immunitaria dell'ospite, ma non è del tutto chiaro se inducano infiammazione, se abbiano proprietà antinfiammatorie o se siano immunologicamente neutri. Un aspetto molto importante riguarda anche la possibilità che il sistema immunitario possa interferire con la terapia fagica stessa, riconoscendo i fagi come elementi estranei e contribuendo alla loro clearance dall'organismo, con potenziali conseguenze sull'efficacia terapeutica. Tra le prime cellule che intervengono durante un'infezione batterica vi sono i neutrofili, componenti fondamentali dell'immunità innata che possono eliminare i patogeni attraverso diversi meccanismi, tra cui la formazione di NETs (Bernut *et al.* 2016). In questa tesi, i neutrofili sono stati esposti al fago Pisa4 purificato e a concentrazioni elevate, tuttavia non è stato osservato un aumento significativo della NETosi rispetto ai controlli negativi, suggerendo che il fago non induca una marcata attivazione di questa componente della risposta innata. Un andamento analogo è stato riportato da Roach e colleghi, i quali hanno osservato che alte concentrazioni del fago PAK_P1 non induce NETs né altera in modo significativo le principali funzioni neutrofiliche (Roach *et al.* 2023). Considerando che la formazione di NETs rappresenta un importante meccanismo di difesa contro i

patogeni e al tempo stesso può contribuire al danno tissutale in condizioni di infiammazione cronica, come nella fibrosi cistica, dove NETs e DNA extracellulare sono associati ad un'ostruzione del muco e lesione polmonare, l'assenza di una significativa attivazione dei neutrofili da parte del fago rappresenta un elemento positivo in prospettiva terapeutica (Delgado-Rizo *et al.* 2017 ; Khan *et al.* 2019). Nel complesso quindi, i risultati suggeriscono che Pisa4 possa interagire con i neutrofili senza però innescare una risposta infiammatoria eccessiva, in linea con quanto osservato con altri fagi litici studiati in ambito preclinico.

Citochine come IL-6, IFN- γ e TNF- α hanno un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta immunitaria. L'IL-6 e il TNF- α sono essenziali per l'attivazione dei fagociti, il reclutamento delle cellule immunitarie e l'amplificazione della risposta innata, l'IFN- γ invece è coinvolta nell'attivazione dei macrofagi (Jang *et al.* 2021 ; Wei *et al.* 2021 ; Grebenciucova e VanHaerents 2023). L'analisi della modulazione delle citochine IL-6, IFN- γ e TNF- α indotta dall'esposizione a diverse concentrazioni di Pisa4 ha dimostrato l'assenza di un incremento significativo nella produzione di IFN- γ e TNF- α , indicando che il fago non induce una risposta infiammatoria sistemica marcata. Al contrario, l'aumento della secrezione di IL-6 osservato alle concentrazioni più alte di fago suggerisce una modulazione selettiva della risposta immunitaria, piuttosto che una sua attivazione generalizzata. Perea e colleghi (Perea *et al.* 2021) hanno descritto un quadro in parte sovrapponibile, in cui l'esposizione di PBMC umane a preparati fagici ha determinato un incremento selettivo di TNF- α , senza evidenza di una risposta infiammatoria globale e senza una produzione rilevabile di IFN- γ . In letteratura sono riportati anche studi che mostrano che l'esposizione dei PBMC a diversi fagi può indurre una risposta immunitaria con l'attivazione parallela di mediatori pro- e antinfiammatori, sottolineando che l'intensità della risposta vari in base alle caratteristiche del fago e alle condizioni sperimentali (Van Belleghem *et al.* 2017). Nel complesso, i dati ottenuti indicano che Pisa4 determina una modulazione limitata, soprattutto a carico dell'IL-6, collocandosi nel quadro di una risposta fago-dipendente e fortemente influenzata dal contesto sperimentale.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, il presente lavoro ha contribuito allo studio dei micobatteriofagi attraverso l'isolamento, la caratterizzazione genotipica e fenotipica e l'analisi della loro interazione con il sistema immunitario dell'ospite. La caratterizzazione del fago Pisa4 ha consentito l'approfondimento dei meccanismi di interazione fago-batterio e fago-cellule umane, evidenziandone l'attività antibatterica in specifiche condizioni e una modulazione limitata della risposta immunitaria innata, aspetti rilevanti in prospettiva applicativa. Parallelamente, l'isolamento e l'analisi di nuovi micobatteriofagi hanno confermato l'elevata diversità genetica di questi virus e anche l'assenza dello spettro d'ospite nei confronti dei ceppi di *M. abscessus* inclusi in questo studio. Nel complesso, i risultati ottenuti ampliano le conoscenze sui micobatteriofagi e contribuiscono a chiarirne le principali caratteristiche biologiche e funzionali, fornendo elementi utili per la futura valutazione in ambito applicativo. In un contesto clinico caratterizzato dalla crescente diffusione di ceppi antibiotico-resistenti, una migliore comprensione della biologia dei micobatteriofagi risulta fondamentale per lo sviluppo di approcci basati sul loro impiego.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdelaal, Hazem F. M., Edward D. Chan, Lisa Young, Susan L. Baldwin, e Rhea N. Coler. 2022. «Mycobacterium Abscessus: It's Complex». *Microorganisms* 10 (7): 1454. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071454>.
- Abedon, Stephen T. 2011. «Lysis from Without». *Bacteriophage* 1 (1): 46–49. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>.
- Alderwick, Luke J., James Harrison, Georgina S. Lloyd, e Helen L. Birch. 2015. «The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (8): a021113. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021113>.
- Alkarni, Meyad, Marc Lipman, e David M. Lowe. 2023. «The Roles of Neutrophils in Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease». *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 22 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00562-6>.
- Bastian, Sylvaine, Nicolas Veziris, Anne-Laure Roux, et al. 2011. «Assessment of Clarithromycin Susceptibility in Strains Belonging to the *Mycobacterium Abscessus* Group by *Erm* (41) and *Rrl* Sequencing». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (2): 775–81. <https://doi.org/10.1128/AAC.00861-10>.
- Batinovic, Steven, Flavia Wassef, Sarah A. Knowler, et al. 2019. «Bacteriophages in Natural and Artificial Environments». *Pathogens* 8 (3): 100. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>.
- Bernut, Audrey, Mai Nguyen-Chi, Iman Halloum, Jean-Louis Herrmann, Georges Lutfalla, e Laurent Kremer. 2016. «Mycobacterium Abscessus-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF Signaling and Neutrophil Trafficking». *PLOS Pathogens* 12 (11): e1005986. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005986>.
- Bhargava, Kanika, Gopal Nath, Amit Bhargava, G. K. Aseri, e Neelam Jain. 2021. «Phage Therapeutics: From Promises to Practices and Prospectives». *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (24): 9047–67. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11695-z>.
- Bonacorsi, Andrea, Caterina Ferretti, Mariagrazia Di Luca, e Laura Rindi. 2024. «Mycobacteriophages and Their Applications». *Antibiotics* 13 (10): 926. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13100926>.

- Boulanger, Pascale. 2009. «Purification of Bacteriophages and SDS-PAGE Analysis of Phage Structural Proteins from Ghost Particles». In *Bacteriophages*, a cura di Martha R. J. Clokie e Andrew M. Kropinski, vol. 502, edited by John M. Walker. Methods in Molecular Biology. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_13.
- Brinkmann, Volker, Ulrike Reichard, Christian Goosmann, et al. 2004. «Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria». *Science* 303 (5663): 1532–35. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- Broxmeyer, Lawrence, Danuta Sosnowska, Elizabeth Miltner, et al. 2002. «Killing of *Mycobacterium Avium* and *Mycobacterium Tuberculosis* by a Mycobacteriophage Delivered by a Nonvirulent Mycobacterium: A Model for Phage Therapy of Intracellular Bacterial Pathogens». *The Journal of Infectious Diseases* 186 (8): 1155–60. <https://doi.org/10.1086/343812>.
- Bruce, John B., Robyn Manley, Elvina Smith, Philippe Carmona, Sylvain Gandon, e Edze R. Westra. 2026. «Temperate Phage Evolve to Integrate Host Stress and Quorum Signals in Lysis–Lysogeny Decisions». *PLOS Biology* 24 (1): e3003567. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3003567>.
- Bryant, Josephine M., Dorothy M. Grogono, Daniela Rodriguez-Rincon, et al. 2016. «Emergence and Spread of a Human-Transmissible Multidrug-Resistant Nontuberculous Mycobacterium». *Science* 354 (6313): 751–57. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8156>.
- Cao Yao, Juan Carlos, Damir Garcia Cehic, Josep Quer, et al. 2024. «Complete Genome Sequences of Four Mycobacteriophages Involved in Directed Evolution against Undisputed Mycobacterium Abscessus Clinical Strains». *Microorganisms* 12 (2): 374. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020374>.
- Carver, Tim, Simon R. Harris, Matthew Berriman, Julian Parkhill, e Jacqueline A. McQuillan. 2012. «Artemis: An Integrated Platform for Visualization and Analysis of High-Throughput Sequence-Based Experimental Data». *Bioinformatics* 28 (4): 464–69. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>.
- Cianci, Rossella, Mario Caldarelli, Paola Brani, et al. 2025. «Cytokines Meet Phages: A Revolutionary Pathway to Modulating Immunity and Microbial Balance». *Biomedicines* 13 (5): 1202. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13051202>.

- Coakley, Raymond D., Barbara R. Grubb, Anthony M. Paradiso, et al. 2003. «Abnormal Surface Liquid pH Regulation by Cultured Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (26): 16083–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.2634339100>.
- Cobián Güemes, Ana Georgina, Merry Youle, Vito Adrian Cantú, Ben Felts, James Nulton, e Forest Rohwer. 2016. «Viruses as Winners in the Game of Life». *Annual Review of Virology* 3 (1): 197–214. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-054952>.
- Comeau, André M., Graham F. Hatfull, Henry M. Krisch, Debbie Lindell, Nicholas H. Mann, e David Prangishvili. 2008. «Exploring the Prokaryotic Virosphere». *Research in Microbiology* 159 (5): 306–13. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.05.001>.
- Daffé, Mamadou, e Hedia Marrakchi. 2019. «Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope». *Microbiology Spectrum* 7 (4): 7.4.1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018>.
- Daher, Wassim, Vincent Le Moigne, Yara Tasrini, et al. 2025. «Deletion of ESX-3 and ESX-4 Secretion Systems in Mycobacterium Abscessus Results in Highly Impaired Pathogenicity». *Communications Biology* 8 (1): 166. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07572-4>.
- Daniel-Wayman, Shelby, Getahun Abate, Daniel L. Barber, et al. 2019. «Advancing Translational Science for Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections. A Road Map for Research». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 199 (8): 947–51. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1273PP>.
- Danilchanka, Olga, Mikhail Pavlenok, e Michael Niederweis. 2008. «Role of Porins for Uptake of Antibiotics by *Mycobacterium Smegmatis*». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (9): 3127–34. <https://doi.org/10.1128/AAC.00239-08>.
- Davies, Julian, e Dorothy Davies. 2010. «Origins and Evolution of Antibiotic Resistance». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (3): 417–33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.
- Dedrick, Rebekah M., Lawrence Abad, Nathaniel Storey, et al. 2023. «The Problem of Mycobacterium Abscessus Complex: Multi-Drug Resistance, Bacteriophage Susceptibility and Potential Healthcare Transmission». *Clinical Microbiology and Infection* 29 (10): 1335.e9-1335.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.06.026>.

- Dedrick, Rebekah M., Carlos A. Guerrero-Bustamante, Rebecca A. Garlena, et al. 2019. «Engineered Bacteriophages for Treatment of a Patient with a Disseminated Drug-Resistant Mycobacterium Abscessus». *Nature Medicine* 25 (5): 730–33. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>.
- Dedrick, Rebekah M., Bailey E. Smith, Madison Cristinziano, et al. 2023. «Phage Therapy of *Mycobacterium* Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease». *Clinical Infectious Diseases* 76 (1): 103–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac453>.
- Dedrick, Rebekah M., Bailey E. Smith, Rebecca A. Garlena, et al. 2021. «Mycobacterium Abscessus Strain Morphotype Determines Phage Susceptibility, the Repertoire of Therapeutically Useful Phages, and Phage Resistance». *mBio* 12 (2): e03431-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03431-20>.
- Degiacomi, Giulia, José Camilla Sammartino, Laurent Roberto Chiarelli, Olga Riabova, Vadim Makarov, e Maria Rosalia Pasca. 2019. «Mycobacterium Abscessus, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (23): 5868. <https://doi.org/10.3390/ijms20235868>.
- Delgado-Rizo, Vidal, Marco A. Martínez-Guzmán, Liliana Iñiguez-Gutierrez, Alejandra García-Orozco, Anabell Alvarado-Navarro, e Mary Fafutis-Morris. 2017. «Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview». *Frontiers in Immunology* 8 (febbraio). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00081>.
- Druszczynska, Magdalena, Beata Sadowska, Agnieszka Zablotni, Lesia Zhuravska, Jakub Kulesza, e Marek Fol. 2025. «Mycobacteriophages in the Treatment of Mycobacterial Infections: From Compassionate Use to Targeted Therapy». *Applied Sciences* 15 (15): 8543. <https://doi.org/10.3390/app15158543>.
- Dublanchet, Alain, e Shawna Bourne. 2007. «The Epic of Phage Therapy». *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 18 (1): 15–18. <https://doi.org/10.1155/2007/365761>.
- Duckworth, D. H. 1976. «Who Discovered Bacteriophage?» *Bacteriological Reviews* 40 (4): 793–802. <https://doi.org/10.1128/br.40.4.793-802.1976>.

- Ehlers, Stefan, e Ulrich E. Schaible. 2013. «The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion». *Frontiers in Immunology* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>.
- Esther, Charles R., Denise A. Esserman, Peter Gilligan, Alan Kerr, e Peadar G. Noone. 2010. «Chronic Mycobacterium Abscessus Infection and Lung Function Decline in Cystic Fibrosis». *Journal of Cystic Fibrosis* 9 (2): 117–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.12.001>.
- Fausti, Elisa, Andrea Bonacorsi, Novella Cesta, et al. 2025. «Characterisation of Four Novel Bacteriophages Targeting Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* and Their Lytic Activity Alone and in Combination». *Current Research in Microbial Sciences* 9: 100509. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2025.100509>.
- Fischer, Horst, e Jonathan H. Widdicombe. 2006. «Mechanisms of Acid and Base Secretion by the Airway Epithelium». *Journal of Membrane Biology* 211 (3): 139–50. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0861-0>.
- Floto, R. Andres, Kenneth N. Olivier, Lisa Saiman, et al. 2016. «US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society Consensus Recommendations for the Management of Non-Tuberculous Mycobacteria in Individuals with Cystic Fibrosis». *Thorax* 71 (Suppl 1): i1–22. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207360>.
- Fruciano, Dottore Emiliano, e Shawna Bourne. 2007. «Phage as an Antimicrobial Agent: D’herelle’s Heretical Theories and Their Role in the Decline of Phage Prophylaxis in the West». *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 18 (1): 19–26. <https://doi.org/10.1155/2007/976850>.
- Gordillo Altamirano, Fernando L., e Jeremy J. Barr. 2019. «Phage Therapy in the Postantibiotic Era». *Clinical Microbiology Reviews* 32 (2): e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>.
- Górski, Andrzej, Krystyna Dąbrowska, Ryszard Międzybrodzki, et al. 2017. «Phages and Immunomodulation». *Future Microbiology* 12 (10): 905–14. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0049>.
- Grebenciucova, Elena, e Stephen VanHaerents. 2023. «Interleukin 6: At the Interface of Human Health and Disease». *Frontiers in Immunology* 14 (settembre): 1255533. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1255533>.

- Green, Michael Richard, e Joseph Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor laboratory press.
- Griffith, David E., Timothy Aksamit, Barbara A. Brown-Elliott, et al. 2007. «An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175 (4): 367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>.
- Gutiérrez, Ana Victoria, Albertus Viljoen, Eric Ghigo, Jean-Louis Herrmann, e Laurent Kremer. 2018. «Glycopeptidolipids, a Double-Edged Sword of the Mycobacterium Abscessus Complex». *Frontiers in Microbiology* 9 (giugno): 1145. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01145>.
- Hatfull, Graham F. 2014. «Molecular Genetics of Mycobacteriophages». *Microbiology Spectrum* 2 (2): 2.2.02. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0032-2013>.
- Hatfull, Graham F. 2015. «Innovations in Undergraduate Science Education: Going Viral». *Journal of Virology* 89 (16): 8111–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.03003-14>.
- Hatfull, Graham F. 2018. «Mycobacteriophages». *Microbiology Spectrum* 6 (5): 6.5.08. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018>.
- Hatfull, Graham F. 2020. «Actinobacteriophages: Genomics, Dynamics, and Applications». *Annual Review of Virology* 7 (1): 37–61. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-122019-070009>.
- Hatfull, Graham F. 2022. «Mycobacteriophages: From Petri Dish to Patient». *PLOS Pathogens* 18 (7): e1010602. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010602>.
- Hatfull, Graham F. 2023a. «Phage Therapy for Nontuberculous Mycobacteria: Challenges and Opportunities». *Pulmonary Therapy* 9 (1): 91–107. <https://doi.org/10.1007/s41030-022-00210-y>.
- Hatfull, Graham F. 2023b. «Phage Therapy for Nontuberculous Mycobacteria: Challenges and Opportunities». *Pulmonary Therapy* 9 (1): 91–107. <https://doi.org/10.1007/s41030-022-00210-y>.
- Hatfull, Graham F., Deborah Jacobs-Sera, Jeffrey G. Lawrence, et al. 2010. «Comparative Genomic Analysis of 60 Mycobacteriophage Genomes: Genome Clustering, Gene Acquisition, and

Gene Size». *Journal of Molecular Biology* 397 (1): 119–43.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.011>.

Hatfull, Graham F., Science Education Alliance Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science (SEA-PHAGES) Program, KwaZulu-Natal Research Institute for Tuberculosis and HIV (K-RITH) Mycobacterial Genetics Course, University of California–Los Angeles Research Immersion Laboratory in Virology, e Phage Hunters Integrating Research and Education (PHIRE) Program. 2016. «Complete Genome Sequences of 61 Mycobacteriophages». *Genome Announcements* 4 (4): e00389-16.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00389-16>.

Haworth, Charles S., John Banks, Toby Capstick, et al. 2017. «British Thoracic Society Guidelines for the Management of Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease (NTM-PD)». *Thorax* 72 (Suppl 2): ii1–64. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210927>.

Heydari, Hamed, Wei Yee Wee, Naline Lokanathan, et al. 2013. «MabsBase: A Mycobacterium Abscessus Genome and Annotation Database». *PLoS ONE* 8 (4): e62443.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062443>.

Hobbs, Zack, e Stephen T. Abedon. 2016. «Diversity of Phage Infection Types and Associated Terminology: The Problem with ‘Lytic or Lysogenic’». *FEMS Microbiology Letters* 363 (7): fnw047. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047>.

Howard-Varona, Cristina, Katherine R. Hargreaves, Stephen T. Abedon, e Matthew B. Sullivan. 2017. «Lysogeny in Nature: Mechanisms, Impact and Ecology of Temperate Phages». *The ISME Journal* 11 (7): 1511–20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>.

Ishikawa, Eri, Tetsuaki Ishikawa, Yasu S. Morita, et al. 2009. «Direct Recognition of the Mycobacterial Glycolipid, Trehalose Dimycolate, by C-Type Lectin Mincle». *Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 2879–88. <https://doi.org/10.1084/jem.20091750>.

Jang, Dan-in, A.-Hyeon Lee, Hye-Yoon Shin, et al. 2021. «The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5): 2719.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052719>.

- Johansen, Matt D., Jean-Louis Herrmann, e Laurent Kremer. 2020. «Non-Tuberculous Mycobacteria and the Rise of Mycobacterium Abscessus». *Nature Reviews Microbiology* 18 (7): 392–407. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>.
- Jończyk, E., M. Kłak, R. Międzybrodzki, e A. Górski. 2011. «The Influence of External Factors on Bacteriophages—Review». *Folia Microbiologica* 56 (3): 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.
- Kam, Julia Y., Elinor Hortle, Elizabeth Krogman, et al. 2022. «Rough and Smooth Variants of Mycobacterium Abscessus Are Differentially Controlled by Host Immunity during Chronic Infection of Adult Zebrafish». *Nature Communications* 13 (1): 952. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28638-5>.
- Kapoor, Hannah, Aaron M. Maves, Madeline A. Bowder, e Lia Danelishvili. 2025. «Phage-mediated TLR2 signaling attenuates intracellular Mycobacterium abscessus survival in macrophages». *Scientific Reports* 15 (1): 28504. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-07320-y>.
- Khan, Meraj A., Zubair Sabz Ali, Neil Swezey, Hartmut Grasemann, e Nades Palaniyar. 2019. «Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease from Childhood to Adulthood: Neutrophils, Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation, and NET Degradation». *Genes* 10 (3): 183. <https://doi.org/10.3390/genes10030183>.
- Kim, Hee-Youn, Byoung Jun Kim, Yoonwon Kook, et al. 2010. «Mycobacterium Massiliense Is Differentiated from Mycobacterium Abscessus and Mycobacterium Bolletii by Erythromycin Ribosome Methyltransferase Gene (Erm) and Clarithromycin Susceptibility Patterns: Characteristic Erm(41) of M. Massiliense». *Microbiology and Immunology* 54 (6): 347–53. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00221.x>.
- Lee, Meng-Rui, Wang-Huei Sheng, Chien-Ching Hung, Chong-Jen Yu, Li-Na Lee, e Po-Ren Hsueh. 2015. «Mycobacterium Abscessus Complex Infections in Humans». *Emerging Infectious Diseases* 21 (9). <https://doi.org/10.3201/2109.141634>.
- López-Roa, Paula, Jaime Esteban, e María-Carmen Muñoz-Egea. 2022. «Updated Review on the Mechanisms of Pathogenicity in Mycobacterium Abscessus, a Rapidly Growing Emerging Pathogen». *Microorganisms* 11 (1): 90. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010090>.

- Luong, Tiffany, Ann-Charlott Salabarria, e Dwayne R. Roach. 2020. «Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going?» *Clinical Therapeutics* 42 (9): 1659–80. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.014>.
- Luthra, Sakshi, Anna Rominski, e Peter Sander. 2018. «The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium Abscessus Drug Resistance». *Frontiers in Microbiology* 9 (settembre): 2179. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02179>.
- Lynn, M., A. R. Wilson, e M. Solotorovsky. 1979. «Role of Bovine Serum Albumin in the Nutrition of Mycobacterium Tuberculosis». *Applied and Environmental Microbiology* 38 (5): 806–10. <https://doi.org/10.1128/aem.38.5.806-810.1979>.
- Malcolm, Kenneth C., Silvia M. Caceres, Kerstin Pohl, et al. 2018. «Neutrophil Killing of Mycobacterium Abscessus by Intra- and Extracellular Mechanisms». *PLOS ONE* 13 (4): e0196120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196120>.
- McCallin, Shawna, Jessica C. Sacher, Jan Zheng, e Benjamin K. Chan. 2019. «Current State of Compassionate Phage Therapy». *Viruses* 11 (4): 343. <https://doi.org/10.3390/v11040343>.
- Melbouci, Dyhia, Ahmad Haidar Ahmad, e Patrice Decker. 2023. «Neutrophil Extracellular Traps (NET): Not Only Antimicrobial but Also Modulators of Innate and Adaptive Immunities in Inflammatory Autoimmune Diseases». *RMD Open* 9 (3): e003104. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2023-003104>.
- Mendoza-Trujillo, Ilse, Patricia Diez-Echave, Chiara Tontini, e Silvia Bulfone-Paus. 2025. «The Crosstalk Between Mycobacterium Abscessus and Immune Cells: Exploring Novel Interaction Modalities». *Cells* 14 (22): 1829. <https://doi.org/10.3390/cells14221829>.
- Miernikiewicz, Paulina, e Krystyna Dąbrowska. 2022. «Endocytosis of Bacteriophages». *Current Opinion in Virology* 52 (febbraio): 229–35. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.009>.
- Nash, Kevin A., Barbara A. Brown-Elliott, e Richard J. Wallace. 2009. «A Novel Gene, *Erm* (41), Confers Inducible Macrolide Resistance to Clinical Isolates of *Mycobacterium Abscessus* but Is Absent from *Mycobacterium Chelonae*». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (4): 1367–76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-08>.

- Nasiri, Mohammad J., Mehri Haeili, Mona Ghazi, et al. 2017. «New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria». *Frontiers in Microbiology* 8 (aprile): 681. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00681>.
- Nayak, Tanmayee, Anuja Kakkar, Rakesh Kumar Singh, et al. 2023. «Isolation and Characterization of a Novel Mycobacteriophage Kashi-VT1 Infecting Mycobacterium Species». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13 (luglio): 1173894. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1173894>.
- Nguyen, Thanh Quang, Bo Eun Heo, Seunghyeon Jeon, et al. 2024. «Exploring Antibiotic Resistance Mechanisms in Mycobacterium Abscessus for Enhanced Therapeutic Approaches». *Frontiers in Microbiology* 15 (febbraio): 1331508. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1331508>.
- Okonechnikov, Konstantin, Olga Golosova, Mikhail Fursov, e the UGENE team. 2012. «Unipro UGENE: A Unified Bioinformatics Toolkit». *Bioinformatics* 28 (8): 1166–67. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
- Olson, Robert D., Rida Assaf, Thomas Brettin, et al. 2023. «Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): A Resource Combining PATRIC, IRD and ViPR». *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D678–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>.
- Opperman, Christoffel Johannes, e Adrian J. Brink. 2025. «Phage Therapy for Mycobacteria: Overcoming Challenges, Unleashing Potential». *Infectious Disease Reports* 17 (2): 24. <https://doi.org/10.3390/idr17020024>.
- Papayannopoulos, Venizelos, Kathleen D. Metzler, Abdul Hakkim, e Arturo Zychlinsky. 2010. «Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase Regulate the Formation of Neutrophil Extracellular Traps». *Journal of Cell Biology* 191 (3): 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>.
- Parmar, Shweta, e Elitza I. Tocheva. 2023. «The Cell Envelope of Mycobacterium Abscessus and Its Role in Pathogenesis». *PLOS Pathogens* 19 (5): e1011318. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011318>.
- Perea, Lidia, Lorena Rodríguez-Rubio, Juan C. Nieto, et al. 2021. «Bacteriophages Immunomodulate the Response of Monocytes». *Experimental Biology and Medicine* 246 (11): 1263–68. <https://doi.org/10.1177/1535370221995154>.

- Pereira, André C., Beatriz Ramos, Ana C. Reis, e Mónica V. Cunha. 2020. «Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of Virulence and Adaptation to Ecological Niches». *Microorganisms* 8 (9): 1380. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091380>.
- Pirnay, Jean-Paul. 2020. «Phage Therapy in the Year 2035». *Frontiers in Microbiology* 11 (giugno): 1171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01171>.
- Piuri, Mariana, Liliana Rondón, Estefanía Urdániz, e Graham F. Hatfull. 2013. «Generation of Affinity-Tagged Fluoromycobacteriophages by Mixed Assembly of Phage Capsids». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (18): 5608–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.01016-13>.
- Puissegur, Marie-Pierre, Catherine Botanch, Jean-Luc Duteyrat, Georges Delsol, Claude Caratero, e Frederic Altare. 2004. «An in Vitro Dual Model of Mycobacterial Granulomas to Investigate the Molecular Interactions between Mycobacteria and Human Host Cells». *Cellular Microbiology* 6 (5): 423–33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00371.x>.
- Roach, Dwayne R., Benoît Noël, Sylvie Chollet-Martin, et al. 2023. «Human Neutrophil Response to Pseudomonas Bacteriophage PAK_P1, a Therapeutic Candidate». *Viruses* 15 (8): 1726. <https://doi.org/10.3390/v15081726>.
- Rohde, Christine, Johannes Wittmann, e Elizabeth Kutter. 2018. «Bacteriophages: A Therapy Concept against Multi-Drug-Resistant Bacteria». *Surgical Infections* 19 (8): 737–44. <https://doi.org/10.1089/sur.2018.184>.
- Russell, Daniel A., e Graham F. Hatfull. 2017. «PhagesDB: The Actinobacteriophage Database». *Bioinformatics* 33 (5): 784–86. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw711>.
- Sampson, Timothy, Gregory W. Broussard, Laura J. Marinelli, et al. 2009. «Mycobacteriophages BPs, Angel and Halo: Comparative Genomics Reveals a Novel Class of Ultra-Small Mobile Genetic Elements». *Microbiology* 155 (9): 2962–77. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030486-0>.
- Satish, Rajitha, e Anita Desouza. 2019. «Study of Characteristics of Mycobacteriophage – A Novel Tool to Treat Mycobacterium Spp.» *International Journal of Mycobacteriology* 8 (2): 170. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_42_19.
- Saxena, Saloni, Herman P. Spaink, e Gabriel Forn-Cuní. 2021. «Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models». *Biology* 10 (2): 96. <https://doi.org/10.3390/biology10020096>.

- Schmalstig, Alan A., Andrew Wiggins, Debbie Badillo, Katherine S. Wetzel, Graham F. Hatfull, e Miriam Braunstein. 2024. «Bacteriophage Infection and Killing of Intracellular *Mycobacterium Abscessus*». *mBio* 15 (1): e02924-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.02924-23>.
- Shang, Jiayu, Cheng Peng, Xubo Tang, e Yanni Sun. 2023. «PhaVIP: Phage Virion Protein Classification Based on Chaos Game Representation and Vision Transformer». *Bioinformatics* 39 (Supplement_1): i30–39. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad229>.
- Sinha, Avni, Kandasamy Eniyan, Prasanth Manohar, Nachimuthu Ramesh, e Urmi Bajpai. 2020. «Characterization and Genome Analysis of B1 Sub-Cluster Mycobacteriophage PDRPxv». *Virus Research* 279 (aprile): 197884. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197884>.
- Skolnik, Kate, Gordon Kirkpatrick, e Bradley S. Quon. 2016. «Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis». *Current Treatment Options in Infectious Diseases* 8 (4): 259–74. <https://doi.org/10.1007/s40506-016-0092-6>.
- Sollberger, Gabriel, Dorothea Ogmone Tilley, e Arturo Zychlinsky. 2018. «Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization». *Developmental Cell* 44 (5): 542–53. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.019>.
- Souza, Estêvão Brasiliense De, Aguinaldo Roberto Pinto, e Gislaine Fongaro. 2023. «Bacteriophages as Potential Clinical Immune Modulators». *Microorganisms* 11 (9): 2222. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092222>.
- Sparks, Ian L., Keith M. Derbyshire, William R. Jacobs, e Yasu S. Morita. 2023. «Mycobacterium Smegmatis: The Vanguard of Mycobacterial Research». *Journal of Bacteriology* 205 (1): e00337-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00337-22>.
- Strathdee, Steffanie A., Graham F. Hatfull, Vivek K. Mutalik, e Robert T. Schooley. 2023. «Phage Therapy: From Biological Mechanisms to Future Directions». *Cell* 186 (1): 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017>.
- Suarez, Cristian Alejandro, Jorgelina Judith Franceschelli, e Héctor Ricardo Morbidoni. 2019. «Mycobacteriophage CRB2 Defines a New Subcluster in Mycobacteriophage Classification». *PLOS ONE* 14 (2): e0212365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212365>.
- Sullivan, Mitchell J., Nicola K. Petty, e Scott A. Beatson. 2011. «Easyfig: A Genome Comparison Visualizer». *Bioinformatics* 27 (7): 1009–10. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>.

- Tedeschi, Rosamaria, e Paolo De Paoli. 2011. «Collection and Preservation of Frozen Microorganisms». In *Methods in Biobanking*, a cura di Joakim Dillner, vol. 675. Methods in Molecular Biology. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-423-0_18.
- To, Kimberly, Ruoqiong Cao, Aram Yegiazaryan, James Owens, e Vishwanath Venketaraman. 2020. «General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: Mycobacterium Avium and Mycobacterium Abscessus». *Journal of Clinical Medicine* 9 (8): 2541. <https://doi.org/10.3390/jcm9082541>.
- Tortoli, Enrico, Thomas A. Kohl, Barbara A. Brown-Elliott, et al. 2016. «Emended Description of Mycobacterium Abscessus, Mycobacterium Abscessus Subsp. Abscessus and Mycobacterium Abscessus Subsp. Bolletii and Designation of Mycobacterium Abscessus Subsp. Massiliense Comb. Nov.» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (11): 4471–79. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001376>.
- Turner, Dann, Andrew M. Kropinski, e Evelien M. Adriaenssens. 2021. «A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy». *Viruses* 13 (3): 506. <https://doi.org/10.3390/v13030506>.
- Urban, Constantin F., David Ermert, Monika Schmid, et al. 2009. «Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against Candida Albicans». *PLoS Pathogens* 5 (10): e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>.
- Van Belleghem, Jonas D., Frédéric Clement, Maya Merabishvili, Rob Lavigne, e Mario Vaneechoutte. 2017. «Pro- and Anti-Inflammatory Responses of Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by Staphylococcus Aureus and Pseudomonas Aeruginosa Phages». *Scientific Reports* 7 (1): 8004. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08336-9>.
- Vandal, Omar H., Lynda M. Pierini, Dirk Schnappinger, Carl F. Nathan, e Sabine Ehrt. 2008. «A Membrane Protein Preserves Intrabacterial pH in Intraphagosomal Mycobacterium Tuberculosis». *Nature Medicine* 14 (8): 849–54. <https://doi.org/10.1038/nm.1795>.
- Wallace, R. J., G. Dukart, B. A. Brown-Elliott, D. E. Griffith, E. G. Scerpella, e B. Marshall. 2014. «Clinical Experience in 52 Patients with Tigecycline-Containing Regimens for Salvage Treatment of Mycobacterium Abscessus and Mycobacterium Chelonae Infections». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (7): 1945–53. <https://doi.org/10.1093/jac/dku062>.

- Wei, Yali, Mengxi Wang, Yuwen Ma, Zhenni Que, e Dengbo Yao. 2021. «Classical Dichotomy of Macrophages and Alternative Activation Models Proposed with Technological Progress». *BioMed Research International* 2021 (1): 9910596. <https://doi.org/10.1155/2021/9910596>.
- Whetstine, Johnathan R., e Capucine Van Rechem. 2022. «Protocol to Isolate Cells in Four Stages of S Phase for High-Resolution Replication-Timing Sequencing». *STAR Protocols* 3 (1): 101209. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101209>.
- Wick, Ryan R., Louise M. Judd, Claire L. Gorrie, e Kathryn E. Holt. 2017. «Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads». *PLOS Computational Biology* 13 (6): e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- Yukgehnaish, Kumarasan, Heera Rajandas, Sivachandran Parimannan, et al. 2022. «PhageLeads: Rapid Assessment of Phage Therapeutic Suitability Using an Ensemble Machine Learning Approach». *Viruses* 14 (2): 342. <https://doi.org/10.3390/v14020342>.
- Zakhareva, Ekaterina V., Billy A. Martini, e Elena G. Salina. 2025. «Mechanisms of Virulence of Mycobacterium Abscessus and Interaction with the Host Immune System». *Biochemistry (Moscow)* 90 (S1): S214–32. <https://doi.org/10.1134/S0006297924603496>.