

***Alma Mater Studiorum – Università di Bologna***

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE ZONOSI**

*Ciclo XXIII*

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza: VET/05**

**MALATTIE INFETTIVE DEGLI ANIMALI DOMESTICI**

*Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ ZnuABC, un nuovo approccio vaccinale per la profilassi delle Salmonellosi animali. Valutazione di efficacia in un modello sperimentale murino e suino.

**Presentata da: MICHELE PESCIAROLI**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatori**

**PROF. GIOVANNI POGLAYEN**

**PROF. RENATO GIULIO ZANONI**

**DOTT. PAOLO PASQUALI**

Esame finale anno 2011

## 1.INTRODUZIONE

Le malattie infettive sono responsabili di circa il 25% dei decessi umani su scala globale. E' stato calcolato che il 61% degli agenti patogeni (virus, batteri, parassiti e funghi) che causano malattia nell'uomo è di origine zoonotica cioè naturalmente trasmissibile dagli animali vertebrati all'uomo [1]. Le zoonosi finora descritte sono circa 200, alcune di esse sono conosciute da secoli, altre, al contrario, sono state identificate solamente nel recente passato. Infatti, il 75% dei microrganismi riconosciuti essere patogeni emergenti per l'uomo, usa come serbatoi o diffusori un'ampia gamma di specie animali sia domestiche che selvatiche [2]. Il genere umano acquisisce l'infezione dal vertebrato che funge da serbatoio per contatto diretto, indiretto o tramite l'intervento di artropodi vettori. Le malattie che ne derivano possono avere sintomi lievi o essere addirittura fatali. Questa evenienza è più probabile nel caso vengano a mancare i necessari presidi terapeutici come è purtroppo abituale nella maggioranza degli abitanti dei paesi in via di sviluppo, o quando a essere colpito sia un soggetto la cui risposta immunitaria sia inefficace: giovane, anziano, gestante o immunocompromesso (YOPI; Young, Old, Pregnant, Immunocompromised).

Una importante via di trasmissione delle zoonosi è quella alimentare e questa modalità ha acquisito una particolare importanza negli ultimi anni soprattutto nei paesi cosiddetti "sviluppati" sia per l'impatto che focolai di tossinfezione alimentare possono avere sulla salute pubblica, sia per gli effetti economici da essi derivanti.

L'allarme generato dalle emergenze che, a turno, hanno interessato diverse categorie di alimenti e il clamore mediatico levatosi intorno ad esse, ha indotto repentine modifiche delle abitudini alimentari dei consumatori determinando, di riflesso, perdite economiche all'industria alimentare e alla zootecnia.

La Comunità Europea, in seguito alle emergenze che hanno investito il settore dell'industria alimentare alla fine del decennio scorso, ha intrapreso una serie di iniziative legislative volte a restituire fiducia ai cittadini europei circa la sicurezza degli alimenti e la capacità delle autorità di proteggere la salute dei consumatori. Il Regolamento (CE) 178/2002 ha uniformato a livello comunitario le disposizioni di legge in materia di sicurezza alimentare fissando dei principi comuni a cui tutti gli Stati Membri devono attenersi e ha istituito l' Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), un organo scientifico indipendente destinato a fornire consulenza alla Commissione e al Parlamento nella valutazione e comunicazione di rischi legati agli alimenti. La direttiva 99/2003 (conosciuta anche come direttiva zoonosi) ha definito una strategia di lotta alle zoonosi prioritizzando le malattie da combattere e obbligando ogni Stato Membro a istituire, per alcune di esse, dei piani di sorveglianza volti ad una raccolta di dati armonizzata in grado di permettere la comparazione dei risultati provenienti dai diversi Stati. Gli Stati Membri raccolgono e analizzano i dati relativi all'incidenza di zoonosi, di agenti zoonotici e di resistenza agli antimicrobici e, sulla base di questi, redicono e trasmettono annualmente alla Commissione una relazione riguardante le tendenze e le fonti di zoonosi. La Commissione trasmette le relazioni all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare che emette un rapporto annuale riassuntivo della situazione osservata a livello comunitario. Un approccio basato sull'analisi del rischio ha guidato l'adozione di misure specifiche nei confronti delle zoonosi che incidono maggiormente sulla salute dei cittadini europei.

La gran parte dei casi di zoonosi è trasmessa per via alimentare ed è imputabile a *Salmonella* spp e *Campylobacter* spp. Il Regolamento Europeo 2160/2003 da applicazione alla gestione del rischio prevedendo delle misure per l'individuazione e il controllo di alcune serovar di *Salmonella* lungo tutta la filiera alimentare ma soprattutto a livello di produzione primaria. Gli Stati Membri si impegnano a ridurre la prevalenza di *Salmonella* in determinate popolazioni di animali domestici; la definizione di obiettivi di riduzione ragionevoli è stata compiuta sulla base dei risultati di indagini volte a stimare a livello comunitario la prevalenza di *Salmonella* nelle popolazioni animali di

interesse (Baseline survey). Le indagini, iniziate in tempi differenti secondo l'ordine stabilito dal Regolamento 2160/2003, sono tutte terminate. Ogni Stato Membro ha quindi sottoposto all'approvazione della Commissione Europea un proprio piano di controllo attraverso il quale intende raggiungere gli obiettivi stabiliti. I piani di controllo finora adottati hanno riguardato i riproduttori delle specie *Gallus gallus* (pollo) e *Meleagris gallopavo* (tacchino), le galline ovaiole, i polli (Broiler) e tacchini da carne. Questo ordine di intervento è stato definito poiché gli alimenti di origine avicola, uova e ovoprodotti in particolare, vengono ascritti fra le principali cause di infezione. Nella messa a punto dei piani di controllo per l'allevamento avicolo è stato tenuto conto dell'organizzazione tipicamente piramidale di questa produzione zootecnica. Un numero limitato di riproduttori produce quantità elevatissime di animali che costituiscono la produzione avicola mondiale sia di carne che di uova. In tale situazione, la presenza di *Salmonella* all'apice della struttura produttiva, quindi nei riproduttori, può portare alla rapida diffusione agli allevamenti di broiler e di ovaiole, costituendo un grave rischio per la salute pubblica. Per questi motivi il programma ha l'obiettivo di ridurre negli allevamenti di riproduttori (all'apice della piramide) la prevalenza di sierotipi rilevanti per la salute pubblica allo scopo di ottenere una notevole diminuzione della prevalenza nelle altre categorie produttive (galline ovaiole e broiler) con l'obiettivo finale di ridurre l'infezioni da *Salmonella* nell'uomo.

La relazione annuale redatta dall'EFSA riguardante le tendenze e le fonti di zoonosi e agenti zoonotici osservati a livello comunitario durante l'anno 2009 [5], ha evidenziato una diminuzione del 17,4% dei casi umani di salmonellosi (108 614). L'andamento è già in atto da qualche anno, ma è stato più marcato rispetto al 2008 quando si sono registrati 131 468 infezioni. Questo risultato è stato possibile poiché molti degli Stati Membri hanno raggiunto gli obiettivi di riduzione di prevalenza di *Salmonella* nelle specie avicole. L'efficacia dei piani di controllo è testimoniata dal calo dell'incidenza nell'uomo di infezioni da *Salmonella enterica*, serovar Enteritidis predominante nel pollame.

La relazione dell'EFSA [5] ha confermato che accanto a uova e ovo prodotti, la matrice alimentare

fonte di infezioni umane e' la carne di maiale.

Del 2007 e 2008 sono le due ultime baseline surveys previste dal Regolamento 2160/2003 volte ad appurare la prevalenza di *Salmonella* in suini inviati al macello e in suini riproduttori. I risultati hanno evidenziato una massiccia presenza dell'infezione nell'allevamento suino. L'esame colturale dei linfonodi ileocecali di suini inviati al macello ha permesso l'isolamento di 87 differenti serovar, con una prevalenza compresa, a seconda degli Stati Membri, tra lo 0% e il 29% e con una media europea del 10.3%. Nel caso dei suini riproduttori la stima della prevalenza e' stata valutata a partire da campioni fecali raccolti nelle porcilaie. L'obiettivo era valutare il contributo dei riproduttori alla disseminazione di *Salmonella* lungo la catena dell'allevamento suino. La stima della prevalenza ha permesso di evidenziare un'estrema diffusione di *Salmonella* all'interno della popolazione, il batterio, infatti, è stato identificato nel 31,3 % delle porcilaie. *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Derby sono state le serovar isolate più di frequente in entrambe le categorie produttive dimostrando di essere le più diffuse all'interno della filiera suinicola europea. Sebbene non ci siano dati precisi su quale rischio costituisca la carne di maiale per l'uomo, e' ormai accettato che una grossa porzione di infezioni da *Salmonella* Typhimurium sia dovuto al consumo di carne suina [3, 4, 5]. I dati raccolti con le baseline surveys serviranno presto a definire gli ultimi due obiettivi di riduzione della prevalenza di *Salmonella* nei i suini inviati al macello e nei suini riproduttori. Gli Stati Membri dovranno, così come già compiuto per il pollame, sottoporre all'approvazione della Commissione Europea dei piani che consentano il raggiungimento di tali obiettivi.

Metodi finalizzati al controllo della salmonellosi nell'allevamento suino sono stati oggetto di un'attività di ricerca precedentemente alla emanazione di norme destinate alla tutela della sanità pubblica. La salmonellosi, infatti, è una malattia di notevole interesse anche per la sanità animale, essendo in grado di determinare una riduzione della produttività e di conseguenza provocare ingenti danni economici.

Gli approcci sperimentati per contrastare la diffusione della salmonellosi nell'allevamento suino

sono stati molteplici.

L'applicazione del principio dell'esclusione competitiva mediante la somministrazione a suinetti di colture di germi anaerobici provenienti dal contenuto cecale di suini privi di salmonellosi si è dimostrata utile per ridurre l'infezione ma inefficace nell'impedirla del tutto [6,7]. L'acidificazione dei mangimi e dell'acqua di bevanda mediante l'aggiunta di piccole percentuali di acidi organici quali acido lattico, acido propionico, acido formico ha dato risultati contrastanti, infatti la riduzione dell'eliminazione del batterio da parte di soggetti ammalati o la mancata colonizzazione di soggetti sani non è stata costante [8, 9, 10]. I Paesi scandinavi hanno saputo mettere in atto una strategia vincente nel controllo della *Salmonella* basata sulla costante applicazione di misure volte a ridurre la presenza del batterio e stringenti norme di biosicurezza. L'accurata pulizia e disinfezione dei locali di allevamento, l'eliminazione di animali positivi a prove colturali o sierologiche, il rigoroso controllo di mangimi e di animali infestanti ha portato la prevalenza di *Salmonella* a valori prossimi allo zero. Questa tipologia di intervento ha dei costi insostenibili per Paesi dove esistono allevamenti di grandi dimensioni in cui la presenza di *Salmonella* è endemica [11]. La vaccinazione potrebbe essere il metodo cui ricorrere per diminuire il numero di animali che arriva ai mattatoi con *Salmonella*. I vaccini spenti sono inefficaci nel prevenire l'infezione da *Salmonella*, la disponibilità di vaccini vivi attenuati è estremamente limitata. A livello comunitario l'unico vaccino vivo attenuato è commercializzato solamente in Germania. Il ritardo allo sviluppo di un presidio vaccinale efficace è dovuto alla scarsa conoscenza dell'interazione *Salmonella*-ospite vertebrato. Tradizionalmente, l'attenuazione dei batteri per la messa a punto di vaccini vivi attenuati è stata ricercata attraverso passaggi seriali in vari terreni di coltura, nella speranza che una mutazione spontanea del genoma del microrganismo, avesse potuto generare un agente dotato di una minore virulenza ma provvisto di una inalterata capacità replicativa.

Lo sviluppo e il continuo miglioramento della genomica, ha reso possibile non solo l'identificazione e la caratterizzazione delle delezioni/modificazioni casuali, ma un più razionale e mirato allestimento di vaccini vivi mediante la delezione di geni noti. I bersagli ottimali di tali

manipolazioni genetiche sono sia geni codificanti per specifici fattori di virulenza che geni coinvolti in passaggi chiave di processi metabolici. L'alterazione di queste porzioni del genoma può determinare una riduzione della virulenza del batterio permettendo al contempo lo sviluppo di una risposta immunitaria da parte dell'organismo con cui giunge a contatto.

Lo sviluppo di vaccini è stato anche frenato dalla mancanza di un modello animale ottimale su cui condurre l'attività di ricerca.

*S. Typhimurium* è in grado di infettare una grande varietà di specie animali, la malattia assume caratteristiche differenti in funzione dell'ospite interessato. Nell'uomo, nel bovino e nel maiale *S. Typhimurium* dà vita ad una enterocolite autolimitante che nella maggior parte dei casi si esaurisce senza una diffusione sistemica. La patogenesi dell'infezione da *Salmonella Typhimurium* nel suino è stata per lungo tempo poco indagata. Sebbene questa serovar sia responsabile di infezioni enteriche che possono evolvere in infezioni sistemiche ad esito letale, gli animali che si infettano, spesso possono diventare portatori e, senza sintomo alcuno, albergano il batterio nelle tonsille, nel tratto enterico e nel tessuto linfoide associato all'intestino [12,13]. Al contrario il topo, l'animale più utilizzato per la ricerca in immunologia e malattie infettive, se infettato con *Salmonella Typhimurium*, sviluppa il tifo murino, una infezione sistemica ad esito letale. Il topo è un modello sperimentale che mima eccellentemente l'infezione sistemica sostenuta da *Salmonella Typhi* dell'uomo (febbre tifoide), ma poco offre allo studio delle gastroenteriti umane e animali causate da *Salmonella* spp poiché non sviluppa un'infiammazione intestinale. La domanda per un modello sperimentale animale che consenta di decifrare la patogenesi delle infezioni gastroenteriche attende ancora di essere pienamente soddisfatta.

La possibilità di condurre l'attività di ricerca sull'enterite da *Salmonella* è stata recentemente fornita dalla messa a punto di un modello sperimentale murino caratterizzato da infiammazione intestinale [14]. La somministrazione di streptomina per via orale 24h prima dell'infezione è in grado di modificare la flora enterica [15, 16] permettendo a *Salmonella Typhimurium* di evocare

una tiflite e una colite. Dopo una fase iniziale prettamente enterica si sviluppa una concomitante infezione sistemica il cui destino dipende in larga parte dal background genetico dell'ospite. Infatti, topi, BALB/c e C57BL/6 (*It<sup>s</sup>*), estremamente suscettibili a *Salmonella* Typhimurium, soccombono a distanza di 5-6 giorni dall'inoculo del germe permettendo di indagare solo sulla fase acuta dell'infezione. Al contrario, topi DBA/2 e 129Sv/Ev (*It<sup>R</sup>*), più resistenti all'infezione, manifestano una mortalità ritardata a 10-11 giorni dall'inoculo batterico(DBA/2) o si dimostrano capaci di sopravvivere ad esso (129Sv/Ev) [17] Questo modello di infezione e' sicuramente un valido approccio allo studio dell'infezione intestinale.

La riduzione dell'impatto di *S. Typhimurium* sulla salute umana è legata al controllo della popolazione di suini portatori, i maggiori responsabili dell'introduzione della *Salmonella* nella catena alimentare [18, 19, 20]. L'uso di vaccini vivi attenuati è un potenziale strumento per il raggiungimento di questo scopo [21]. Il quadro clinico osservato in animali da reddito impone di saggiare la validità di nuovi potenziali vaccini in modelli sperimentali animali di salmonellosi gastroenterica. L'obiettivo di questo studio è stato quello di testare l'efficacia di ceppi attenuati di *Salmonella* Typhimurium, candidati ad essere usati come vaccini vivi attenuati da somministrare per via orale in un modello murino di salmonellosi intestinale (topo pretrattato con streptomicina). A tal fine abbiamo utilizzato una mutante denominata *S. Typhimurium* SA186, significativamente attenuata per via della delezione dell'intero operone *znuABC* responsabile di codificare per la sintesi di una pompa per la captazione dello zinco all'interno dell'organismo ospite [22]. Una precedente serie di esperimenti [23] ha dimostrato che *Salmonella* Typhimurium SA 186 è un promettente vaccino mucosale, in grado di ridurre la colonizzazione degli organi sistemici e proteggere topi da infezioni challenge effettuati con ceppi batterici dotati di piena virulenza. Questo studio conferma le evidenze precedenti ed estende la protezione di *Salmonella* Typhimurium SA186 a infezioni challenge prevalentemente localizzate a livello enterico. I positivi risultati ottenuti nel modello murino sono poi stati confermati da tre distinte prove, due di queste effettuate su suini lattoni e un'ulteriore effettuata su suini magroni. Le prove su suini lattoni sono servite a validare la capacità



di *Salmonella* Typhimurium SA186 di indurre una risposta immunitaria protettiva nei confronti di un'infezione challenge indotta dalla somministrazione di un ceppo virulento di *Salmonella* Typhimurium. La prova su suini magroni è stata allestita per valutare la clearance di *Salmonella* Typhimurium SA186 somministrata per via orale.

I dati ottenuti da queste sperimentazioni consentono di supportare due affermazioni. Il modello murino di infezione gastroenterica può rappresentare un valido strumento per sostituire, ridurre e affinare l'uso di animali da reddito per provare l'efficacia di potenziali vaccini mucosali per *Salmonella* Typhimurium. *Salmonella* Typhimurium SA186 è un promettente vaccino mucosale, le cui potenzialità meritano di essere ulteriormente approfondite al fine di poterne disporre come mezzo per prevenire l'infezione da *Salmonella* Typhimurium virulente nella specie suina e di conseguenza ridurre i casi di malattia nell'uomo.

## **2.MATERIALI E METODI**

**2.1. Colture di *Salmonella* spp.** Nel corso della sperimentazione sono stati utilizzati:

– *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028);

–*Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) mancante dell'operone *znuABC* (*S.* Typhimurium SA186); tale ceppo, è stato ottenuto mediante inserzione di un frammento di PCR contenente la cassetta di resistenza alla kanamicina nell'operone *ZnuABC*, eseguita con un metodo descritto in precedenza da Datsenko et al. (2000).

–*Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) mancante dell'operone *znuABC* e con inserita una cassetta di resistenza per Cloramfenicolo e Streptomicina (*S.* Typhimurium SA355)

I ceppi batterici sono stati fatti crescere durante la notte in Brain Heart Infusion (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), raccolti mediante centrifugazione e lavati per due volte in soluzione fosfata tamponata (PBS) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) gelata.

## 2.2.Costituzione della mutante *Salmonella* Typhimurium SA 186

### Costituzione dei mutanti

*oligonucleotidi utilizzati:*

Oli119

GGAAGCCTTTATGGAGAAGTCGGTCAGGAATATCCCTGATTGTAGGCTGGAGCTGCTT  
CG

Oli120

CGCGCTATCTCTGGGGAGAGCCAAAGATGCATGTTATATTCATATGAATATCCTCCTTA  
G

Oli124

AAACCACGCGTACAAGCGTT

K1

CAGTCATAGCCGAATAGCCT)

oli 128

TCCTTTCAGGCAGCTCGCATACTGGTTGGCTAATTGGCTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC  
G

oli 130

CATCATACTGAAGATAAACAGCAGCGCGGCACACAGCACTCATATGAATATCCTCCTT  
AG

La costruzione della mutante *znuABC::kan* e' stata ottenuta per rimpiazzamento allelico con un frammenti di PCR [24] amplificati con gli oligonucleotidi oli-119 / oli-120 (per il mutante *znuA*) e oli-128 / oli-130 (per il mutante *znuABC*), usando come stampo per le reazioni il plasmide pKD4. I frammenti di PCR, che presentano brevi regioni di omologia con tratti di sequenza interni alla regione da eliminare e la cassetta di resistenza alla kanamicina, sono stati quindi introdotti per elettroporazione in *S.Typhimurium* ATCC 14028 contenente il plasmide pKD46, cresciuta in presenza di arabinosio a +30°C. I trasformanti, selezionati su piastre LB-kanamicina, sono stati testati per la loro incapacità di replicare in presenza di un chelante di metalli divalenti (EDTA 1mM); il corretto inserimento della cassetta di resistenza alla kanamicina è stato inoltre verificato per PCR utilizzando le coppie di oligonucleotidi oli-124 e K1 (che appaiano rispettivamente alcuni nucleotidi a monte di *znuABC* e internamente alla cassetta di resistenza alla kanamicina).

Gli alleli *znuA::kan* e *znuABC::kan* sono stati trasferiti per trasduzione generalizzata mediata dal fago P22 nel ceppo selvatico ATCC14028 di *S.Typhimurium*

La cassetta di resistenza alla kanamicina, inserita all'interno dell'operone *znuABC*, è stata eliminata per ricombinazione omologa tra i siti FRT fiancheggianti la cassetta, catalizzata dalla ricombinasi di lievito FLP, come descritto in Datsenko e Wanner [24]. Brevemente, il plasmide termosensibile pCP20, che esprime la ricombinasi FLP e conferisce resistenza alla ampicillina, è stato inserito per elettroporazione nel ceppo *znuABC::kan*. I trasformanti, cresciuti a +30°C, sono stati testati per la perdita della resistenza alla kanamicina e successivamente incubati a +37°C per consentire la perdita del plasmide pCP20 (verificata su piastre LB contenenti ampicillina).

Il ceppo così ottenuto è stato denominato SA 186 (*znuABC::SCAR*).

**2.3. Animali (topi).** Sono stati impiegati topi di sesso femminile con background DBA/2 ed un'età compresa tra le 8 e le 9 settimane (Harlan, Italia). L'impiego dei topi nella sperimentazione è stato effettuato nel rispetto di quanto stabilito dal Decreto Legislativo n. 116/1992. I topi sono stati acclimatati una settimana prima dell'inizio della sperimentazione e sono stati alimentati ad libitum con una dieta commerciale (Altromin-R diet, A. Rieper S.p.A., Vandoies, Italy). Gli animali sono stati inoculati direttamente nel lume gastrico tramite l'inserimento di un ago da gavage attraverso la via oroesofagea. I differenti ceppi di *Salmonella* sono stati somministrati sospesi in una soluzione acquosa contenente bicarbonato di sodio al 10% volto a neutralizzare l'acidità gastrica ed incrementare il tasso di sopravvivenza dei microorganismi.

**2.4. Animali (suini).** Nelle sperimentazioni sono stati impiegati suini ibridi commerciali di sesso maschile e femminile. Due prove di efficacia vaccinale sono state effettuate su suinetti di 18 giorni di età, ottenuti da allevamenti esenti da lungo periodo da episodi di salmonellosi. Gli animali sono stati stabulati presso le strutture dell'Istituto Superiore di Sanità e sistemati in due box posti a congrua distanza l'uno dall'altro al fine di evitare fenomeni di contaminazione crociata. Una prova di sicurezza, immunogenicità e clearance vaccinale su suini all'ingrasso è stata condotta su suini spf di 3 mesi di età circa, nati e stabulati in completo isolamento dall'ambiente esterno presso i locali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna sede di Brescia. Gli animali sono stati divisi in funzione del trattamento ricevuto e sistemati in stanze separate. Prima dell'inizio delle sperimentazioni si è appurato che nessun animale eliminasse *Salmonella* mediante un prelievo individuale delle feci di seguito poste in coltura per l'isolamento del batterio. Gli animali sono stati alimentati con mangime commerciale preventivamente sterilizzato e acqua potabile. I protocolli sperimentali sono stati approvati dal Ministero della Salute. I suini, sedati con azaperone (Janssen-Cilag, Cologno Monzese, Italia), sono stati inoculati direttamente nel lume gastrico tramite l'inserimento di una sonda orogastrica o inoculati per via intramuscolare mediante

iniezione a livello del collo. I ceppi di *Salmonella* somministrati per via orale sono stati sospesi in una soluzione acquosa contenente bicarbonato di sodio al 10% volto a neutralizzare l'acidità gastrica ed incrementare il tasso di sopravvivenza dei microorganismi.

## **2.5. Immunizzazione e infezione challenge**

Gruppi costituiti da 4 o 5 topi sono stati inoculati per via orale con  $2 \times 10^7$  UFC del ceppo attenuato *Salmonella* Typhimurium SA186 o adibiti a controllo ricevendo solamente tampone di bicarbonato di sodio. A 39 giorni dall'inoculo, gli animali immunizzati e gli animali controllo sono stati trattati per os con 20 mg di streptomina ciascuno (200  $\mu$ l di soluzione antibiotata o soluzione fisiologica sterile) 24 h prima della somministrazione intragastrica di  $2 \times 10^8$  UFC del ceppo virulento di *S.* Typhimurium ATCC14028. Alcuni dei topi immunizzati e alcuni topi controllo non hanno subito l'infezione challenge e sono stati lasciati come riferimento per le misurazioni istopatologiche. Gli animali sono stati lasciati digiuni per le 4 ore precedenti ogni inoculo, acqua e cibo sono stati restituiti 2h dopo questo.

## **2.6. Saggio di protezione**

I topi vaccinati e controllo, infettati come sopra descritto, sono stati osservati quotidianamente per monitorare la mortalità. Gli animali giunti ad uno stadio preagonico sono stati sottoposti ad eutanasia

## **2.7. Valutazione dell'infezione**

I topi sono stati soppressi per eutanasia a 4 e ad 11 giorni post infezione challenge. La milza, il cieco e il colon sono stati asetticamente rimossi, pesati e omogenati in soluzione salina con un rapporto volume campione e diluente di 1:9. Un'aliquota degli omogenati di organo è stata prelevata e conservata a  $-20^\circ\text{C}$  per la successiva quantificazione delle citochine prodotte. Il numero di UFC presenti nella milza è stato calcolato piastrando diluizioni scalari della sospensione cellulare ottenuta su piastre di Agar Triptone (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). La determinazione del numero

di batteri virulenti contenuti in cieco e colon è stata ottenuta modificando parzialmente un metodo colturale semiquantitativo precedentemente riportato da Wales [25]. Brevemente, 0,5 ml di ogni omogenato di tratto enterico è stata aggiunto a 4,5 ml di acqua peptonata tamponata (APT), (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). Da questa soluzione sono state eseguite delle diluizioni seriali decimali ottenute trasferendo sistematicamente 0,5 ml di ogni diluizione ottenuta in 4,5 ml di APT. Tutti i campioni di APT sono stati incubati a 37°C per 24h. Dopodiché, 1 ml di ogni sospensione batterica è stato trasferito in 9 ml di brodo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) e incubato a 41,5° C per 24h al fine di ottenere la selezione e l'arricchimento di *Salmonella*. Il giorno seguente la presenza di *Salmonella* è stata valutata strisciando con un'ansa 1 µl di brodo su piastre di Brilliant Green Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), di seguito incubate per una notte a 37°C. L'identità delle colonie di *Salmonella* cresciute è stata confermata mediante agglutinazione su vetrino eseguita con siero murino anti antigene-O (Remel , Lenexa, KS ,USA).

## **2.8. Produzione ex vivo di IFN- $\gamma$**

Le aliquote *in toto* di milza, cieco e colon, precedentemente omogenate in soluzione salina, sono state usate per quantificare *ex vivo* la produzione di IFN- $\gamma$ . Il livello di IFN- $\gamma$  è stato calcolato mediante un kit ELISA di fattura commerciale (Quantikine M kit; R&D Systems, Milano, Italia).

## **2.9. Istopatologia**

Segmenti casualmente selezionati di cieco e colon, sono stati fissati, imbevuti in paraffina e colorati con ematossilina ed eosina seguendo le tradizionali procedure. Ciascun organo di ogni animale è stato campionato in doppio. L'intensità dell'infiammazione tissutale è stata misurata sviluppando un metodo di valutazione semiquantitativo. Gli aspetti presi in considerazioni sono stati l'edema sottomucosale, l'infiltrato leucocitario e il danno epiteliale. In considerazione della severità e della distribuzione del quadro patologico osservato, un valore numerico da 0 a 3 e' stato attribuito secondo i seguenti criteri:

### **Edema sottomucosale.**

**Intensità.** 0 = No edema (in pratica assenza di spazio tra la muscularis mucosae e la tunica muscolare). 1 = Lieve (la sottomucosa ha ampiezza fino a 60 micron). 2 = Moderato (la sottomucosa ha ampiezza tra i 60 e i 300 micron). 3 = Pronunciato (la sottomucosa ha ampiezza tra i 300 e i 1000 micron). L'intensità' è stata misurata nell'area in cui la mucosa edematosa aveva maggiore ampiezza.

**Distribuzione.** 0 = No edema (in pratica assenza di spazio tra la muscularis mucosae e la tunica muscolare) nell'intera sezione. 1 = Lieve (l'edema è presente approssimativamente nel 5% della sezione). 2 = Moderato (l'edema è presente fino al 25% della sezione). 3 = Pronunciato (l'edema è presente fino al 50% o oltre della sezione)

### **Infiltrato leucocitario.**

**Intensità.** 0 = Infiltrato leucocitario raro o assente nella lamina propria e nella sottomucosa, ad eccezione dei piccoli follicoli linfoidi appartenenti al normale tessuto linfoide associato all'intestino (GALT). 1 = Moderato (l'infiltrato leucocitario occupa, nel sito di maggiore infiammazione della lamina propria e/o sottomucosa presente nella sezione, approssimativamente fino al 5% del campo visivo a 400X ingrandimenti). 2 = Moderato (l'infiltrato leucocitario occupa, nel sito di maggiore infiammazione della lamina propria e/o sottomucosa presente nella sezione, approssimativamente fino al 25% del campo visivo a 400X ingrandimenti) 3 = Pronunciato (l'infiltrato leucocitario occupa, nel sito di maggiore infiammazione della lamina propria e/o sottomucosa presente nella sezione, approssimativamente fino al 50% o oltre del campo visivo a 400X ingrandimenti. Possono essere, inoltre, presente esocitosi leucocitaria e migrazione dei leucociti nel lume)

**Distribuzione.** 0 = L'infiltrato leucocitario non va oltre i follicoli linfoidi del GALT. 1 = Lieve (infiltrato leucocitario di qualsiasi tipo e' presente approssimativamente nel 5% della sezione). 2 =

Moderato (infiltrato leucocitario di qualsiasi tipo e' presente approssimativamente nel 25% della sezione). 3 = Pronunciato (infiltrato leucocitario di qualsiasi tipo e' presente nel 50% od oltre della sezione).

### **Danno epiteliale.**

**Intensità.** 0 = Nessuna alterazione epiteliale presente. 1 = alterazioni a carico di singoli enterociti caratterizzate da attenuazione, corpi apoptotici e aumento della desquamazione luminale. 2 = necrosi di singoli enterociti con erosione di una o più cellule, l'integrità' della membrana basale e' conservata. 3 = Perdita degli enterociti con soluzione di continuo della membrana basale.

**Distribuzione.** 0 = Non sono presenti alterazioni nella sezione 1 = Le alterazioni epiteliali sono presenti approssimativamente nel 5% della sezione. 2 = Alterazioni epiteliali sono presenti approssimativamente nel 25% della sezione. 3 = Alterazioni epiteliali sono presenti approssimativamente nel 50% o oltre della sezione.

Il punteggio finale è il risultato dell'addizione dei punteggi ottenuti da ogni aspetto patologico preso in considerazione e ha raggiunto un valore numerico arbitrario di severità compreso tra 0 e 17.

### **2.10.Prove su suini lattoni.**

Sono state effettuate due prove su suini lattoni, in entrambi i casi gli animali sono stati immunizzati all'età' di 21 giorni. Nella prima prova 4 suini hanno ricevuto una dose di  $5 \times 10^9$ / suino di *S. Typhimurium* SA 186 sospesa in 10 ml di tampone bicarbonato e 3 suini sono stati lasciati come controllo ricevendo solo tampone bicarbonato sterile. A 21 giorni dall'immunizzazione entrambi i



gruppi sono stati infettati con  $10^{10}$ /suino del ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028 sospesi in 10 ml di tampone bicarbonato sterile. Gli animali sono stati sacrificati 7 giorni dopo l'infezione. Il rilievo della temperatura corporea, della conformazione fecale e un prelievo di feci da sottoporre ad esame batteriologico è stato effettuato al giorno e 1, 3, 7, 11, 14, 17, 21, 22, 23, 24, 28. Nella seconda prova 3 suini sono stati immunizzati con  $10^9$ /suino di *Typhimurium* SA 186 sospesi in 10 ml di tampone bicarbonato e 3 suini sono stati lasciati come controllo ricevendo solo tampone bicarbonato sterile. A 21 giorni dall'immunizzazione entrambi i gruppi sono stati infettati con  $10^{10}$ /suino del ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028 sospesi in 10 ml di tampone bicarbonato. Gli animali sono stati abbattuti a 15 giorni dall'infezione virulenta. Il rilievo della temperatura corporea, della conformazione fecale e un prelievo di feci da sottoporre ad esame batteriologico sono state effettuati con frequenze sostanzialmente sovrapponibili al primo approccio e precisamente a 1, 3, 6, 9, 13, 16, 21, 22, 29, 31, 37. Gli animali di entrambe le prove sono stati sacrificati, previa sedazione con azaperone, mediante iniezione intracardiaca di T-61 (Tanax®, Intervet, Segrate).

Le feci degli animali sono state pesate e omogenate in acqua peptonata tamponata (APT) (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) con un rapporto volume campione e diluente di 1:10. Da questa soluzione sono state eseguite delle diluizioni seriali decimali ottenute trasferendo sistematicamente 0,5 ml di ogni diluizione ottenuta in 4,5 ml di APT. Tutti i campioni di APT sono stati incubati a 37°C per 24h. Dopodiché, 0,1 ml di ogni sospensione batterica è stato trasferito in 9 ml di brodo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) e incubato a 41,5° C per 24h al fine di ottenere la selezione e l'arricchimento di *Salmonella*. Il giorno seguente la presenza di *Salmonella* è stata valutata strisciando con un'ansa 1 µl di brodo su piastre di Brilliant Green Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), di seguito incubate per una notte a 37°C. L'identità delle colonie di *Salmonella* cresciute è stata confermata mediante agglutinazione su vetrino eseguita con siero murino anti antigene-O (Remel, Lenexa, KS, USA).

## 2.11. Prove su suini da ingrasso

Gli animali sono stati divisi in 4 gruppi: tre gruppi di 6 animali sono stati sottoposti a vaccinazione e uno costituito da 8 animali e' stato mantenuto come controllo. Prima del trattamento, ogni animale è stato sottoposto a pesatura. Un gruppo di animali ha ricevuto una dose di  $5 \times 10^8$ /suino di *S. Typhimurium* SA355 sospesa in 20 ml di tampone bicarbonato. Un secondo gruppo di animali ha ricevuto una dose di  $5 \times 10^7$ /suino di *S. Typhimurium* SA355 sospesa in 20 ml di tampone bicarbonato. Il terzo gruppo di suini è stato immunizzato per via intramuscolare con una dose di  $2 \times 10^9$ /suino di *S. Typhimurium* ATCC 14028 inattivata, un secondo intervento è stato compiuto a 14 giorni dal primo. Gli animali di controllo hanno ricevuto 20 ml di soluzione sterile di tampone bicarbonato. Da ogni animale è stata prelevata un'aliquota di sangue, rilevata la temperatura e collezionato un campione di feci da sottoporre a coltura per l'isolamento di *Salmonella* al giorno 1, 2, 7, 14, 21 28 e 30. A ogni rilevazione temporale si è raccolto un tampone ambientale della stanza in cui il gruppo era ospitato. Al trentesimo giorno gli animali sono stati sottoposti a pesatura per valutare l'incremento ponderale avvenuto e sono stati sottoposti a challenge mediante inoculazione orale di  $10^9$ /suino di *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028. La rilevazione della temperatura corporea e l'escrezione di *S. Typhimurium* ATCC 14028 sono state valutate per ogni animale al giorno 2, 7, 9, 14 dopo l' infezione col batterio virulento. Il ventunesimo giorno dopo il challenge tutti gli animali sono stati pesati per valutare l'incremento ponderale avvenuto e quindi sono stati sottoposti ad eutanasia mediante stordimento con pistola a proiettile e dissanguamento .

L'isolamento di *Salmonella* dalle feci è stato compiuto tramite l'utilizzo di una metodica semiquantitativa. I campioni fecali prelevati sono stati sottoposti a pesatura, diluiti in rapporto 1:10 con acqua peptonata tamponata (APT) (produzione interna IZS LER), e omogenati con Stomacher (PBI International, Milano, Italia), e quindi lasciati riposare per 1 h a 20°C. Questa prima diluizione denominata diluizione 0 e' stata usata per effettuare altre 7 diluizioni in base 10 trasferendo

sistematicamente 0,5 ml di ogni diluizione ottenuta in 4,5 ml di APT . Tutte le diluizioni, da 0 alla -7, sono state incubate a 37°C +/- 1°C per 18+/- 3h. Dopodiché, 0,1 ml delle diluizioni 0, -1, -2 sono state seminate su Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) (produzione interna IZS LER) ed incubate a 41,5°C per 24h. Nel caso di crescita alla diluizione -2, le diluizioni dalla -3 alla -7, opportunamente conservate a temperatura di refrigerazione, sono sottoposte all'iter sopra descritto. La prima diluizione che ha dato esito negativo è servita per definire il livello massimo di contaminazione. L'isolamento della Salmonella dai tamponi ambientali è stato effettuato con una metodica qualitativa. I tamponi sono stati pesati e diluiti 1:10 in acqua peptonata e incubati a 37°C +/- 1°C per 18+/- 3h. Un volume di 0,1 ml della diluizione è stato su Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) (produzione interna IZS LER) ed incubato a 41,5°C per 24h. A prescindere dal metodo colturale (qualitativo o semiquantitativo), Dopo l'incubazione, di fronte ad una sospetta di Salmonella su MSRV (alone bianco intorno al punto di semina) si è effettuato un trapianto a colonie isolate sui terreni BGA (OXOID, Cambridge, Regno Unito) e XLD (Meus, Piove di Sacco, Italia). Le colonie sospette sono identificate con prove biochimiche ed inviate al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna sede di Brescia per la determinazione della serovar.

## **2.12. Analisi statistica**

Il tasso di mortalità è stato misurato usando il Kaplan-Meier test mediante il programma Graphpad PRISM 4.0 (GraphPad Software Inc. , San Diego, CA, USA). I dati sono espressi come media ± errori standard. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante Mann Whitney, un test non parametrico a due code. Le differenze sono state considerate significative quando  $P \leq 0.05$ .

### 3. RISULTATI

#### 3.1. *Salmonella* Typhimurium SA186 protegge da una infezione enterica in topi

Il primo obiettivo è stato quello di stabilire, in topi vaccinati con *S. Typhimurium* SA186 e in topi controllo, l'esito di una infezione challenge provocata da un ceppo virulento e localizzata a livello intestinale. A tal fine, la capacità protettiva conferita dalla somministrazione orale di *S. Typhimurium* SA186 è stata saggiata inducendo un'infezione dopo aver trattato gli animali con streptomicina che facilita la permanenza e la colonizzazione della salmonella in ambito enterico. Una dose di  $2 \times 10^8$  UFC di *S. Typhimurium* ATCC 14028 è stata capace di uccidere tutti gli animali controllo in meno di 20 giorni, indicando che questi animali hanno una spiccata suscettibilità all'infezione indotta dal ceppo virulento (Fig.1).

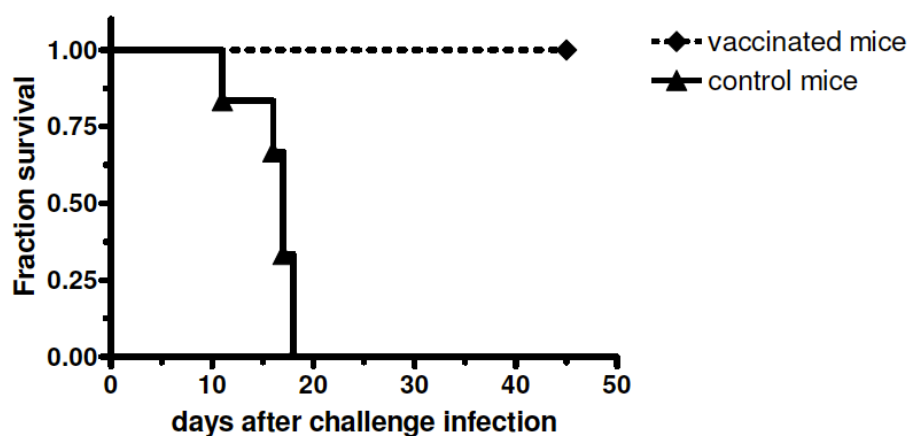


Figura 1 Sopravvivenza di topi naive o immunizzati con il ceppo attenuato *S. Typhimurium* SA186, dopo infezione challenge con ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC14028.

Al contrario, gli animali che prima avevano ricevuto *S. Typhimurium* SA186 sono sopravvissuti all'infezione indotta dallo stesso ceppo. Questi risultati indicano che la somministrazione orale di *S. Typhimurium* SA186 è in grado di conferire ai topi un'efficace protezione nei confronti di un'infezione challenge localizzata a tratti distali dell'intestino.

### **3.2. L'immunizzazione con Salmonella Typhimurium SA186 riduce la colonizzazione sistemica ed enterica del ceppo virulento.**

Oltre alla mortalità, è stato valutato il grado di colonizzazione, mediante valutazione del numero di UFC di *S. Typhimurium* ATCC 14028 recuperate dalla milza, cieco e colon a 4 o a 11 giorni dopo l'infezione, come parametro per misurare la protezione conferita da *S. Typhimurium* SA186 nei confronti di un challenge localizzato a livello intestinale. L'analisi sulla milza dei topi in precedenza vaccinati con *S. Typhimurium* SA186, ha messo in evidenza la presenza di pochi batteri sia a 4 che a 11 giorni dall'infezione (Fig 2A). Al contrario, alle stesse rilevazioni temporali, la milza dei topi controllo conteneva un numero di batteri virulenti almeno 4000 volte superiore. In analogia con i risultati ottenuti dalla milza, i topi immunizzati con *S. Typhimurium* SA186 avevano, rispetto ai topi controllo, un numero di batteri inferiore anche nel cieco. Questa riduzione, già evidente a 4 giorni, e' diventata ancor più marcata a 11 giorni (Fig.2B). Diversamente da quanto osservato a livello splenico e ciecale, animali vaccinati e controllo presentavano nel colon quantità di batteri virulenti sostanzialmente comparabili. Questo risultato suggerisce che l'immunizzazione con il ceppo attenuato *S. Typhimurium* SA186 è in grado di ridurre la colonizzazione del ceppo virulento sia nel cieco, sia nella milza ma non sembra essere in grado di attenuare l'impatto del ceppo virulento nel colon.

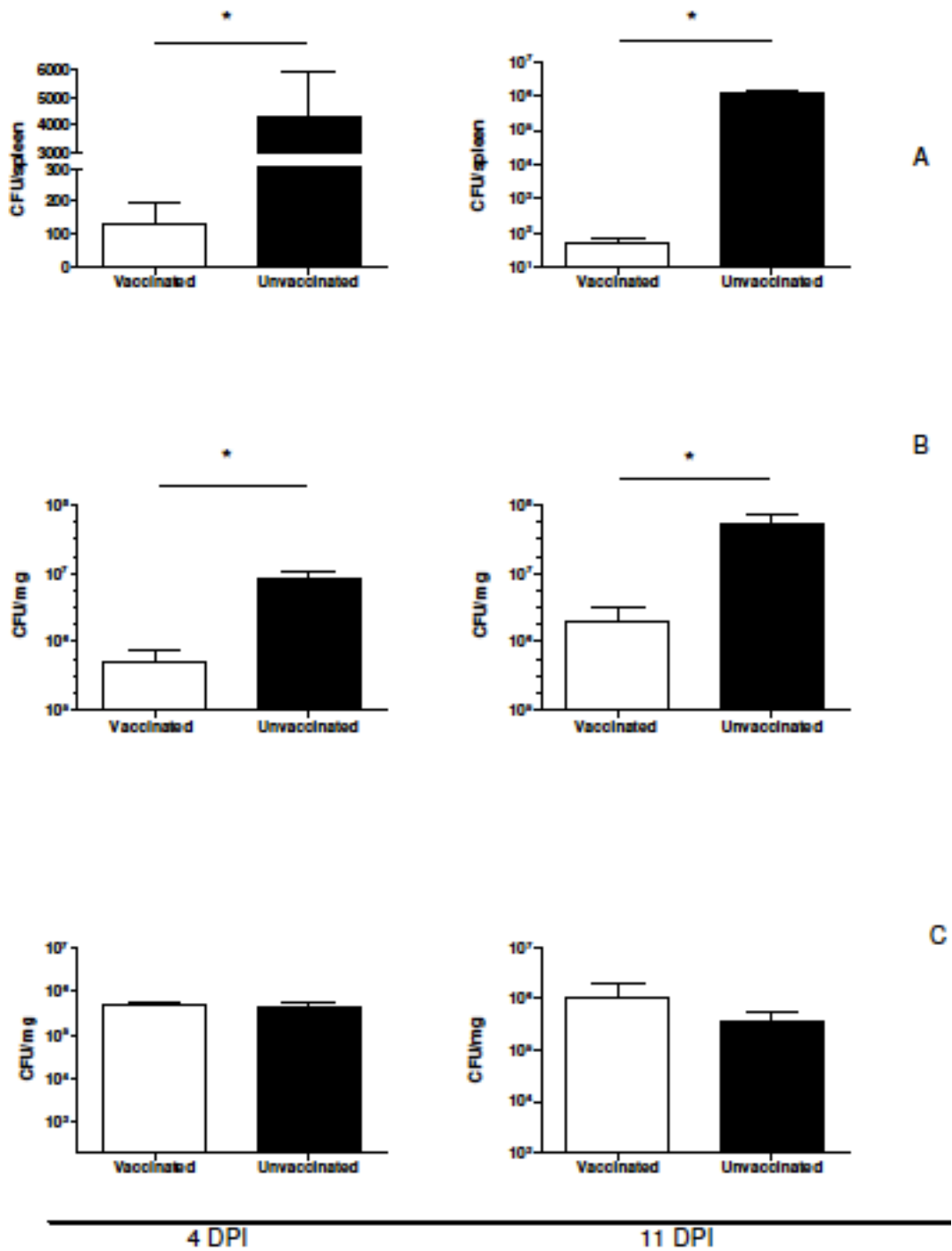


Figura 2 Colonizzazione batterica del ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC 14028 nella milza (A), nel cieco (B) o colon (C) in topi naive o immunizzati con il ceppo attenuato *S.Typhimurium* SA186. \*  $P \leq 0.05$

### 3.3. Ex vivo production of IFN- $\gamma$

La quantificazione *ex vivo* della produzione di IFN- $\gamma$  nella milza, cieco e colon e' stata utilizzata come parametro indiretto per la valutazione della risposta immunitaria cellulo mediata, osservabile negli animali vaccinati e naive dopo l'infezione challenge. Quattro giorni dopo il challenge, la produzione di IFN- $\gamma$  e' stata esigua sia nella milza degli animali vaccinati con *S. Typhimurium* SA 186 che dei non vaccinati. A 11 giorni dall'infezione, la milza degli animali non vaccinati conteneva un quantitativo di IFN- $\gamma$  più elevato di quello rinvenuto nella milza degli animali vaccinati e sottoposti a challenge (Fig.3A). Nel cieco, la produzione di IFN- $\gamma$  ha avuto un picco a 4 giorni in entrambi i gruppi, subendo poi un declino (Fig.3B). Nel colon la produzione di IFN- $\gamma$ , seppur più modesta in quantità, e' avvenuta con lo stesso andamento del cieco (Fig.3C). Il confronto dei risultati osservati nel cieco che nel colon non ha permesso di evidenziare differenze tra i due gruppi di animali. Questi dati mostrano che l'infezione challenge, effettuata per via orale, induce una risposta inizialmente localizzata a livello enterico con un ritardo nel coinvolgimento degli organi sistemici. Inoltre è stato possibile osservare che gli animali naive, rispetto agli animali precedentemente immunizzati, hanno avuto un sostanziale aumento della produzione di IFN- $\gamma$ , quando infettati con il ceppo virulento. Ciò parrebbe dar conforto all'ipotesi che la patologia indotta da *Salmonella* spp, sia sostanzialmente una forma immuno-mediata con gli esiti ascrivibili ad una esagerata e non controllata risposta immunitaria.

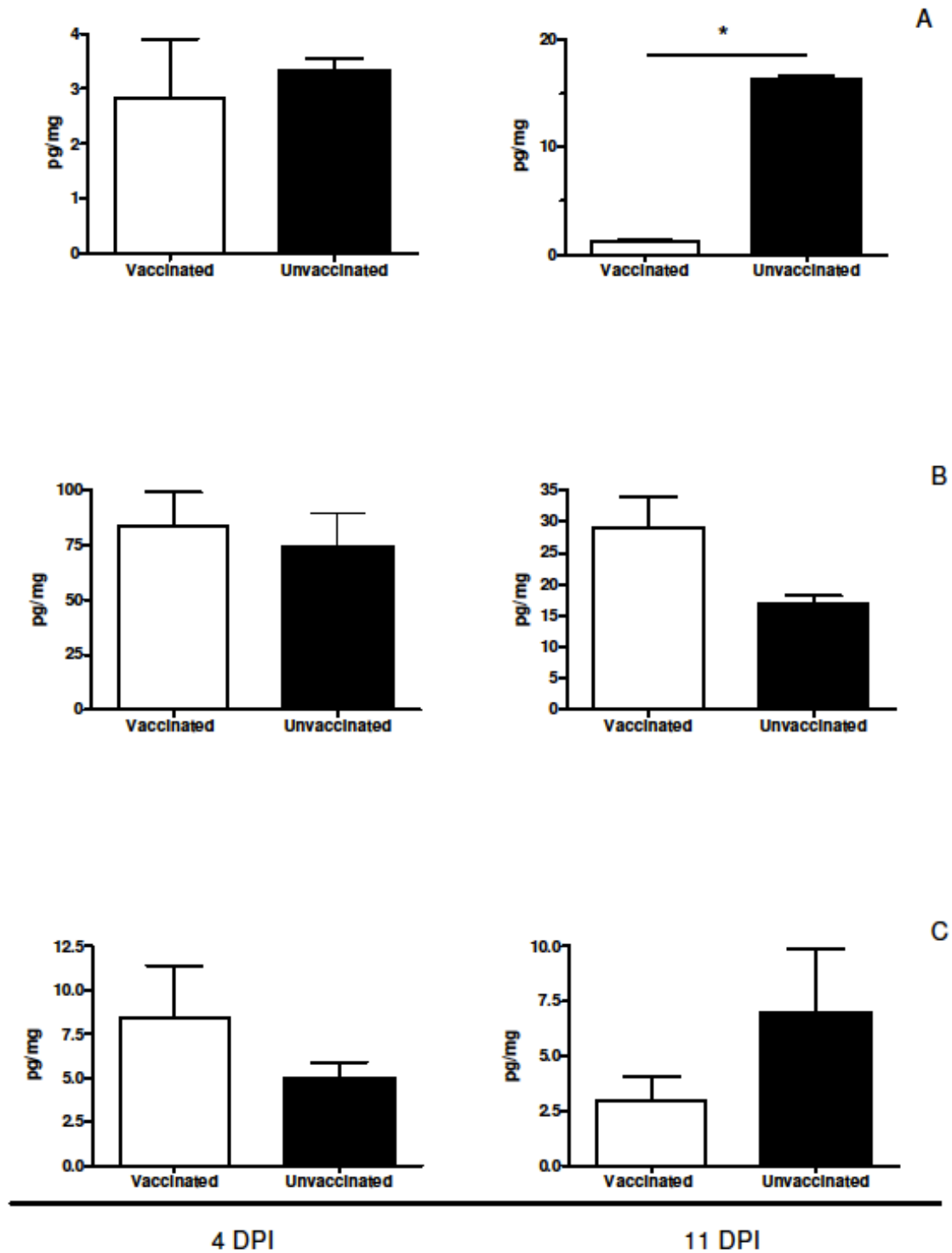


Figura 3 Produzione di IFN- $\gamma$  nella milza (A), nel cieco (B) o colon (C) in topi naive o immunizzati con il ceppo attenuato *S.Typhimurium* SA186, dopo infezione con il ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC14028 . \* P $\leq$ 0.05

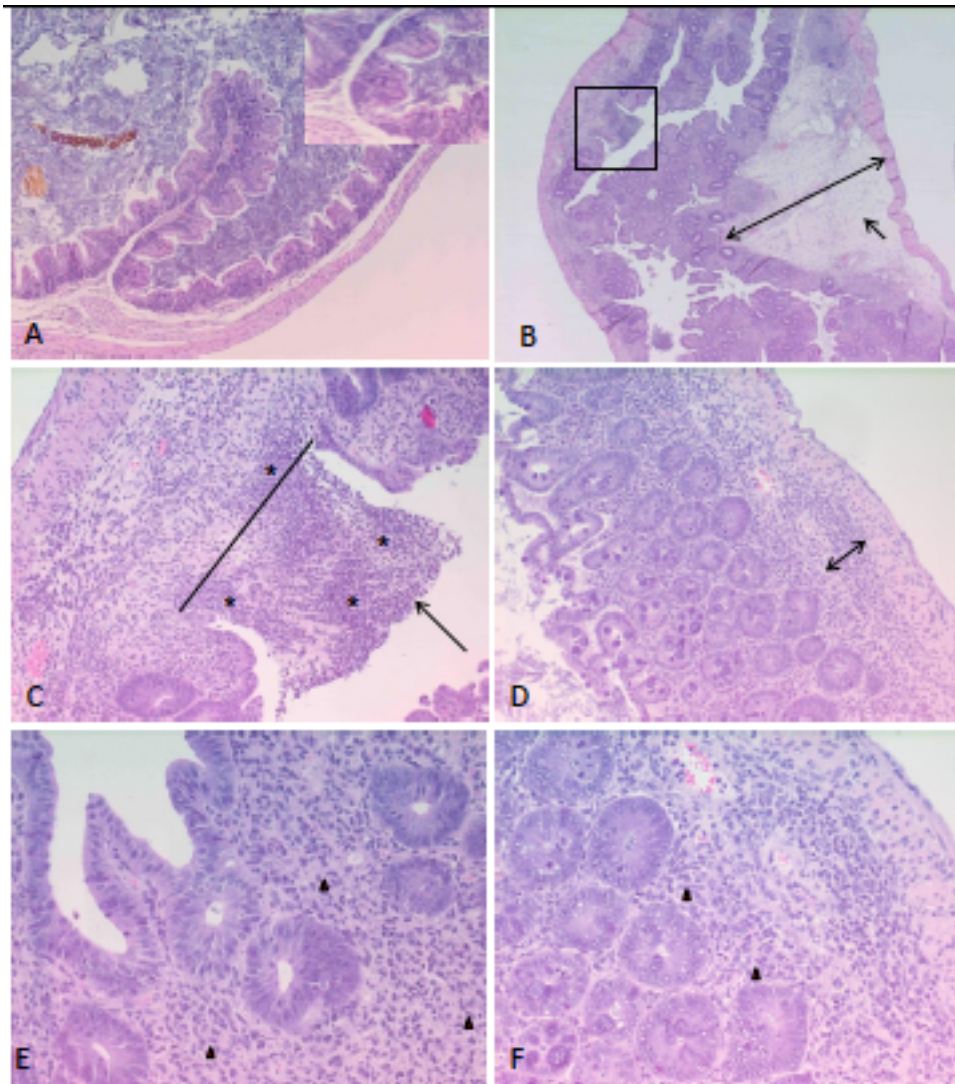


### **3.4 *Salmonella* Typhimurium SA186 limita l'infiammazione nel cieco**

Il cieco e il colon dei topi vaccinati con *S. Typhimurium* SA186 e dei topi controllo sono stati sottoposti ad un'analisi istopatologica volta ad evidenziare i caratteri distintivi.

Gli animali non vaccinati e infettati hanno mostrato una chiara infiammazione. La reazione infiammatoria non ha mostrato differenze qualitative o quantitative tra le due rilevazioni temporali.

Come precedentemente riportato, il modello murino di salmonellosi gastrointestinale ha nel cieco, l'organo maggiormente coinvolto, al contrario del colon, interessato solo marginalmente dall'infiammazione, senza che questa produca mai ulcerazione della mucosa, (Stecher et al., 2007 e Stecher et al., 2005). In seguito all'infezione challenge, il cieco degli animali controllo ha mostrato un grave edema submucosale, un aumento dell'infiltrato leucocitario nella lamina propria e un danno epiteliale che e' andato da foci di erosione all'ulcerazione (Fig. 4B e C).



**Figura 4** Istopatologia del tratto ciecale di topi naive o immunizzati con il ceppo attenuato *S.Typhimurium* SA186, dopo infezione con il ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC14028. (A) Cieco di topi di controllo. (B) cieco di topi naive dopo challenge. (C) Dettaglio di (B) a maggiore ingrandimento. (D) cieco di topi immunizzati, dopo challenge. (E and F) cieco di topi immunizzati.

La popolazione leucocitaria presente nella lamina propria, composta prevalentemente da macrofagi e neutrofili (Fig. E and Fig E particolare), non ha visto mai i secondi prevalere. In caso di ulcerazione epiteliale, al contrario, si è assistito all'essudazione dei neutrofili nel punto di lesione e nel lume intestinale (Fig. 4C and 4C particolare). L'ulcerazione ha interessato solo brevi tratti dell'intestino assumendo una distribuzione multifocale e rappresentando solamente una componente minore del quadro patologico osservato a livello enterico. L'edema submucosale, l'infiltrato leucocitario e l'erosione superficiale hanno trovato riscontro anche nel cieco degli animali vaccinati. Infatti, a 4 giorni dall'infezione, non e' stata osservata alcuna differenza tra i due gruppi

di animali sia nel cieco che nel colon. A 11 giorni dall'infezione il cieco degli animali vaccinati ha ottenuto un punteggio minore, come evidente in (Fig.5), indicante un'attenuazione della risposta infiammatoria.

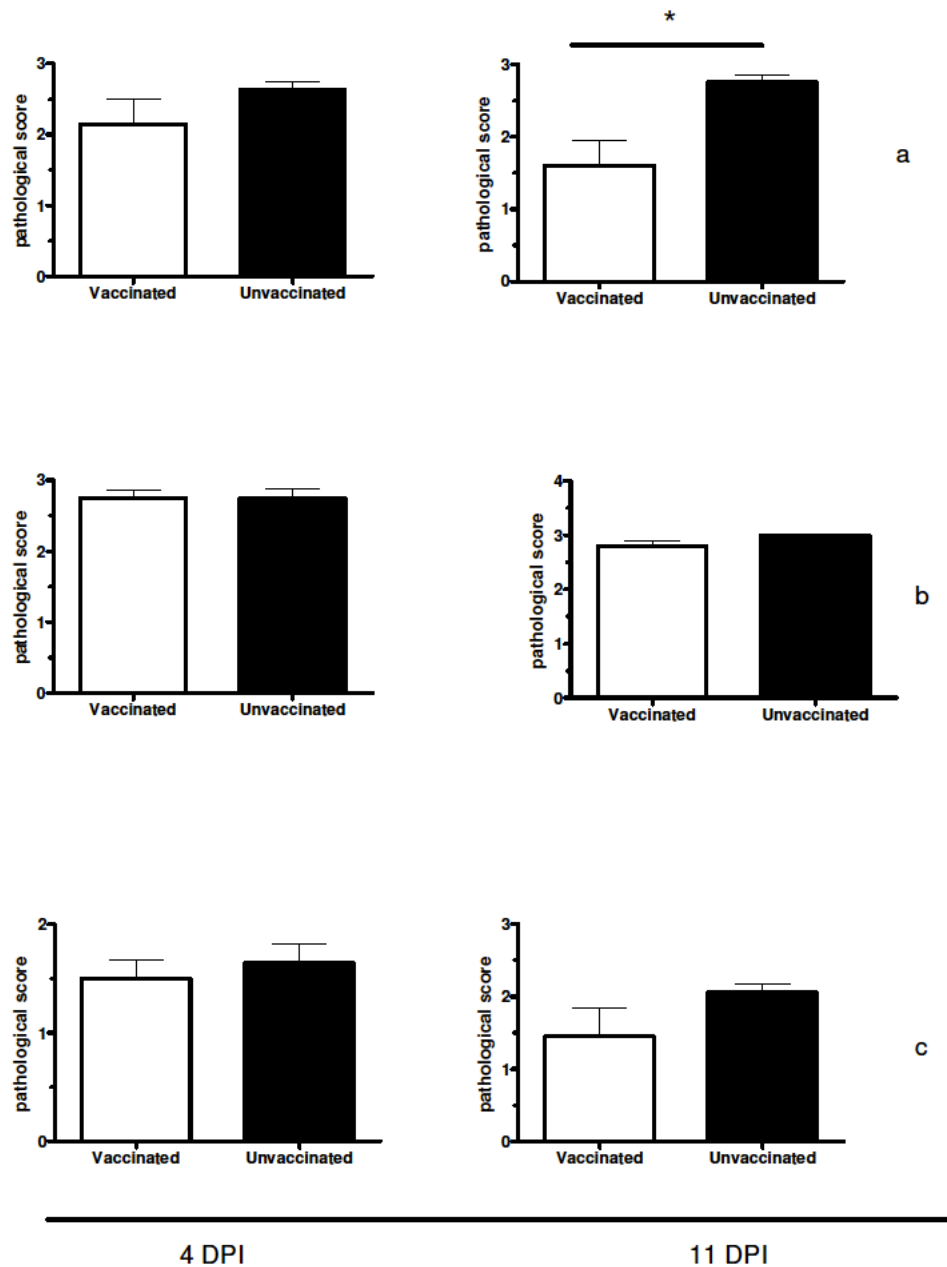


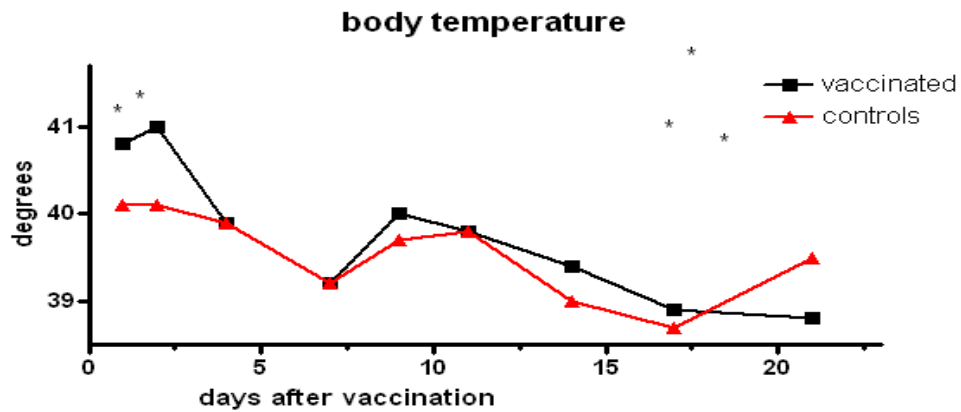
Figura 5 Valutazione dell'infiammazione nel cieco a 11 giorni dopo infezione challenge con il ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC14028. (A), Edema; (B) infiltrazione leucocitaria; (C) danno epiteliale. \*  $P \leq 0.05$

Il punteggio minore è stato connesso alla diminuzione dell'edema submucosale mentre la portata dell'infiltrato leucocitario e del danno epiteliale è rimasto invariato non differendo statisticamente tra i due gruppi (Fig.5 e Fig.4B, Fig.4D, Fig.4E, Fig.4F).

### **3.5.Prova su suini lattoni**

L'evidenza che la delezione dell'operone *znuABC* da *S. Typhimurium* fosse in grado di generare un ceppo la cui attenuazione e capacità protettiva fossero chiare ed evidenti in modelli sperimentali murini di salmonellosi sistemica o gastroenterica ha promosso l'effettuazione di prove in animali da reddito. Gli effetti conseguenti alla somministrazione orale del ceppo attenuato *S. Typhimurium* SA 186 in suini lattoni sono stati valutati in due distinte sperimentazioni. La rilevazione della temperatura corporea, la conformazione fecale e l'eliminazione nell'ambiente di *S. Typhimurium* SA 186, mediante valutazione del numero di unità formanti colonie nelle feci, sono stati scelti come criteri per valutare l'innocuità'. In analogia, la capacità protettiva del ceppo attenuato *S. Typhimurium* SA 186 è stata valutata mediante la misurazione della temperatura corporea, la conformazione fecale e l'eliminazione nell'ambiente a seguito dell'inoculazione del un ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Il primo approccio ha visto l'immunizzazione di suini di 21gg mediante la somministrazione per via orale di  $5 \times 10^9$  UFC /suino di *S. Typhimurium* SA186. Gli animali inoculati con il ceppo attenuato hanno mostrato uno spiccato rialzo termico rispetto agli animali controllo e lo stato febbrile e' stato evidente a 24h e 48h dal trattamento (Fig6).



\*  $P \leq 0.05$

Figura 6 Temperatura corporea di suini dopo vaccinazione con ceppo attenuato *S. Typhimurium* SA186 ( $5 \times 10^9$  UFC/suino).\*  $P \leq 0.05$

A 4gg dall'inoculo la temperatura corporea dei due gruppi di animali tornava ad avere valori tra di loro sovrapponibili. Questa condizione si è protratta fino all'effettuazione dell'infezione challenge. Un rammollimento delle feci è stato evidente in due degli animali inoculati a 24 h e 48 h dalla vaccinazione. Uno degli animali ha mostrato in maniera intermittente una modica alterazione della consistenza fecale fino al nono giorno post immunizzazione.

L'eliminazione del ceppo attenuato *S. Typhimurium* SA 186 è avvenuta in maniera differente tra i vari soggetti e ha assunto un carattere altalenante nel tempo (Fig7). Due suinetti hanno eliminato il batterio in misura maggiore rispetto agli altri due soggetti costituenti il gruppo. L'intero gruppo dei vaccinati ha manifestato delle flessioni nell'eliminazione a 48h e a 14 giorni dall'immunizzazione, ma a 21giorni (giorno previsto per il challenge) dal trattamento, l'eliminazione era ancora elevata ed evidente in tutti gli animali ( Fig7).

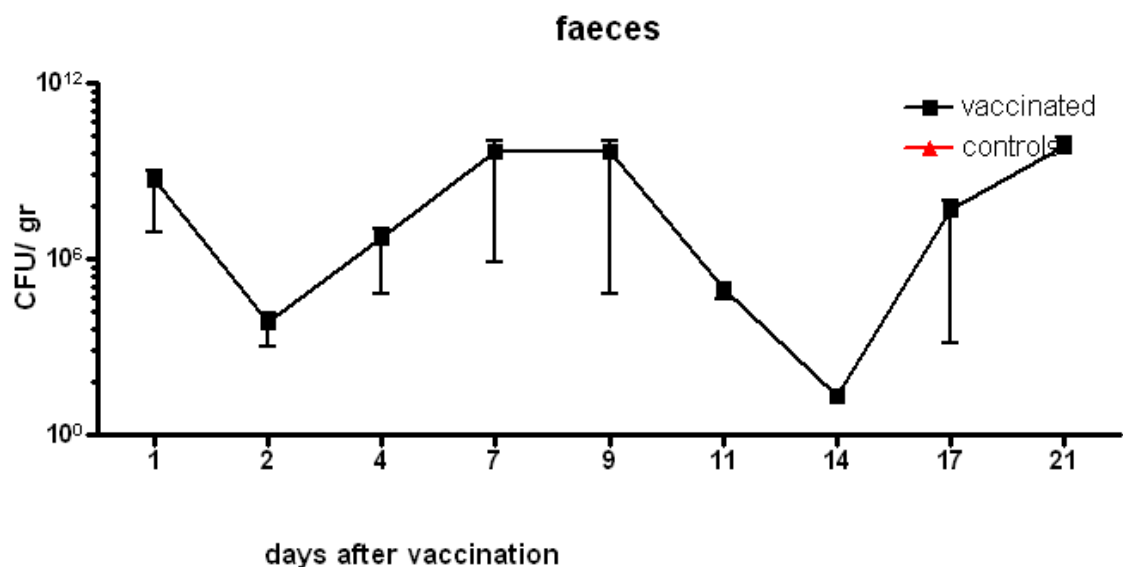


Figura 7 Eliminazione con le feci del ceppo attenuato *S.Typhimurium* SA186 in suini dopo vaccinazione (5x10<sup>9</sup> UFC/suino)

A 21 giorni dal primo trattamento, gli animali vaccinati e gli animali controllo sono stati sottoposti a challenge mediante la somministrazione orale di 10<sup>10</sup> UFC /suino del ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC 14028. A 24h, 48h, e 72h, Il gruppo dei controlli ha manifestato uno stato febbrile che si e' esaurito a solo 7 giorni dalla somministrazione del batterio virulento. La temperatura degli animali vaccinati è invece rimasta sempre entro valori fisiologici.

Due degli animali controllo hanno presentato una evidente diarrea (fig diarrea score). A 24h e 48h dal challenge l'eliminazione fecale di *S. Typhimurium* ATCC 14028 e' stata più elevata nel gruppo dei vaccinati rispetto ai controlli. Questa condizione si è invertita a 3 e 7 giorni quando gli animali controllo hanno manifestato un maggior numero di UFC per grammo di feci rispetto agli animali vaccinati (Fig8).

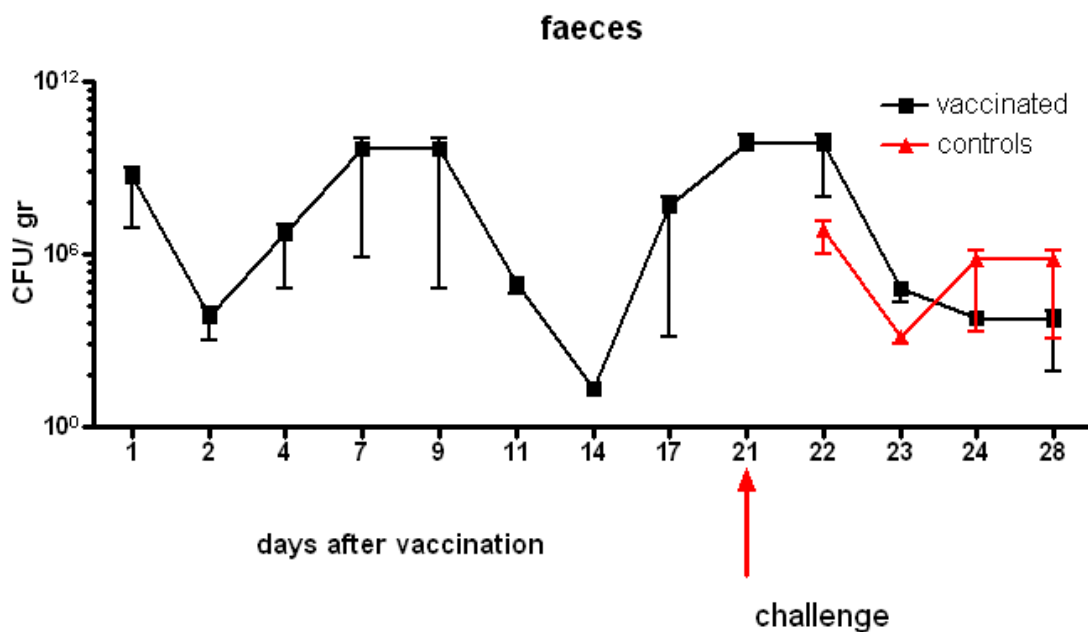


Figura 8 Eliminazione con le feci del ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC 14028 in suini dopo infezione challenge

Il secondo approccio effettuato in suini lattoni ha seguito un disegno sperimentale analogo al primo ma l'immunizzazione degli animali è stata effettuata con una dose di  $10^9$  UFC /suino del ceppo attenuato *S. Typhimurium* SA 186. La riduzione dei batteri somministrati ha modificato gli esiti della vaccinazione.

La temperatura corporea degli animali vaccinati ha subito un lieve rialzo senza assumere un carattere febbrile, i valori rilevati sono stati sovrapponibili a quelli rinvenuti negli animali controllo (Fig9).

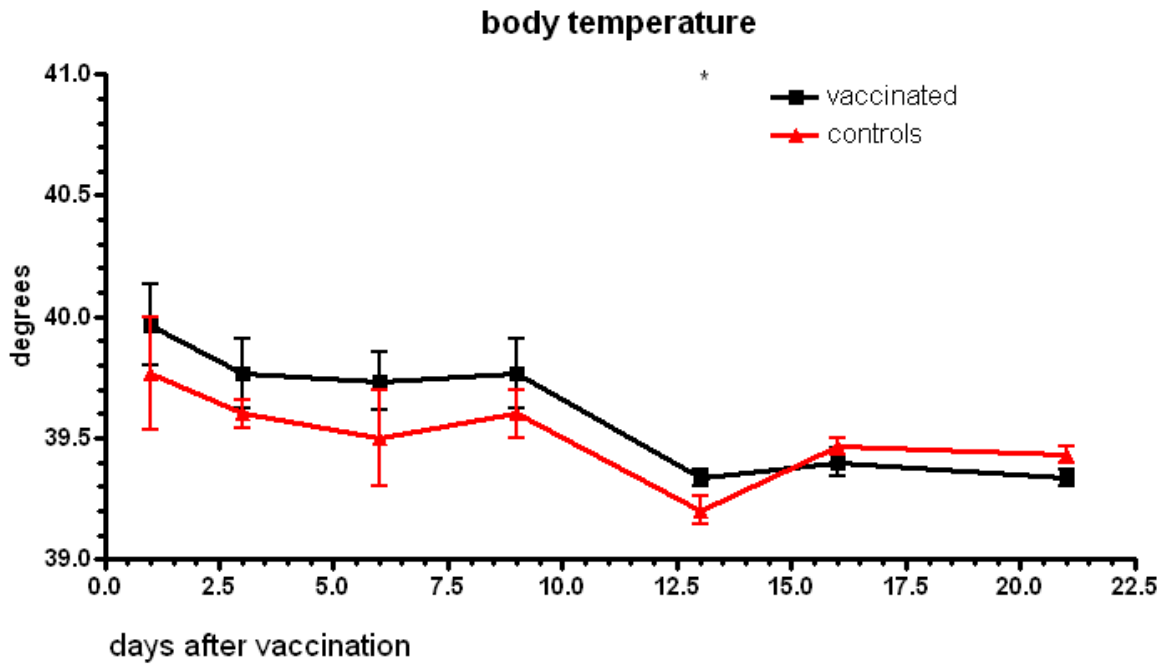


Figura 9 Temperatura corporea di suini dopo vaccinazione con ceppo attenuato S.Typhimurium SA186 (10<sup>9</sup> UFC/suino)

L'immunizzazione ha lievemente modificato la consistenza delle feci causandone un modico e transitorio rammollimento. L'eliminazione fecale di *S. Typhimurium* SA 186 è stata ingente a 24h e 48h post-immunizzazione ma e' andata progressivamente riducendosi, giungendo a valori prossimi allo zero, in corrispondenza del ventunesimo giorno dalla vaccinazione, data stabilita per il challenge (Fig10).

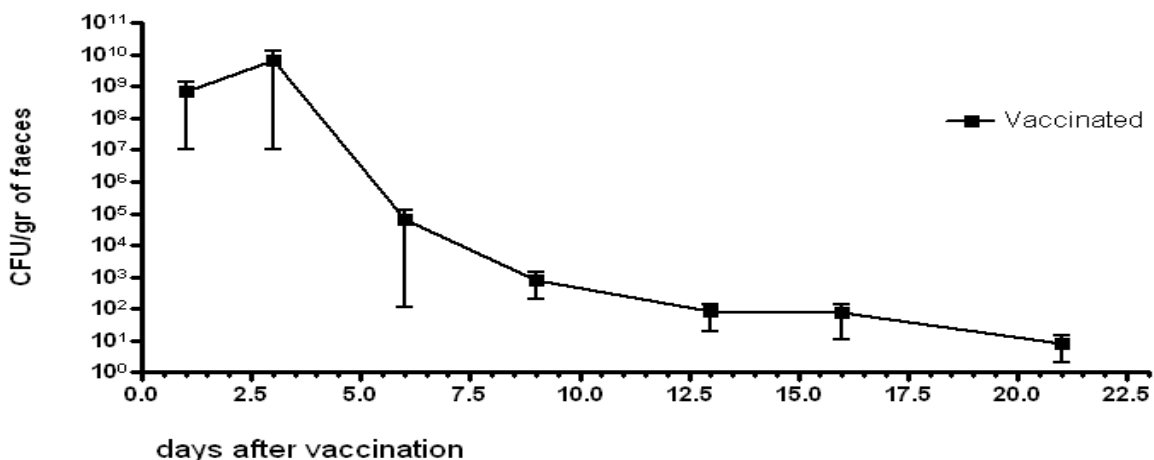
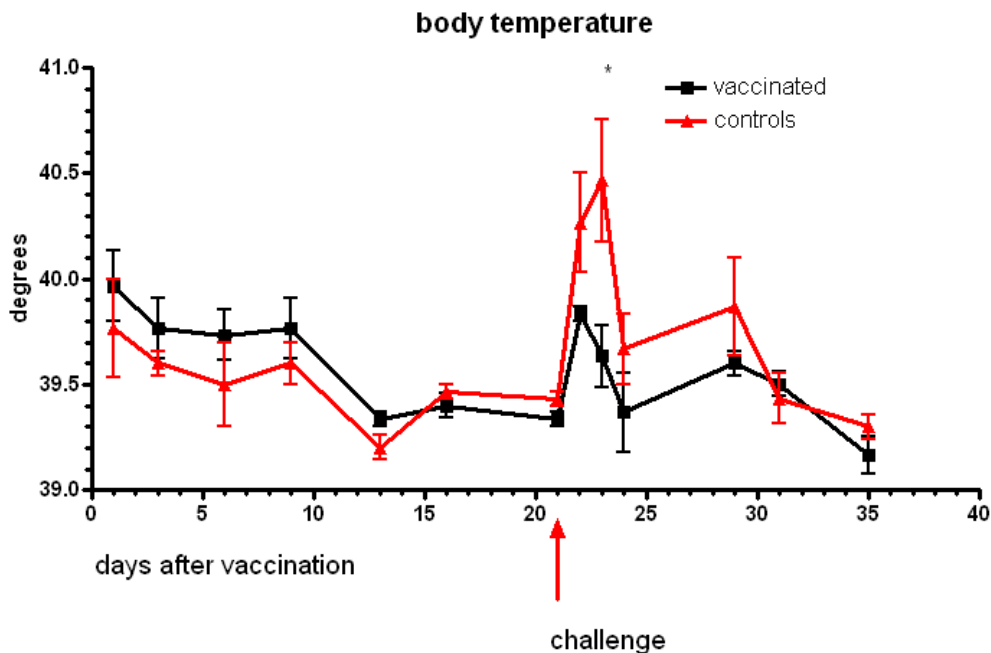


Figura 10 Eliminazione con le feci del ceppo attenuato S.Typhimurium SA186 in suini dopo vaccinazione (10<sup>9</sup> UFC/suino)

Il challenge effettuato mediante la somministrazione di una dose di *Salmonella* Typhimurium



ATCC 14028 di  $10^{10}$  UFC /suino ha determinato un rialzo termico negli animali controllo i quali hanno mostrato piressia nelle successive 48h. Gli animali vaccinati non hanno avuto modificazioni della propria temperatura corporea (Fig11).



**Figura 11** Temperatura corporea di suini dopo vaccinazione con ceppo attenuato *S.Typhimurium* SA186 ( $10^9$  UFC/suino) e dopo infezione con ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028.\*  $P \leq 0.05$

Le feci degli animali controllo hanno assunto un aspetto marcatamente diarroico sia a 24h che a 48h dalla somministrazione del batterio virulento, il rammollimento fecale e' perdurato fino a 9 giorni post-challenge. Gli animali vaccinati non hanno presentato alcuna alterazione della consistenza fecale a nessuno delle rilevazioni temporali effettuate.

A 24h dall'inoculo, animali vaccinati e animali controllo presentavano un numero simile di UFC di *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 per grammo di feci. Alle successive rilevazioni temporali si è assistito ad un rapido declino della quantità di batteri virulenti contenuti nelle feci degli animali vaccinati(Fig12).

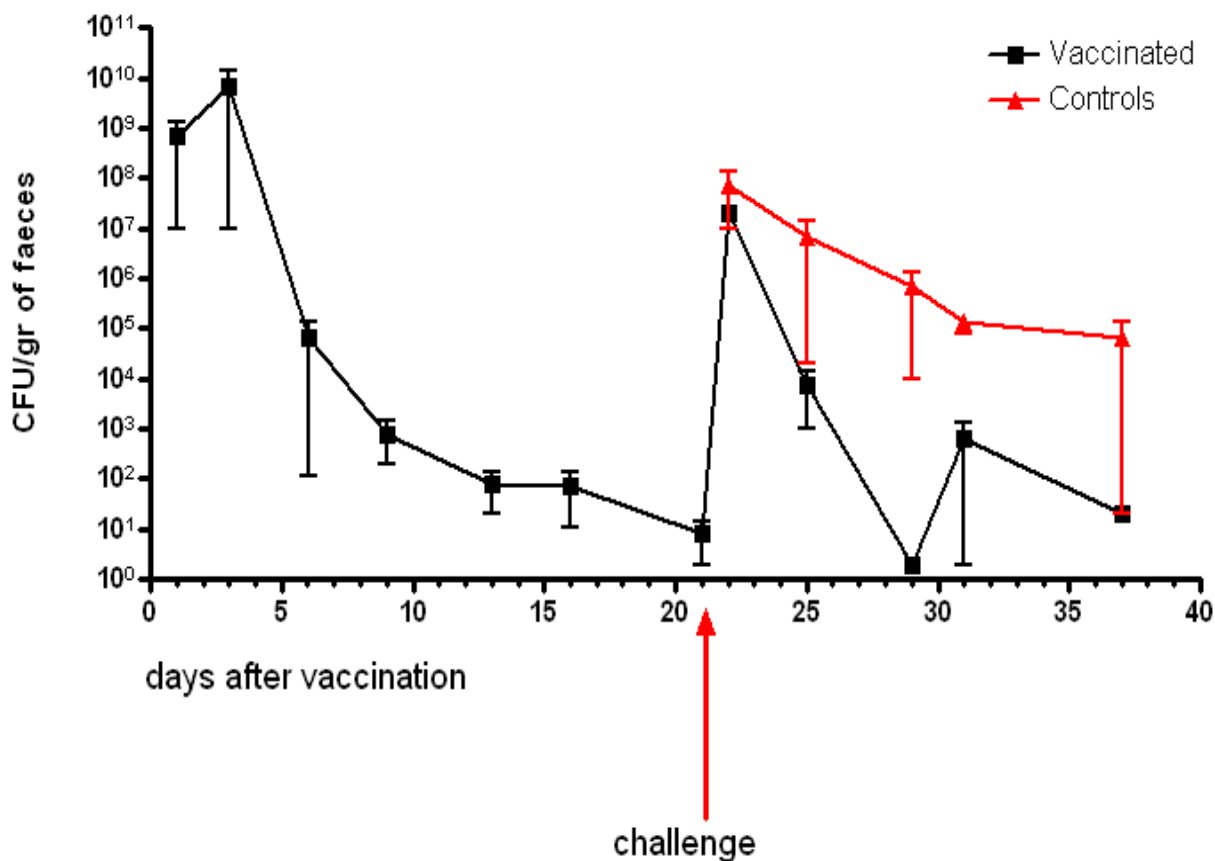


Figura 12 Eliminazione con le feci del ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028 in suini dopo infezione challenge

Sebbene la dinamica di eliminazione subisca delle oscillazioni, gli animali in precedenza immunizzati con *S. Typhimurium* SA 186 hanno nel periodo considerato eliminato nelle feci una quantità inferiore di *S. Typhimurium* rispetto agli animali controllo.

### 3.6. Prova su suini magroni

La volontà di indagare quali fossero gli esiti della somministrazione di *Salmonella* Typhimurium delevata dell'operone *znuABC* in animali di età maggiore ha motivato l'effettuazione di una sperimentazione su suini in età da ingrasso.

Due gruppi di animali di circa 3 mesi sono stati inoculati rispettivamente con  $5 \times 10^8$ /suino (gruppo A) e  $5 \times 10^7$ /suino (gruppo B) di *Salmonella* Typhimurium SA 355 (*S. Typhimurium*  $\Delta$ ZnuABC con una cassetta di resistenza per cloramfenicolo e streptomina). Un gruppo di animali è stato lasciato come controllo ricevendo solamente una soluzione di tampone bicarbonato sterile.

Il trattamento è stato preceduto dalla pesatura di ogni singolo animale al fine di valutare l'influenza del vaccinazione sull'incremento ponderale e di conseguenza sulle performances produttive.

Compiuta l'immunizzazione, si sono monitorate la temperatura corporea e l'eliminazione di *Salmonella* Typhimurium SA 355 tramite le feci.

La vaccinazione ha determinato un aumento della temperatura in entrambi gruppi trattati. A 24h dall'inoculo uno degli animali del gruppo A e tre degli animali del gruppo B hanno presentato una modesta piresia. A 48h dal trattamento due degli animali del gruppo A hanno presentato un evidente stato febbrile mentre un solo suino del gruppo B ha confermato una temperatura superiore ai valori fisiologici. A 7 giorni dall'immunizzazione e alle successive rilevazioni temporali gli animali vaccinati e gli animali controllo hanno presentato valori di temperatura normali (Fig13).

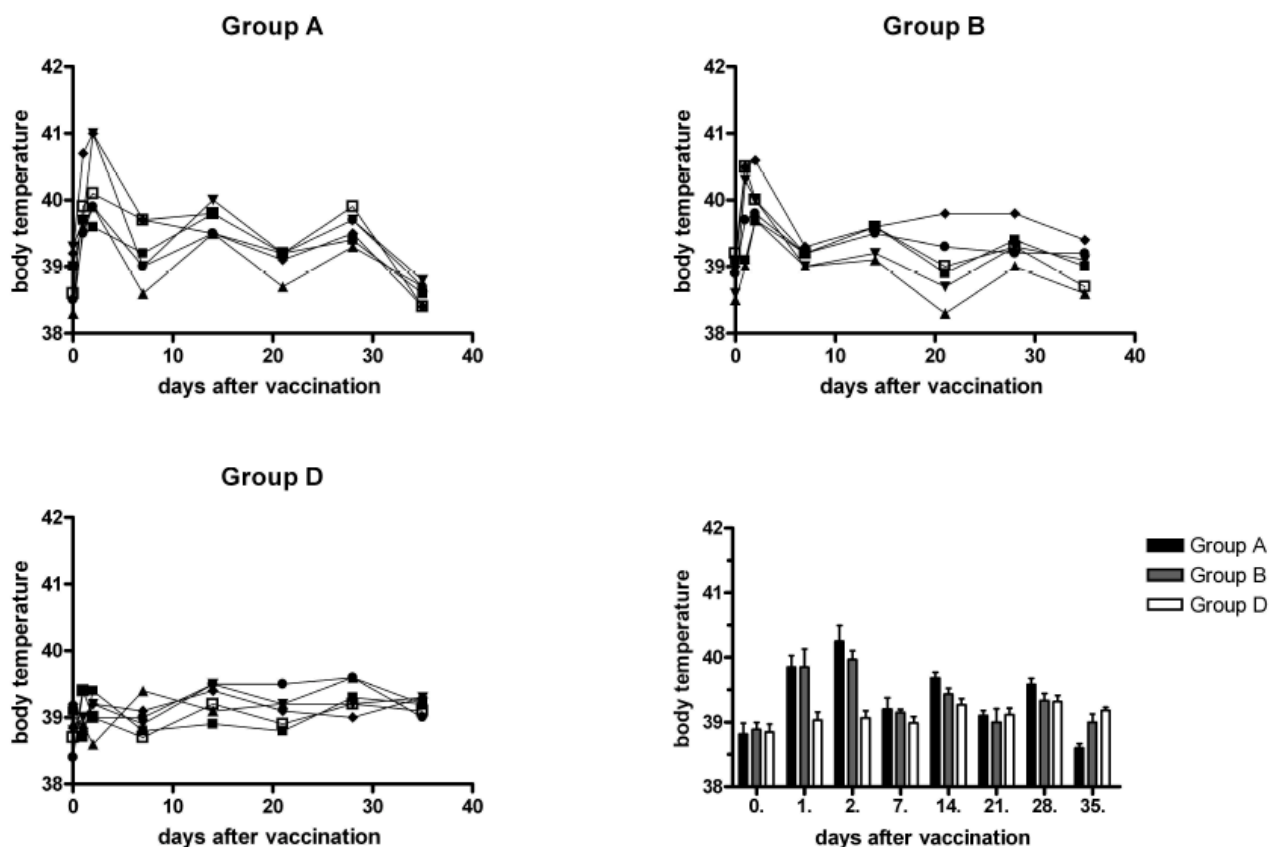


Figura 13 Temperatura corporea di suini dopo vaccinazione con  $5 \times 10^8$  di *S. Typhimurium* SA355 (A),  $5 \times 10^7$  di *S. Typhimurium* SA355 e animali controllo (D).

L'eliminazione di *S. Typhimurium* SA 355 è stata massima a 24h e 48h dalla vaccinazione sia per entrambi i gruppi degli animali trattati. L'entità e la durata dell'eliminazione del ceppo vaccinale ha assunto caratteristiche coerenti con la dose ricevuta. Gli animali del gruppo A hanno eliminato nelle feci una quantità di batteri maggiore di almeno un logaritmo rispetto agli animali del gruppo B. Questa dinamica di eliminazione è continuata fino a 21 giorni dal trattamento. A 28 giorni dal trattamento entrambi i gruppi di suini sono risultati non eliminatori di *Salmonella* Typhimurium SA 355, attraverso le feci (Fig14).

### CFU after vaccination

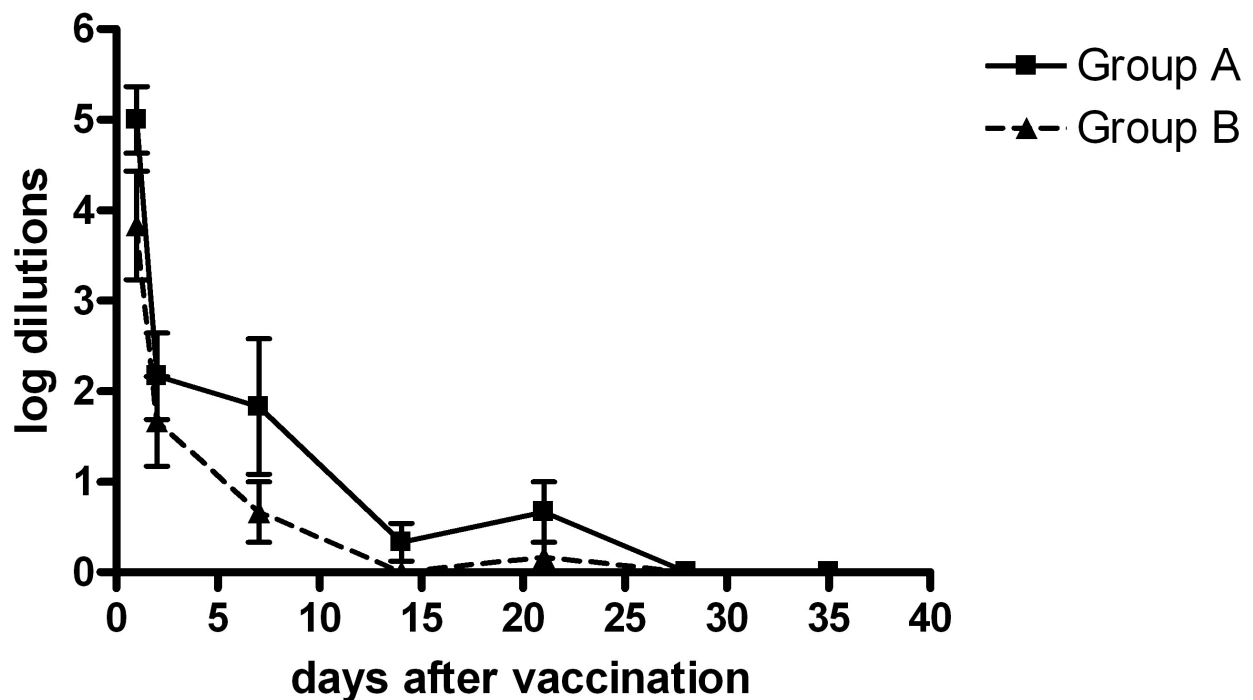


Figura 14 Eliminazione con le feci del ceppo vaccinale da parte di suini vaccinati con  $5 \times 10^8$  di *S. Typhimurium* SA355 (A) e  $5 \times 10^7$  di *S. Typhimurium* SA355(B).

L'isolamento di *Salmonella* dai tamponi ambientali dei locali dove erano allocati i gruppi A e B è avvenuto a 1, 2, e 7 giorni dalla vaccinazione. L'isolamento di *Salmonella* non è avvenuto a 21, 28, e 30 giorni dall'immunizzazione.

A 30 giorni dalla vaccinazione si valutato l'incremento ponderale avvenuto. Tutti i gruppi di

animali complessivamente hanno acquisito peso. L'incremento di peso degli animali appartenenti al gruppo dei controlli è stato appena più pronunciato rispetto a quello degli animali vaccinati. Un animale del gruppo A ed un animale del gruppo B hanno reagito alla vaccinazione con un mancato incremento ponderale. A prescindere dal trattamento subito i soggetti che più hanno acquisito peso, sono stati quelli che al momento dell'inoculo avevano mole maggiore (Fig15).

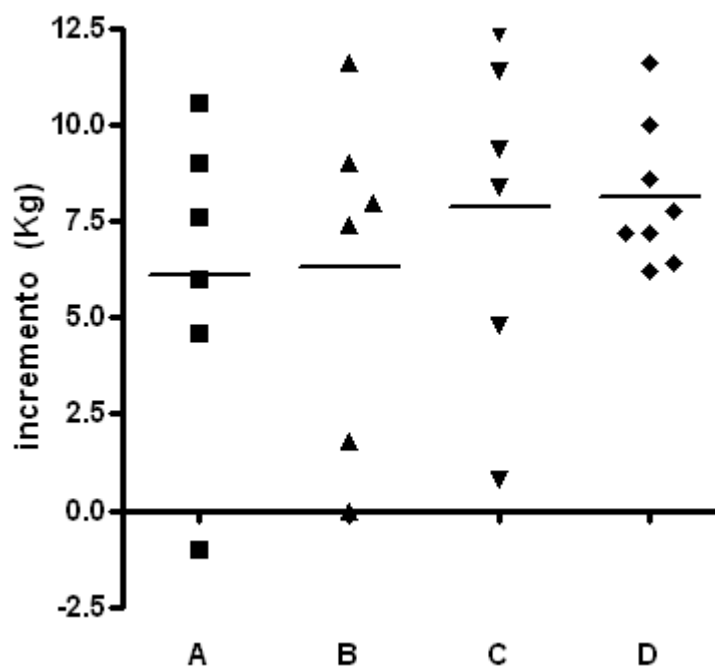
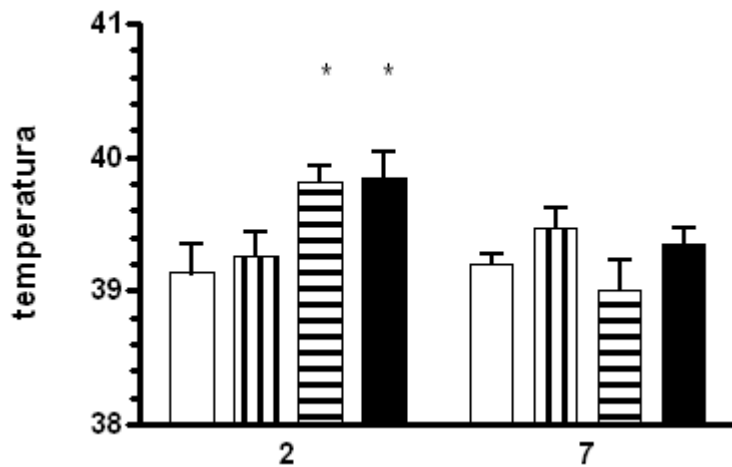


Figura 15 incremento ponderale di suini vaccinati con  $5 \times 10^8$  di *S. Typhimurium* SA355 (A),  $5 \times 10^7$  di *S. Typhimurium* SA355 (B),  $2 \times 10^9$ /suino di *S. Typhimurium* ATCC 14028 inattivata (C) e animali controllo (D)

Il trentesimo giorno post-immunizzazione tutti i gruppi di animali (gruppo A, B, C, D) sono stati sottoposti a challenge mediante inoculazione orale di  $10^9$ /suino di *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Due giorni dopo l'effettuazione dell'infezione virulenta, gli animali del gruppo C e gli animali del gruppo D hanno presentato un rialzo termico. I valori di temperatura riscontrati tra i soggetti immunizzati col batterio inattivato erano tra di loro omogenei, tre animali del gruppo controllo presentavano un evidente stato di piressia. La temperatura media di questi due gruppi di animali differiva statisticamente da quella registrata negli animali vaccinati con *S. Typhimurium* SA355 i quali, indipendentemente dalla dose ricevuta, non hanno mostrato alcuna variazione della

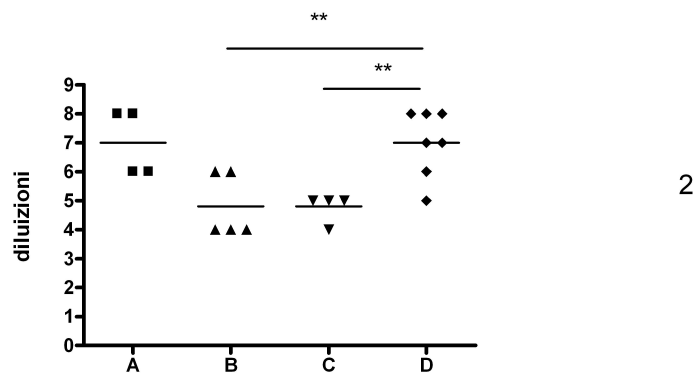
temperatura corporea (Fig16)



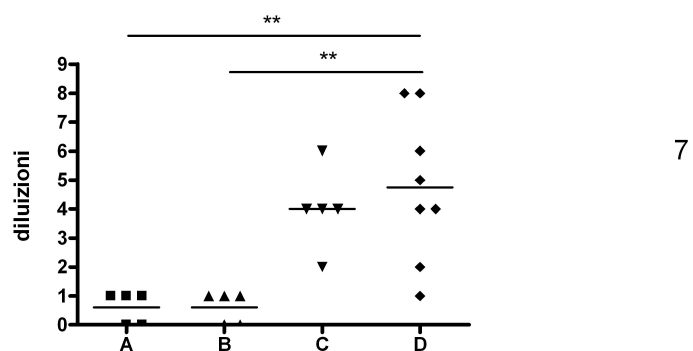
**Figura 15** Temperatura corporea di suini vaccinati con ceppo attenuato *S.Typhimurium* SA355 (A, B), *S. Typhimurium* ATCC 14028 inattivata (C) dopo infezione con ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC 14028.\*  $P \leq 0.05$

A 7 giorni dalla somministrazione di *S. Typhimurium* ATCC 14028 le medie delle temperatura corporea dei differenti gruppi di animali erano tra loro sovrapponibili.

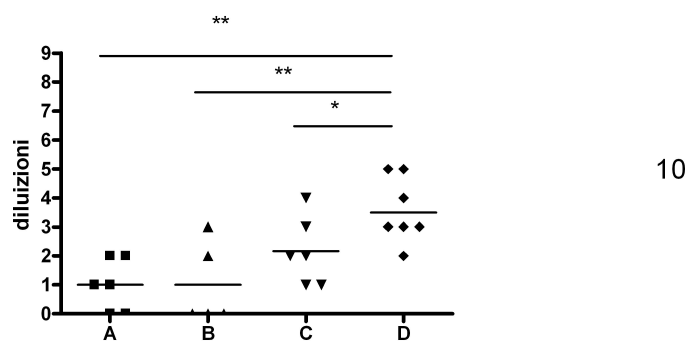
Due giorni dopo l'effettuazione dell'infezione challenge, gli animali del gruppo A, immunizzati con una dose più elevata di *S. Typhimurium* SA355 hanno eliminato il batterio virulento attraverso le feci con valori comparabili a quelli del gruppo dei controlli. Gli animali del gruppo B, immunizzati con una dose inferiore di *S. Typhimurium* SA355, e gli animali del gruppo C, immunizzati col batterio inattivato, hanno mostrato una eliminazione fecale di *S. Typhimurium* ATCC 14028 inferiore rispetto agli animali controllo (Fig17)



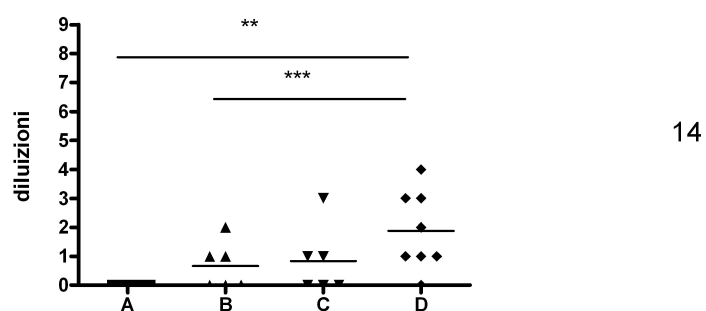
2



7



10



14

Figura 16 Eliminazione con le feci del ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028 in suini dopo infezione challenge.  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  \*\*\*  $p = 0,08$

Trascorsi 7 giorni dall'infezione virulenta, entrambi i gruppi di suini vaccinati con il batterio attenuato (gruppo A e gruppo B) hanno mostrato una accentuata riduzione del numero di UFC/g di feci di *S. Typhimurium* ATCC 14028. Questa differenza e' stata statisticamente significativa

rispetto agli animali del gruppo C e del gruppo dei controlli che , al contrario, presentavano nelle feci quantità simili di batteri virulenti. Questo andamento e' stato confermato dai risultati ottenuti dalle rilevazioni effettuate a 10 e 14 giorni. A 14 giorni dall'infezione challenge tutti gli animali del gruppo A e 3 degli animali del gruppo B hanno cessato di eliminare *S. Typhimurium* ATCC 14028. Dieci e 14 giorni dopo l'effettuazione dell'infezione con *S. Typhimurium* ATCC 14028, gli animali immunizzati con il vaccino inattivato hanno eliminato batteri in misura statisticamente inferiore rispetto agli animali controllo. A 14 giorni dal challenge, 3 suini del gruppo C e uno del gruppo d hanno cessato di eliminare batteri virulenti. L'eliminazione di *S. Typhimurium* ATCC 14028 e' andata progressivamente diminuendo indipendentemente dal trattamento effettuato sugli animali (Fig18).

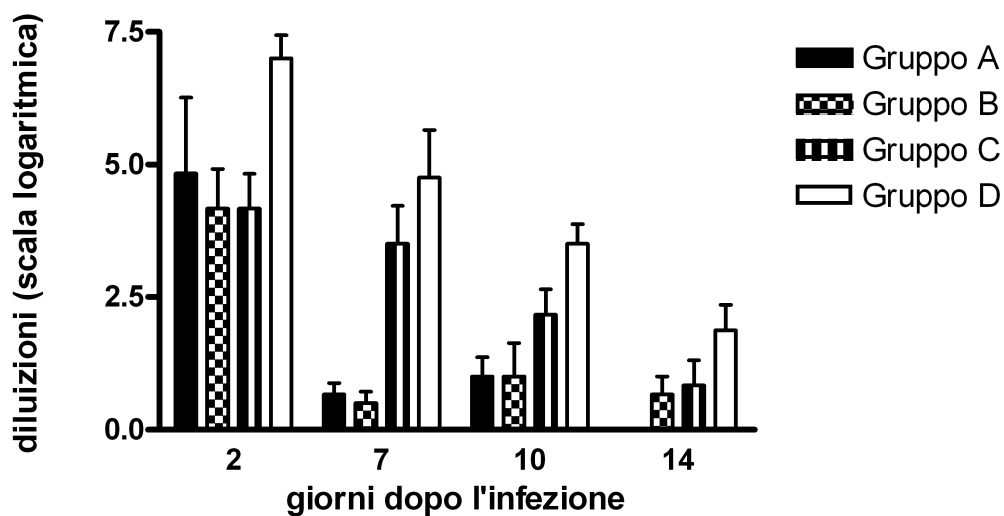


Figura 17 Eliminazione con le feci del ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028 in suini dopo infezione challenge



I diversi di gruppi di animali vaccinati hanno tutti aumentato il proprio peso rispetto agli animali controllo. A 21 giorni dal challenge, termine della sperimentazione, l'incremento ponderale raggiunto dal gruppo A rispetto agli animali controllo ha raggiunto la significatività statistica (Fig19).

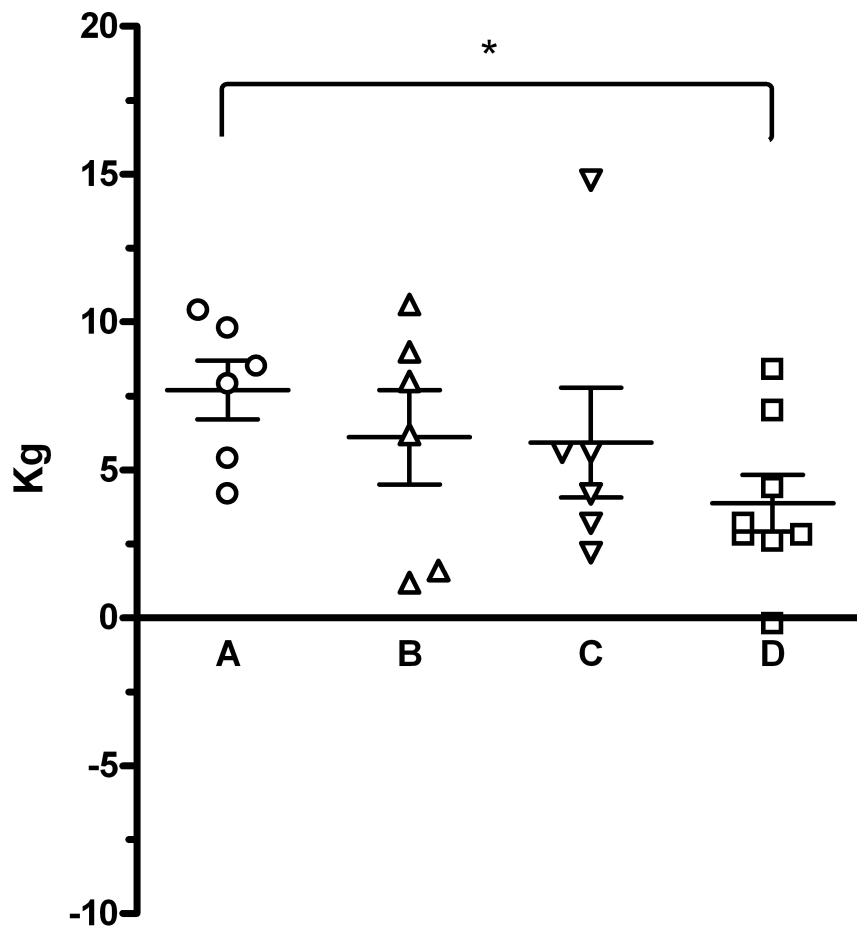


Figura 18 Incremento ponderale di suini dopo infezione challenge con  $10^9$  ceppo virulento *S.Typhimurium* ATCC 14028.\*  
 $P \leq 0.05$

## 4.DISCUSSIONE

La mancanza di modelli sperimentali adeguati allo studio della salmonellosi enterica sia umana che animale e' stata sempre una cronica mancanza lamentata dai ricercatori. Un modello sperimentale murino che prevede lo sviluppo di una infezione enterica dovuto ad un trattamento con streptomicina prima della somministrazione di *Salmonella* Typhimurium recentemente e' stato frequentemente proposto per lo studio delle interazioni ospite-patogeno sottese alle infezioni gastroenteriche dovute a *Salmonella* [27, 28, 29].

Lo scopo dello studio intrapreso sui topi e' stato quello di verificare la possibilità di usare un modello murino di salmonellosi gastroenterica come strumento funzionale a provare l'efficacia di ceppi di *Salmonella* candidati ad essere usati come vaccini in animali da reddito. A tal scopo abbiamo sottoposto topi vaccinati con *S. Typhimurium* SA186 e topi controllo ad una infezione virulenta omologa e ne abbiamo seguito la cinetica di infezione e il quadro istopatologico correlato dopo 4 e 11 giorni dall'induzione dell'infezione challenge .

A 4 giorni dall'infezione gli animali vaccinati con *S. Typhimurium* SA186 hanno evidenziato nella milza e nel cieco un minor numero di *S. Typhimurium* ATCC 14028 rispetto agli animali controllo che al contrario sono risultati abbondantemente colonizzati (Fig2). Questi risultati confermano che la vaccinazione con *S. Typhimurium* SA186 limita l'invasività sistemica e aiuta a controllare l'infezione anche nel tratto gastroenterico.

Sebbene gli animali vaccinati abbiano mostrato nel cieco una minor colonizzazione degli animali controllo questo dato non combacia con i risultati dell'analisi istopatologica. Questa discrepanza può essere attribuita all'elevata dose di batteri utilizzata per il challenge. Questa dose può aver indotto una significativa risposta infiammatoria negli animali vaccinati e nei non vaccinati mascherando eventuali differenze istopatologiche quali-quantitative. Sebbene i topi vaccinati *S. Typhimurium* SA186 abbiano presentato nel cieco un numero di batteri virulenti inferiore di 1 log

rispetto agli animali controllo la quantità residua di microrganismi e' stata tale da determinare una risposta infiammatoria acuta, così come già osservato nei suini da Loynachan [32].

La protezione conferita dalla somministrazione di *S. Typhimurium* SA186 e' stata confermata a 11 giorni post challenge (Fig2). Anche in questo caso i topi controllo hanno mostrato un numero maggiore di batteri in milza e cieco rispetto ai topi vaccinati. A 11 giorni appare evidente un avvicinamento dei dati microbiologici e istopatologici. Il cieco degli animali vaccinati ha indicato minor segni di infiammazione rispetto al cieco dei topi controllo (Fig5). Nel complesso i dati microbiologici indicano che la preventiva somministrazione di *S. Typhimurium* SA186 rappresenta un vantaggio nel controllare una infezione challenge localizzata a livello enterico. I risultati derivanti dall'analisi del colon non hanno indicato sostanziali differenze tra animali vaccinati e controllo ne' a 4 ne' a 11 giorni post challenge. Questa porzione di intestino pur presentando una elevata dose di batteri a entrambi le rilevazioni temporali considerate ha mostrato un'infiammazione di lieve entità. Questo risultato suggerisce che il colon, al contrario del cieco, e' un bersaglio secondario in questo modello di salmonellosi e che la presenza di batteri non e' di per se sufficiente ad indurre una accentuata risposta infiammatoria mucosale.

L'analisi *ex vivo* della produzione di IFN- $\gamma$  e' stata effettuata in virtù del ruolo chiave che questa citochina riveste nell'immunità' cellulomediata [33]. Dopo 4 giorni dall'effettuazione dell'infezione challenge, elevate quantità di IFN- $\gamma$  sono state riscontrate nel cieco sia degli animali vaccinati che degli animali controllo. A 11 giorni la produzione di IFN- $\gamma$  e' stata evidente ancora una volta nel cieco di entrambi i gruppi ma anche nella milza degli animali vaccinati (Fig3)

Questi dati suggeriscono che la produzione di IFN- $\gamma$  è correlata alla carica batterica e alla disponibilità dell'antigene nel distretto anatomico considerato così come già riportato in altri modelli di salmonellosi [33].

Nel loro insieme questi dati indicano che la somministrazione di orale di *S. Typhimurium* SA186 è capace di proteggere i topi da una infezione virulenta localizzata a livello intestinale. In aggiunta indicano il cieco come organo da scegliere per lo studio di efficacia di vaccini vivi attenuati in questo modello sperimentale.

In conclusione, il modello murino di salmonellosi gastroenterica può essere uno strumento utile per saggiare l'efficacia di ceppi deleti di *Salmonella* Typhimurium e selezionare quelli con potenzialità di essere usati come vaccini.

Modelli sperimentali animali di salmonellosi gastroenteriche sono enormemente preziosi e il modello murino di salmonellosi gastroenterico può rappresentare uno strumento migliore del classico modello di infezione tifoide nel predire gli esiti di una infezione sperimentale in animali da reddito fungendo da ponte tra le sperimentazioni su questa tipologia di animali e animali da laboratorio.

I promettenti risultati ottenuti dalle sperimentazioni effettuate in modelli sperimentali murini di salmonellosi sistemica e gastroenterica [23 e 30] hanno promosso la volontà di provare l'efficacia di *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ znuABC in animali da reddito.

Gli animali vaccinati con *S. Typhimurium* SA186 non hanno palesato febbre né alcun segno di diarrea in seguito alla somministrazione del ceppo virulento *S. Typhimurium* ATCC 14028, e l'eliminazione fecale del batterio virulento, è stata inferiore agli animali controllo che al contrario hanno mostrato piressia ed evidenti segni di gastroenterite. Tali risultati indicano che *S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC, se inoculata per via orale, è in grado di indurre delle modificazioni del tratto gastroenterico, tali da alterare gli esiti di una infezione challenge indotta dalla somministrazione di un ceppo virulento di *Salmonella*.

Il modello sperimentale utilizzato, caratterizzato dall'uso di suini ibridi commerciali anziché animali gnotobiotici, è giustificato dalla necessità di studiare un modello sperimentale quanto più vicino alla realtà. Tale approccio trova comunque giustificazione anche dalla letteratura esistente, poiché un'analisi recentemente pubblicata, che riassume gli esiti di 28 studi effettuati per valutare l'efficacia della vaccinazione nel ridurre la prevalenza di *Salmonella* spp, dimostra come la maggioranza degli studi effettuati ha utilizzato animali commerciali.

Le due prove compiute su suini lattoni evidenziano che la dose di *S. Typhimurium* SA186 somministrata influenza direttamente gli esiti dell'immunizzazione. La riduzione della dose vaccinale ( $10^9$  UFC/suino anziché  $5 \times 10^9$  UFC/suino) ha evitato il rialzo termico, la comparsa di alterazioni della consistenza fecale e un cambiamento della dinamica dell'escrezione fecale (Fig10), osservati a seguito dell'utilizzo della dose più alta (Fig7). È lecito immaginare che la somministrazione di dosi inferiori di *S. Typhimurium* SA186 possa ulteriormente ridurre l'entità e l'arco temporale di eliminazione del ceppo vaccinale attraverso le feci. Una dose di  $10^{10}$  UFC/suino di *S. Typhimurium* ATCC 14028 ha determinato la comparsa di febbre e diarrea solo nei suini controllo in entrambe le sperimentazioni. Dati estrapolati da una precedente esperienza effettuata su suini lattoni di 4 settimane [26] evidenziano che la somministrazione di una dose di  $10^7$  UFC/suino di un ceppo virulento di *S. Typhimurium* determina l'escrezione fecale nel 100% dei soggetti, ma la comparsa di diarrea solo nel 50% e uno stato febbrile nel 20%. Questi dati permettono di dedurre che la dose utilizzata nella nostra sperimentazione per indurre l'infezione challenge sia stata estremamente elevata e possa aver ridotto la possibilità di apprezzare l'effetto protettivo, comunque evidente, indotto dalla previa somministrazione di *S. Typhimurium* SA186. Da ciò si potrebbe quindi dedurre che una riduzione anche della dose challenge può rendere ancor più eclatante l'effetto protettivo indotto dalla somministrazione del ceppo attenuato. Va inoltre sottolineato che, in conseguenza dell'esiguo numero degli animali utilizzati nelle sperimentazioni, la dinamica di eliminazione fecale del ceppo vaccinale e del ceppo challenge non risultano ben definite e le

differenze tra animali vaccinati e animali controllo non sempre raggiungono la significatività statistica.

La prova effettuata su suini magroni è stata eseguita mediante l'immunizzazione di due gruppi di animali con 2 dosi di *S. Typhimurium* SA355 (*Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ znuABC), inferiori a quelle utilizzate nei suini lattoni. Come sopra suggerito, la riduzione delle dosi ha esitato nella mancata comparsa di fenomeni di diarrea. Tuttavia, nel gruppo inoculato con la dose più alta ( $5 \times 10^8$  UFC/suino) è stato possibile osservare un modico e transitorio incremento della temperatura (Fig13). In entrambi i casi, gli animali vaccinati sono riusciti ad eliminare il ceppo vaccinale in maniera molto efficace e veloce. Sia gli animali immunizzati con  $5 \times 10^8$  UFC/suino (gruppo A), che gli animali del gruppo immunizzati con  $10^8$  UFC/suino (gruppo B), infatti, hanno cessato di eliminare il ceppo vaccinale entro 28 giorni dalla somministrazione (Fig14). I suini del gruppo B, comunque, immunizzati con una dose inferiore, hanno mostrato una minore eliminazione del ceppo attenuato rispetto al gruppo A. Ancora una volta appare evidente che gli esiti della vaccinazione subiscono un miglioramento con il diminuire della dose somministrata. In aggiunta alla differente dose utilizzata, è necessario però sottolineare che le differenze osservate nello studio che ha utilizzato lattoni, rispetto a quello che ha utilizzato magroni, potrebbero essere dovute alla maggiore resistenza di questi ultimi alle infezioni da *Salmonella*, come recentemente riportato da Wales [31].

La vaccinazione con *S. Typhimurium* SA355 sembra non aver limitato l'accrescimento degli animali. Il mancato incremento ponderale osservato in un suino del gruppo A e in un suino del gruppo B condiziona solamente in parte i risultati, infatti, le differenze di accrescimento osservate con il gruppo C e con il gruppo dei controlli non sono statisticamente significative (Fig15).

In seguito al challenge, la temperatura degli animali precedentemente immunizzati con il ceppo attenuato è stata statisticamente più bassa rispetto agli animali immunizzati con il vaccino attenuato e dei controlli (Fig16). Tutti gli animali indipendentemente dal trattamento subito hanno mostrato la capacità di ridurre l'eliminazione del ceppo virulento rispetto agli animali controllo. Gli animali del

gruppo A e gli animali del gruppo B, entrambi vaccinati con *S. Typhimurium* SA355, hanno avuto una rapida diminuzione dell'eliminazione del ceppo virulento che è cessata per tutti gli animali del gruppo A e tre animali del gruppo B a 14 giorni dall'inoculo (Fig17 e Fig18). La somministrazione di un vaccino inattivato (gruppo C) ha dimostrato di saper contenere l'eliminazione di *S. Typhimurium* ATCC 14028 rispetto agli animali controllo seppur in maniera meno evidente degli animali del gruppo A e B.

Questi risultati sono in linea con quanto in precedenza pubblicato in letteratura [19, 20, 21, 32] che riporta una maggiore efficacia dei vaccini vivi attenuati rispetto ai vaccini inattivati in virtù della maggiore capacità di indurre una risposta cellulo-mediata e una maggiore produzione di IgA. I dati nel loro insieme confermano che il ceppo attenuato di *S. Typhimurium* da noi utilizzato, se somministrato per via orale è in grado di proteggere suini di età differenti da infezioni challenge indotte da ceppi virulenti di *Salmonella* Typhimurium. La protezione conferita è in grado di prevenire i sintomi clinici della malattia garantendo un mantenimento delle performance produttive (Fig.19) e, soprattutto, ridurre l'eliminazione per via fecale del ceppo challenge riducendo la possibilità di trasmissione del batterio a suini suscettibili.

Un successivo sviluppo consisterà nel valutare quanto la somministrazione di *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ znuABC sia in grado di incrementare la resistenza all'infezione riducendo il numero di suini carrier, i maggiori responsabili dell'introduzione di *Salmonella* nella catena alimentare.

L'incapacità di crescere in terreni poveri di zinco permette una facile differenziazione colturale di *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ znuABC rispetto ai ceppi virulenti. La delezione del sistema enzimatico per la captazione dello zinco  $\Delta$ znuABC è un rapido sistema di attenuazione che può essere facilmente applicato a vari sierotipi, questo vantaggio permette di ipotizzare la creazione di preparati vaccinali contenenti numerosi sierotipi in considerazione della situazione epidemiologica osservata.

## 5.BIBLIOGRAFIA

1. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 29;356 (2001) 983-9.
2. Acha, P. N. & Szyfres, B.. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. Whashington DC, Pan American Health Organization. (2003)
3. Berends, B.R., Van Knapen, F., Mossel, D.A.A., Burt, S.A., Snijder, J.M.A.: Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int J Food Microbiol* 44 (1998), 219-229.
4. Hald T., Vose D., Wegener H.C., Koupeev T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal* 24 (2004): 255-69.
5. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 2011 *EFSA Journal* 9 :1-378.
6. Anderson RC, Nisbet DJ, Buckley SA, Genovese KJ, Harvey RB, Deloach JR, Keith NK, Stanker LH. Experimental and natural infection of early weaned pigs with *Salmonella choleraesuis*. *Res Vet Sci*; 64 (1998):261-2.
7. Genovese KJ, Anderson RC, Harvey RB, Callaway TR, Poole TL, Edrington TS, Fedorka-Cray PJ, Nisbet DJ. Competitive exclusion of *Salmonella* from the gut of neonatal and weaned pigs. *J Food Prot* 66 (2003) :1353-9.
8. Letellier A, Messier S, Lessard L, Quessy S. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Can J Vet Res.* 64 (2000) :27-31.
9. Taube VA, Neu ME, Hassan Y, Verspohl J, Beyerbach M, Kamphues J. Effects of dietary additives (potassium diformate/organic acids) as well as influences of grinding intensity (coarse/fine) of diets for weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby or *Escherichia coli*. *J Anim Physiol Anim Nutr* 93 (2009):350-8.



10. Jorgensen L., Kjaersgaard, H. D., Wachmann, H., Jensen, B. B. and Knudsen, K. E. B. Salmonella prevalence and productivity in weaners. 2001 Proceedings of the 4th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella and other Foodborne Pathogens in Pork (Salinpork 2001). Leipzig, September 2 to 5, (2001) 109-111.
11. Wales, A. D., McLaren, I. M., Bedford, S., Carrique-mas J. J., Cook, A. J. C. and Davies, R. H. Longitudinal survey of the occurrence of *Salmonella* in pigs and the environment of nucleus breeder and multiplier pig herds in England. *Veterinary Record* 165 (2009): 648-657.
12. Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res* 50 (1989) 1015-21.
13. Fedorka-Cray, P.J., Gray, J.T., Wray, C., 2000. *Salmonella* infections in pigs. In: Wray, C., Wray, A. *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Wallingford,: 191–207.
14. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssman H and Hardt WD. Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host. *Infect Imm* 71 (2003) 2839-2858.
15. Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 16 (2008) 107-14
16. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C, Hardt WD. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5 (2007) 2177-89.
17. Stecher B, Paesold G, Barthel M, Kremer M, Jantsch J, Stallmach T, Heikenwalder M, Hardt WD. Chronic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced colitis and cholangitis in streptomycin-pretreated *Nramp1*<sup>+/+</sup> mice. *Infect Immun* 74 (2006) 5047-57.

18. Barrow PA, Page K, Lovell MA. The virulence for gnotobiotic pigs of live attenuated vaccine strains of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine* 19 (2001) 3432-6.
19. Denagamage TN, O'Connor AM, Sargeant JM, Rajić A, McKean JD. Efficacy of vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 4 (2007) 539-49.
20. Fosse J, Seegers H, Magras C. Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses Public Health* 56 (2009) 429-54.
21. Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol* 130 (2008) 1-19.
22. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A. High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 75 (2007) 5867-76.
23. Pasquali P, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, Valente C, Marenzoni ML, Rotilio G, Battistoni A. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZnuABC transporter confers immune-based protection against challenge infections in mice. *Vaccine* 26 (2008) 3421-6.
24. Datsenko KA and Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;**97**: 6640–6645.
25. Wales A, Breslin M, Davies R. Assessment of cleaning and disinfection in *Salmonella*-contaminated poultry layer houses using qualitative and semi-quantitative culture techniques. *Vet Microbiol* 116 (2006) 283-93.

26. Boyen F, Pasmans F, Van Immerseel F, Donné E, Morgan E, Ducatelle R, Haesebrouck F. Porcine in vitro and in vivo models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs. *Lab Anim.* (2009) 43:46-52.
27. Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Müller AJ, Heikenwalder M, Stallmach T, Hensel M, Pfeffer K, Akira S, Hardt WD. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 174 (2005) 1675-85.
28. Hapfelmeier S, Müller AJ, Stecher B, Kaiser P, Barthel M, Endt K, Eberhard M, Robbiani R, Jacobi CA, Heikenwalder M, Kirschning C, Jung S, Stallmach T, Kremer M, Hardt WD. Microbe sampling by mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in *Salmonella* Typhimurium colitis. *J Exp Med* 205 (2008) 437-50.
29. Valdez Y, Grassl GA, Guttman JA, Coburn B, Gros P, Vallance BA, Finlay BB. Nramp1 drives an accelerated inflammatory response during *Salmonella*-induced colitis in mice. *Cell Microbiol* 11 (2009) 351-62.
30. Pesciaroli M, Aloisio F, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, Francia M, Battistoni A, Pasquali P. An attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain lacking the ZnuABC transporter induces protection in a mouse intestinal model of *Salmonella* infection. *Vaccine* (2011); 29(9):1783-90.
31. Wales AD, Cook AJ, Davies RH. Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *Vet Rec* (2011) 12;168:267-76.
32. Loynachan AT, Harris DL. Dose determination for acute *Salmonella* infection in pigs. *Appl Environ Microbiol* 71 (2005) 2753-5.
33. Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro- *Salmonella* vaccines. *Microb Pathog.* 13 (1992); 477-91.

# INDICE

<b>1.INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>2.MATERIALI E METODI</b> .....	<b>9</b>
2.2.Costituzione della mutante <i>Salmonella</i> Typhimurium SA 186 .....	10
2.5. Immunizzazione e infezione challenge .....	13
2.6. Saggio di protezione .....	13
2.7. Valutazione dell'infezione .....	13
2.8. Produzione ex vivo di IFN- $\gamma$ .....	14
2.9. Istopatologia .....	14
2.10.Prove su suini lattoni.....	16
2.11.Prove su suini da ingrasso.....	18
2.12. Analisi statistica .....	19
<b>3. RISULTATI</b> .....	<b>20</b>
3.1. <i>Salmonella</i> Typhimurium SA186 protegge da una infezione enterica in topi.....	20
3.2. L'immunizzazione con <i>Salmonella</i> Typhimurium SA186 riduce la colonizzazione sistemica ed enterica del ceppo virulento. ....	21
3.3. Ex vivo production of IFN- $\gamma$ .....	23
3.4 <i>Salmonella</i> Typhimurium SA186 limita l'infiammazione nel cieco.....	25
3.5.Prova su suini lattoni.....	28
3.6.Prova su suini magroni.....	34
<b>4.DISCUSSIONE</b> .....	<b>42</b>
<b>5.BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>48</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>52</b>