

# EFFICACIA DI UN VACCINO ATTENUATO E DI UNO INATTIVATO PER LA PROFILASSI DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO

## EFFICACY OF AN ATTENUATED AND KILLED (INACTIVATED) *SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRAINS AGAINST *SALMONELLOSIS* IN GROWING PIGS

RUGGERI J.<sup>1</sup>, PESCIAROLI M.<sup>2,3</sup>, MARTINELLI N.<sup>1</sup>, GRADASSI M.<sup>1</sup>, SCAGLIONE F.E.<sup>4</sup>, AMMENDOLA S.<sup>5</sup>, BATTISTONI A.<sup>5</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>6</sup>, PASQUALI P.<sup>2</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 25124 Brescia, Italy;

<sup>2</sup>Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; FAO Reference Center for Veterinary Public Health.

<sup>3</sup>VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense Madrid. 28040 Madrid. Spain.

<sup>4</sup>Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Torino, 10095 Torino, Italy;

<sup>5</sup>Department of Biology, Università di Roma Tor Vergata, 00133 Rome, Italy;

<sup>6</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, 06126 Perugia, Italy.

**Parole chiave:** Vaccino mucosale, *Salmonella*, Suino, Sicurezza, Immunogenicità.

**Keywords:** Mucosal vaccine, *Salmonella*, Pig, Safety, Immunogenicity.

### RIASSUNTO

La contaminazione della carne di suino da *Salmonella* spp. è una delle cause d'infezioni enteriche dell'uomo e la vaccinazione dei suini può ridurre la contaminazione lungo la catena produttiva. Recentemente abbiamo dimostrato che *S.Typhimurium* deleta del trasportatore ZnuABC (*S.Typhimurium*  $\Delta$ znuABC) è un vaccino attenuato promettente in alcuni modelli murini d'infezione da *S.Typhimurium* (Ammendola, 2007; Pasquali, 2008; Pesciaroli, 2011). In questo studio, abbiamo confermato la sicurezza e l'efficacia di *S.Typhimurium*  $\Delta$ znuABC somministrato per via orale nei suini. La sicurezza di *S.Typhimurium*  $\Delta$ znuABC è stata testata monitorando le condizioni cliniche degli animali ed eseguendo analisi microbiologiche e sierologiche della risposta immunitaria umorale e cellulare nei campioni di feci e di sangue. Abbiamo testato l'efficacia di *S.Typhimurium*  $\Delta$ znuABC in 2 gruppi di suini vaccinati con 2 diversi dosaggi del ceppo, paragonando i risultati con quelli ottenuti da un gruppo di suini vaccinati con un ceppo inattivato e da un gruppo non vaccinato. Dopo l'infezione con il ceppo omologo virulento, i suini vaccinati con *S.Typhimurium*  $\Delta$ znuABC non presentavano segni clinici e la colonizzazione del tratto intestinale e l'eliminazione fecale del ceppo virulento di *S.Typhimurium* era ridotta rispetto ai controlli.

Questi risultati suggeriscono che *S.Typhimurium*  $\Delta$ znuABC è attenuato e immunogeno nei suini e potrebbe essere un promettente vaccino mucosale attenuato.

### ABSTRACT

Pork meat contamination by *Salmonella* spp. is a major cause of human enteric infections in industrialized countries and vaccination of pigs may represent an effective instrument in reducing *Salmonella* burden through the food chain. We have previously demonstrated that

*S. Typhimurium* lacking the ZnuABC transporter (*S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC) is a promising candidate live vaccine in different mouse models of *S. Typhimurium* infection (Ammendola, 2007; Pasquali, 2008; Pesciaroli, 2011). In this study, we confirmed in pigs the safety and immunogenicity of *S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC orally administered. We have tested the safety of *S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC monitoring clinical conditions of animals and we conducted a microbiological culture and a quantification of the humoral and cellular immune response, respectively, on fecal and blood samples of pigs. We have tested the protective effects of *S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC in four groups of pigs: animals vaccinated with *S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC (two dosages tested), controls vaccinated with a formalin-inactivated virulent strain and unvaccinated controls. After the challenge, pigs vaccinated with the attenuated *S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC strain did not display clinical signs of salmonellosis. The vaccine reduced intestinal tract colonization and fecal shedding of the fully virulent *Salmonella* strain. These results suggest that *S. Typhimurium*  $\Delta$ znuABC is attenuated and immunogenic in pigs and it could be a promising attenuated live mucosal vaccine.

## INTRODUZIONE

*Salmonella* spp. è un batterio responsabile di infezioni zoonotiche. L'emergenza dovuta all'antibiotico-resistenza ha ridotto gli approcci terapeutici, aumentando la percentuale di malattia nell'uomo. La salmonellosi è un problema anche per gli allevatori per la riduzione dell'indice di produzione o l'aumento della percentuale di morti (Selke, 2007; Hur, 2010; Pasquali, 2008).

A tutela della salute umana, la Comunità Europea ha emanato dei regolamenti per l'individuazione e il controllo di alcune serovar di *Salmonella* lungo tutta la filiera alimentare.

Le strategie per ridurre la prevalenza prevedono: programmi di controllo sierologico, misure di biosicurezza, metafilassi con mangimi medicati, probiotici ed acidi organici e controllo degli animali infestanti. La vaccinazione sembrerebbe rappresentare la prima soluzione per ridurre l'eliminazione fecale e la contaminazione ambientale nei paesi con alta percentuale d'isolamento di *Salmonella* –spp. al macello (Boyen, 2008; Hur, 2011). Un vaccino attenuato, sicuro ed efficace per i suini non è ancora presente in commercio (Pasquali, 2008).

Il nostro lavoro ha l'obiettivo di produrre un vaccino sicuro, efficace e facilmente somministrabile, che associato alle buone pratiche manageriali consentirà di ridurre la percentuale d'isolamento di *Salmonella* –spp. al macello (Rostagno, 2011; Leymann, 2011; Beloeil, 2007).

## MATERIALI E METODI

### *Ceppi Batterici*

In questo studio è stato utilizzato un ceppo mutante di *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, caratterizzato dalla delezione dell'operone *znuABC*, ottenuta attraverso la ricombinazione omologa di un frammento di PCR, inserendo la cassetta di resistenza all'antibiotico nel gene target.

### *Sierologia*

I sieri prelevati da ogni animale sono stati sottoposti ad indagine sierologica mediante un kit ELISA indiretto (Herd-Check Swine Salmonella Antibody Test Kit, Idexx Laboratories Inc., Switzerland).

Il sangue prelevato con l'anticoagulante è stato sottoposto alla prova dell'IFN- $\gamma$ , titolando la citochina con un'ELISA sandwich (Porcine IFN- $\gamma$  Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, MN, USA).

### *Microbiologia*

Le analisi microbiologiche, condotte in accordo alla procedura ISO 6579:2002, hanno lo scopo di determinare il titolo nei campioni in esame di *Salmonella spp.* Le feci e gli organi sono stati pesati e addizionati di nove parti di Acqua Peptonata Tamponata (BPW) (Oxoid Ltd, UK), omogenati in stomacher e diluiti in diluizioni scalari. Tutte le diluizioni sono state incubate a 37°C per 18 ± 3 ore e, 0.1 ml delle diluizioni, sono state seminate in piastre di MSRV (semisolid modified Rappaport-Vassiliadis agar, Oxoid Ltd, UK) e incubate a 41.5°C per 24/48 ore.

Le piastre di MRSV positive sono trapiantate in due terreni selettivi differenziali che sono Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (Oxoid Ltd, UK) e Brillant Green Agar (Oxoid Ltd, UK) e incubate a 37° C per 18 ± 3 ore. Le colonie sospette sono trapiantate per infissione in TSI agar (Reparto Produzione Terreni, Izslar, Brescia), e incubate a 37° C per 18 ± 3 ore. La crescita viene sottoposta a identificazione biochimica in micrometodo con BBL Enterotube II (BD Franklin Lakes, NJ USA).

Dopo l'identificazione biochimica, i campioni positivi sono inviati al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, il quale definisce il sierotipo coinvolto mediante tipizzazione sierologica.

Inoltre, le colonie sospette sono state sottoposte all'identificazione in PCR per distinguere il ceppo virulento da *S.Typhimurium ΔznuABC*.

I tamponi ambientali, prelevati dal box di ogni gruppo, sono sottoposti solo ad analisi qualitative, indicanti la sola presenza o assenza del microrganismo.

### *Disegno sperimentale*

Ventisei suini magroni, acquistati presso un allevamento *Salmonella*-SPF, sono stati alloggiati presso le stalle d'isolamento dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

I suini sono stati divisi in quattro gruppi. I gruppi A (6 suini) e B (6 suini) sono stati vaccinati per via orale mediante una sonda gastrica con, rispettivamente, 5x10<sup>8</sup> e 5x10<sup>7</sup> UFC di *S.Typhimurium ΔznuABC*, sciolta in 20 ml di una soluzione di sodio bicarbonato al 10 %, per favorire una migliore sopravvivenza del microrganismo. Il gruppo C è stato vaccinato per via intramuscolare con 2 ml di *S.Typhimurium* inattivata, alla dose di 10<sup>9</sup> UFC. Il gruppo D (8 suini) è il gruppo controllo.

Ai giorni 1, 2, 7, 14 e 21, dopo la vaccinazione, sono stati eseguiti i prelievi di sangue, feci e tamponi ambientali ed è stata misurata la temperatura. Dopo trentacinque giorni, gli animali sono stati pesati ed inoculati con il ceppo virulento. Il challenge è stato eseguito per via orale con 4x10<sup>8</sup> UFC di *S.Typhimurium* virulenta mediante sonda gastrica. Ogni settimana, fino all'abbattimento, sono stati prelevati il sangue, le feci, i tamponi ambientali e la temperatura dei soggetti. Tre settimane dopo il challenge, i suini sono stati sottoposti ad eutanasia e le tonsille, il fegato, il rene, la milza, la cistifellea, i linfonodi cieco-colici, il polmone, il duodeno, il digiuno prossimale e distale, l'ileo, il cieco e il colon sono stati prelevati per l'esame microbiologico.

## **RISULTATI**

### *Sicurezza di *S.Typhimurium ΔznuABC**

Un leggero rialzo febbrile è stato registrato in alcuni animali dei gruppi vaccinati con *S.Typhimurium ΔznuABC*, fino al secondo giorno post-vaccinazione (Fig.1). Non ci sono differenze statisticamente significative nel ritmo di crescita tra soggetti vaccinati e i controlli (Fig.2).

Fig.1 Lieve aumento della temperatura media del gruppo A e del gruppo B dopo la vaccinazione con *S. Typhimurium* ΔznuABC. È rappresentata la temperatura media di ogni gruppo e la deviazione standard ai differenti time-points.

Fig.1 Group A and B display rise of body temperature after vaccination with *S. Typhimurium* ΔznuABC. Mean values and SD bars of body temperature of each group at different time-points

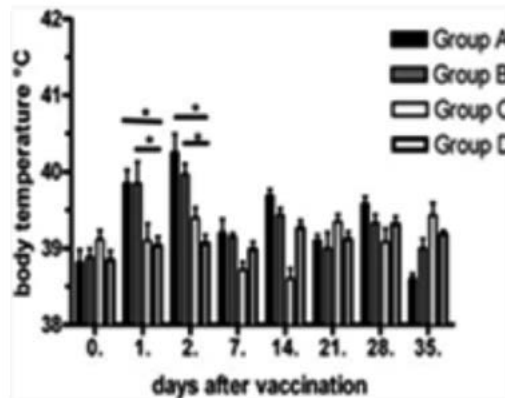
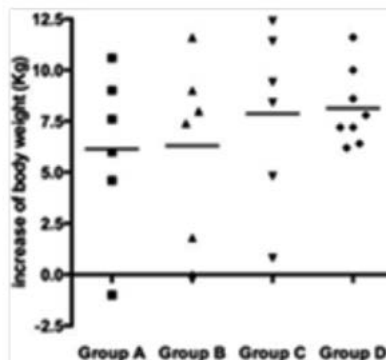


Fig.2 Incremento di peso degli animali dei differenti gruppi a seguito della vaccinazione. Ogni simbolo rappresenta un animale e la barra il valore medio di gruppo

Fig.2 Weight gain of animals of different groups. Each symbol represents one animal and bars represent mean value of the group.



La concentrazione di *S. Typhimurium* ΔznuABC nelle feci decresce e dopo 28 giorni non è stata isolata dai gruppi trattati (Fig.3). Nei tamponi ambientali il ceppo è stato isolato fino al settimo giorno post- vaccinazione.

Negli animali vaccinati la produzione di anticorpi aumenta dal settimo giorno post- vaccinazione (Fig.4) e non ci sono differenze statisticamente significative della titolazione dell'IFN- $\gamma$ .

Fig. 3 Eliminazione fecale di *S.Typhimurium AznuABC* dal gruppo A e dal gruppo B dopo la somministrazione orale di, rispettivamente  $5 \times 10^8$  e  $5 \times 10^7$  CFU/suino. È riportato il valore medio di CFU/g di ogni gruppo e la deviazione standard ai diversi time-points.

Fig.3 Fecal shedding of *S.Typhimurium AznuABC* by groups A and B after oral administration with  $5 \times 10^8$  e  $5 \times 10^7$  CFU/pig, respectively. Mean values with SD bars of CFU/g of each group at different time points.

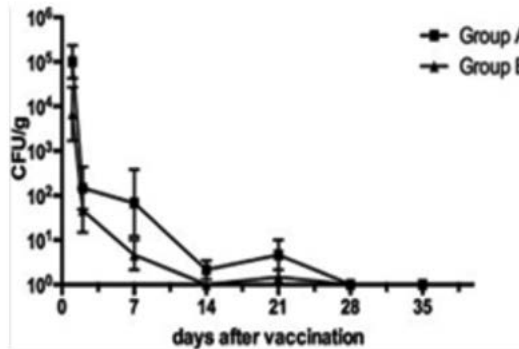
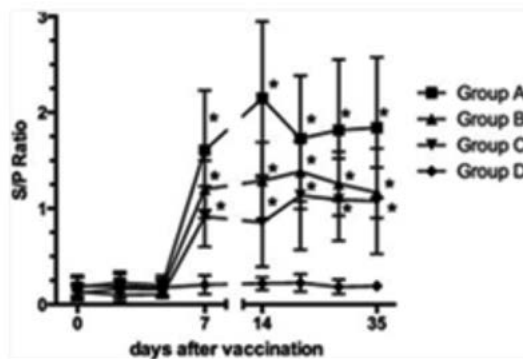


Fig. 4 *S.Typhimurium AznuABC* e *S.Typhimurium* ATCC14028 inattivato inducono una risposta immunitaria umorale simile. Dopo la vaccinazione il siero dei suini è stato prelevato in diversi momenti (1, 7, 14, 21, 28, 35 giorni post-vaccinazione). È rappresentato il valore medio del titolo anticorpale di ogni gruppo associato alla deviazione standard (barra) ai diversi time-points. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa tra i gruppi A, B e C ed il gruppo D.  $P \leq 0,05$

Fig. 4 *S.Typhimurium AznuABC* and inactivated *S.Typhimurium* ATCC14028 induce a similar pattern of humoral immune response. After vaccination, serum of pigs was collected at several time-points; Mean values with SD bars of antibodies titers of each group at different time points. Groups with asterisk are statistically different from group D at the time point considered \* $P$ -value  $\leq 0,05$



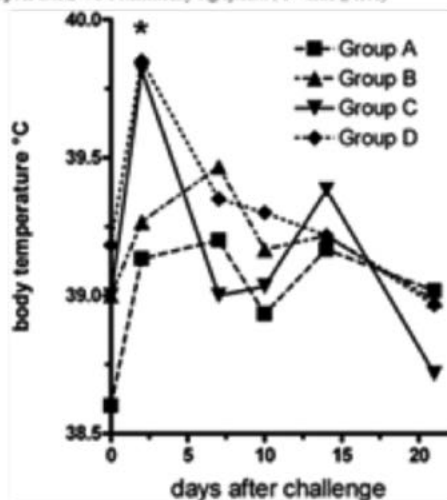
### Efficacia di *S.Typhimurium AznuABC*

Gli animali vaccinati del gruppo A e B non hanno evidenziato segni clinici a seguito dell'infezione con il ceppo virulento, diversamente gli animali del gruppo C e D hanno evidenziato prostrazione, anoressia e incremento transitorio della temperatura corporea.

A 2 giorni dal challenge i soggetti dei gruppi C e D avevano una temperatura corporea media superiore rispetto ai gruppi A e B (Fig.5).

Fig. 5 Temperatura corporea media di gruppo ai diversi time point dopo il challenge con *S.Typhimurium* ATCC 14028. A due giorni dal challenge c'è una differenza statisticamente significativa di temperatura media di gruppo tra il gruppo A (vaccinati con il ceppo attenuato) e il gruppo D (non vaccinato).

Fig. 5 Body temperature at different time points after a challenge infection with virulent *S.Typhimurium*. The differences between groups A and D were statistically significant ( $P$ -value  $\leq 0,05$ )



L'incremento medio di peso è di 7.7 Kg per il gruppo A, 6.1 Kg per il gruppo B, 5.9 Kg per il gruppo C e 3.3 Kg per il gruppo D.

L'incremento di produzione dell'IFN- $\gamma$  nel gruppo B inizia dal secondo giorno post-challenge. Tutti i gruppi vaccinati producono l'IFN- $\gamma$  a 7 giorni dal challenge, mentre il gruppo D raggiunge un picco di produzione d'IFN- $\gamma$  dopo tre settimane (Fig.6).

Fig. 6 Incremento della produzione di IFN- $\gamma$  nei gruppi in esame ai time point successivi al challenge. Incremento rapido nel gruppo A a due giorni dal challenge. Nel gruppo D inizia il settimo giorno post-infezione con un picco massimo alla terza settimana.

Fig. 6 Production of IFN- $\gamma$  in groups after challenge, starting two days after infection in group A e seven days after infection in group D.

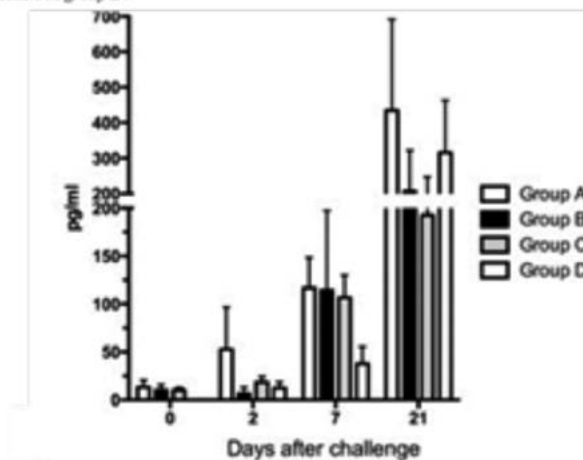
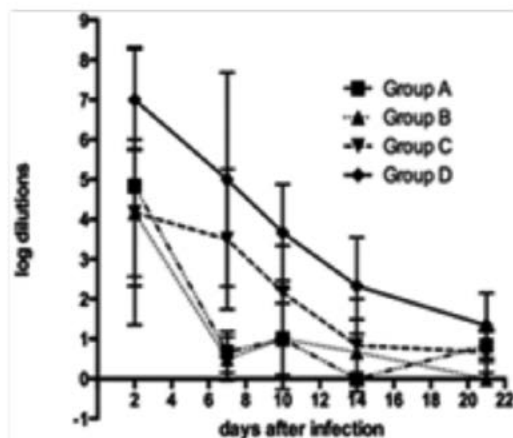


Fig. 7 Eliminazione fecale del ceppo virulento di *S.Typhimurium* nei giorni successivi all'infezione nei quattro gruppi. I simboli rappresentano la concentrazione media di eliminazione di *S.Typhimurium* per ogni gruppo ai diversi prelievi, le barre rappresentano la deviazione standard.

Fig. 7 *S.Typhimurium* fecal shedding at different time points after challenge infection. Symbols represent group means, bars represent standard deviation.



La consistenza delle feci è stata punteggiata mediante una scala arbitraria (0 feci normali, 5 feci acquose). Esiste una differenza statisticamente significativa tra il gruppo D ed i gruppi A e B a due giorni dall'infezione.

L'eliminazione fecale di *S.Typhimurium* nei gruppi vaccinati (A, B e C) è minore rispetto ai soggetti infetti del gruppo D, a due giorni dal challenge. Dalla prima settimana post-infezione, i gruppi A e B hanno evidenziato una radicale diminuzione della concentrazione di *S.Typhimurium* nelle feci (Fig.7).

All'abbattimento i soggetti vaccinati con il ceppo inattivato hanno una maggiore colonizzazione a carico degli organi linfatici e una minore colonizzazione degli organi intestinali rispetto al gruppo D. Mentre *S. Typhimurium* colonizza gli organi degli animali dei gruppi A e B a concentrazioni inferiori rispetto ai gruppi C e D.

## DISCUSSIONE

La salmonellosi negli allevamenti suini è un danno economico a carico degli allevatori ed è un pericolo per la salute dei consumatori.

Negli allevamenti con alto indice di prevalenza, la vaccinazione, associata alle buone pratiche manageriali, è lo strumento più valido nel controllo dell'infezione.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di allestire un vaccino vivo attenuato di *S.Typhimurium*, delecto del gene che codifica per un trasportatore dello zinco ( $\Delta znuABC$ ) e di valutarne la sicurezza e l'efficacia nei suini in condizioni sperimentali.

*S.Typhimurium*  $\Delta znuABC$ , a questi dosaggi, non è patogeno se somministrato ai suini in accrescimento. Non ha rallentato l'accrescimento degli animali e l'ecotossicità è limitata ai primi 14 giorni.

*S.Typhimurium*  $\Delta znuABC$  è immunogeno poiché determina la produzione di IgA, altamente protettive nei confronti dei microrganismi enteropatogeni (Hur et al., 2010, 2011) e stimola la risposta immunitaria cellulo-mediata caratterizzata da una rapida e cospicua produzione

d'IFN- $\gamma$  nei gruppi vaccinati con il ceppo attenuato a seguito del challenge.

*S. Typhimurium*  $\Delta znuABC$  è efficace, pochi animali dei gruppi A e B, rispetto ai gruppi C e D, hanno manifestato diarrea e febbre dopo l'infezione con il ceppo virulento. La clearance di *S. Typhimurium* è più rapida nei soggetti vaccinati del gruppo A e B e la concentrazione di colonizzazione degli organi di questi suini è minore rispetto agli altri gruppi. È presumibile sostenere che la vaccinazione con *S. Typhimurium*  $\Delta znuABC$  protegge dalla malattia e riduce il numero di portatori nell'allevamento.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Rotilio G, Battistoni A. (2007) "High affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to virulence of *Salmonella enterica*". *Infect Immun* 75, 5867-5876.
2. Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Fablet C, Madec F, Alioum A. (2007) "Risk factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow-to-finish herds". *Vet Res* 38, 835-848.
3. Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. (2009) "Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control". *Veterinary Microbiology* 130, 1-19.
4. Hur J, Lee JH. (2010) "Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis". *Vet Microbiol* 143, 270-276.
5. Hur J, Song SO., Lim JS., Chung IK., Lee JH. (2011) "Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella Typhimurium* vaccine for protection against *Salmonella* infections in growing piglets". *Vet Immunol Immunopathol* 139, 250-256.
6. Leyman B., Boyen F., Van Parys A., Verbrugge E., Haesebrouck F., Pasmans F. (2011) "*Salmonella Typhimurium* LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs". *Vaccine* 29, 3679-3685.
7. Pasquali P, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, Valente C, et al. (2008) "Attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* lacking the ZnuABC transporter confers immune-based protection against challenge infections in mice". *Vaccine* 26, 3421-3426.
8. Pesciaroli M, Aloisio F, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, et al. (2011) "An attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strain lacking the ZnuABC transporter induces protection in a mouse intestinal model of *Salmonella* infection". *Vaccine* 29, 1783-1790.
9. Rostagno M. (2011) "Vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in pigs". *Veterinary Record* 169, 551-552.
10. Selke M, Meens J, Springer S, Frank R, Gerlach GF. (2007) "Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* live negative-marker vaccine". *Infect Immun* 75, 2476-83.