

EFFETTI DELLA VACCINAZIONE CON BIO-VAC SGP695 IN GALLINE OVAIOLE INFETTATE SPERIMENTALMENTE CON *S. ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS

Lozito P. ¹, Fontana M.C. ², Merialdi G. ², Meliota F. ¹

¹ FATRO S.P.A.

² ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA "B. UBERTINI" - SEZ. DI BOLOGNA

SUMMARY

BIO-VAC SGP695 is a freeze-dried vaccine having as active substance the live attenuated strain *Salmonella gallinarum/pullorum* SGP695AV^c (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum, otherwise *S. Gallinarum*) able to confer protection against fowl typhoid.

S. enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) is one of the most important problems for the poultry rearing and especially laying hens due to public health implications related to the unique ability of this serotype to infect the ovary and consequently contaminate the eggs.

Since both *S. Gallinarum* and *S. Enteritidis* belong to serogroup O D1, respectively with antigenic formula 1,9,12:-:- and 1,9,12:g,m:-, does exist a good degree of cross-protection between the two serovars.

S. Enteritidis can infect domestic fowl, with particular tropism for the adult ovary and can be present as a contaminant in eggs laid, resulting in significant risk to public health.

The study was conducted to evaluate the efficacy of the vaccine BIO-VAC SGP695 in adult layer hens challenged with a wild strain of *S. Enteritidis*.

Fifty-seven 50 weeks-old layer hens, in lay, obtained from a commercial Hy-line flock, were divided into 2 groups. The first group of 28 subjects, was vaccinated orally with a minimum dose of BIO-VAC SGP695 while the second group of 29 subjects, was used as an untreated control.

Approximately three weeks after vaccination, all the birds were subjected to oral challenge with $1,3 \times 10^9$ CFU/bird of a wild strain of *S. Enteritidis* (PT 4).

At predetermined intervals after challenge (4, 7 and 11 days), an equal number of birds was taken from the two groups and sacrificed to perform the post-mortem examination, directed at the identification of specific lesions caused by infection to the liver, spleen and ovary and the bacteriological reisolation of the challenge microorganism from the above-mentioned organs.

Following challenge, just one subject, of the control group, showed symptoms; no mortality was recorded. At the post-mortem examination, lesions to the organs examined were found only in two control subjects, in the form of ovaritis.

The day-by-day comparison between the data for reisolation of salmonella from the various organs in the vaccinated and control subjects, highlighted a significant reduction in colonization by *S. Enteritidis* in the ovaries of the vaccinated birds already at 7 days post-infection ($P=0,01$). The analysis of the reisolation results from the samples at 11th day post-infection highlights a very significant reduction in colonization of the liver, spleen and ovary in the vaccinated birds ($P<0,01$).

Also comparing the overall data of the isolation of the challenge strain from the ovaries in the two groups, the difference is confirmed as extremely significant ($P < 0,0001$), in favour of the vaccinated group.

The study demonstrates that the vaccine BIO-VAC SGP695 with a single administration and at the minimum dosage contemplated confers good cross-protection from challenge with *S. Enteritidis*, at a high infecting titre.

Colonization of the organs of vaccinated hens by *S. Enteritidis* was shown to be significantly reduced over time.

The result obtained is especially important as regards the data concerning the protection conferred on the ovary, given the importance of this organ in the transmission of infection from hen to egg/chick (vertical transmission) and, in the case of hens producing market eggs, the risk of transmission to man via the eggs.

INTRODUZIONE

BIO-VAC SGP695 è un vaccino vivo attenuato contro la tifoosi aviare avente come principio attivo il ceppo *Salmonella gallinarum/pullorum* SGP695AV^è (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum o *S. Gallinarum*), capace di conferire protezione verso *Salmonella* Gallinarum (1).

Assieme alla tifoosi aviare un'altra infezione di particolare importanza per l'allevamento avicolo ed in particolare per quello dell'ovaioia è l'infezione da *S. Enteritidis* (*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis) soprattutto per le implicazioni di sanità pubblica connesse alla peculiarità di questo sierotipo di infettare l'ovario e di conseguenza contaminare l'uovo.

Questo sierotipo rappresenta la maggior causa di salmonellosi di origine alimentare nell'uomo a livello mondiale da 20 anni e in questo periodo il più importante veicolo di infezione risulta appunto l'uovo di gallina infetta (2).

S. Gallinarum e *S. Enteritidis* appartengono entrambi al sierogruppo O D1 avendo formula antigenica rispettivamente **1,9,12:-:-** e **1,9,12:g,m:-** pertanto è possibile la protezione crociata fra i due serovars.

In passato, diversi studi hanno valutato la cross-protezione di vaccini per salmonella verso i serovar correlati, dimostrando che vaccini vivi per salmonella sono capaci di conferire un certo grado di cross-immunità verso serovars appartenenti allo stesso sierogruppo (3, 4, 5, 6).

Scopo del presente lavoro è stato la valutazione della protezione crociata indotta dalla vaccinazione con BIO-VAC SGP695 nei confronti dell'infezione sperimentale da *S. Enteritidis* in ovaiole, valutando in particolare la capacità di ridurre la colonizzazione dell'ovario, per prevenire la contaminazione dell'uovo per uso alimentare.

MATERIALI E METODI

Animali e gruppi sperimentali

Nello studio sono state utilizzate 57 galline ovaiole di razza Hy-line provenienti da un allevamento convenzionale che non attua profilassi vaccinale nei confronti di *Salmonella* spp., prelevate all'età di 14 settimane e trasferite in struttura isolata. Raggiunte le 50 settimane di vita, in piena fase di ovodeposizione, le galline sono state trasferite in stabulario sperimentale, suddivise in due gruppi di 28 e 29 soggetti ognuno e in gabbie senza possibilità di contatto fra i soggetti dei due gruppi.

Gli animali sono stati alloggiati in gabbie lineari per ovaiole con 5 soggetti per gabbia; l'acqua di bevanda è stata fornita *ad libitum* con abbeveratoi a *nipple*; per l'alimentazione, anch'essa *ad libitum* in mangiatoie lineari, è stato utilizzato il medesimo mangime utilizzato nell'allevamento di provenienza degli animali.

Il primo gruppo ha ricevuto un trattamento vaccinale con BIO-VAC SGP695 subito dopo il trasferimento; il secondo gruppo non è stato vaccinato ed ha costituito il gruppo di controllo.

Prima dell'inizio della prova, la sieronegatività di tutti i soggetti in esperimento nei confronti di *S. Enteritidis* è stata verificata mediante l'esecuzione di un test ELISA (kit ELISA X-OVO - Flockscreen® *S. enteritidis* - Guildhay Limited, England).

Vaccinazione

È stato utilizzato il vaccino BIO-VAC SGP695 il cui principio attivo è costituito dal ceppo di *Salmonella gallinarum/pullorum* SGP695AV^c attenuato mediante la tecnica di adattamento su eterofili di pollo (8,9).

Per la somministrazione agli animali il vaccino liofilizzato è stato ricostituito in acqua in modo da ottenere un titolo di circa 2×10^8 UFC per millilitro di sospensione, pari al minimo della dose vaccinale prevista.

Un millilitro di vaccino ricostituito è stato somministrato per via orale mediante siringhe senz'ago, secondo il seguente schema:

- gruppo vaccinato: una sola vaccinazione all'età di 50 settimane
- gruppo di controllo: nessun trattamento.

Infezione sperimentale

A circa 3 settimane dalla vaccinazione, tutti i soggetti in esperimento sono stati infettati per via orale con il ceppo selvaggio di campo FCB 356 di *S. Enteritidis* (fagotipo 4).

Per l'infezione è stata utilizzata una sospensione batterica ottenuta raccogliendo con soluzione fisiologica sterile il ceppo liofilizzato FCB 356 seminato e coltivato su TSA (Tryptone Soy Agar, Oxoid Ltd) per 24 ore a 37°C.

Un millilitro di questa sospensione è stato somministrato a ciascun soggetto e subito dopo titolato mediante semina su piastra determinando un titolo reale di $1,3 \times 10^9$ UFC/ml.

Osservazioni cliniche

Tutti i soggetti in esperimento sono stati tenuti in osservazione clinica quotidiana a partire dal giorno dell'infezione *challenge* fino a 11 giorni post-infezione (gg.p.i), al fine di valutare l'insorgenza di sintomi ad essa correlati

Esame batteriologico e anatomopatologico

Ad intervalli prestabiliti, corrispondenti a 4, 7 ed 11 giorni dopo l'infezione sperimentale, un ugual numero di soggetti di ciascun gruppo è stato soppresso e sottoposto agli esami di laboratorio.

Nello specifico da ciascun soggetto sono stati prelevati, in condizioni di asepsi, il fegato, la milza e l'ovario per l'esecuzione delle indagini batteriologiche per ricerca di *Salmonella* spp..

La ricerca è stata condotta mediante la procedura basata sul metodo ISO 6579:2002/AMD1:2007 (pre-arricchimento in acqua peptonata tamponata – arricchimento selettivo in Modified semisolid Rappaport Vassiliadis – isolamento in BGA - Brilliant Green Agar e XLD - Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar).

Sui medesimi organi è stato eseguito anche l'esame anatomico-patologico per l'individuazione di lesioni macroscopiche ascrivibili a salmonella.

Analisi statistica

I risultati degli esami batteriologici sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il Test esatto di Fisher per il confronto tra i dati relativi alla colonizzazione dei diversi organi nei soggetti vaccinati e nei controlli.

RISULTATI

Osservazioni cliniche

A seguito del *challenge* gli animali non hanno manifestato sintomi, fatta eccezione per un soggetto del gruppo controllo che ha presentato abbattimento, pallore della cresta ed anoressia a 7 gg.p.i. e che nella stessa data è stato soppresso per far parte del gruppo destinato agli esami di laboratorio.

Indagini batteriologiche e anatomico-patologiche

I risultati degli esami batteriologici per *Salmonella* spp., con l'annotazione delle lesioni di rilievo, sono riportati nelle tabelle 1-3. I risultati batteriologici sono presenti anche nei grafici 1-4.

Tabella 1: positività per *Salmonella* spp. 4° giorno post-infezione

Vaccinati				Controlli			
N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario	N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario
1	+	+	+	1	+	+	+
2	+	+	+	2	+	+	+
3	+	+	+	3	+	+	+
4	+	+	+	4	+	+	+
5	+	+	+	5	+	+	+
6	+	+	-	6	+	+	+
7	+	+	+	7	+	+	+
8	+	+	+	8	+	+	+
9	+	-	-	9	+	+	+
10	+	+	+	10	+	+	+
Pos./tot.	10/10	9/10	8/10	Pos./tot.	10/10	10/10	10/10

Tabella 2: positività per *Salmonella* spp. 7° giorno post-infezione

Vaccinati				Controlli			
N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario	N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario
1	+	+	+	1 ^A	+	+	+
2	+	+	+	2	+	+	+
3	+	+	-	3	+	+	+
4	-	-	-	4	+	+	+
5	+	+	+	5	+	+	+
6	+	-	-	6	+	+	+
7	+	+	-	7	+	+	+
8	+	+	+	8 ^B	+	+	+
9	-	-	-	9	+	-	+
10	-	-	-	10	+	+	+
Pos./tot.	7/10	6/10	4/10	Pos./tot.	10/10	9/10	10/10

^A ovarite, oviduttite, peritonite;

^B ovarite

Tabella 3: positività per *Salmonella* spp. 11° giorno post-infezione

Vaccinati				Controlli			
N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario	N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario
1	+	+	-	1	+	+	-
2	-	+	-	2	+	+	+
3	-	-	-	3	+	+	+
4	+	+	-	4	+	+	+
5	-	-	-	5	+	+	+
6	-	-	-	6	+	+	+
7	-	-	-	7	+	+	+
8 ^C	-	-	-	8	+	+	-
Pos./tot.	2/8	3/8	0/8	9 ^C	+	+	+
				Pos./tot.	9/9	9/9	7/9

^C peritonite

Analisi statistica

Il confronto giorno per giorno tra i dati relativi al reisolamento di salmonella dai diversi organi nei soggetti vaccinati e nei controlli, effettuato con Test esatto di Fisher, ha evidenziato una significativa riduzione ($P=0,01$) nei vaccinati della colonizzazione da *S. Enteritidis* nell'ovario già dopo 7 gg.p.i.(grafico 2).

Analogamente l'analisi dei risultati del reisolamento dai campioni dell'11° gg.p.i ha evidenziato una riduzione nella colonizzazione di fegato, milza ed ovario dei vaccinati altamente significativa (rispettivamente P uguale 0,0023, 0,0090 e 0,0023 - grafico 3). Il confronto dei risultati complessivi relativi all'isolamento dall'ovario a 4, 7 e 11 gg.p.i. conferma una differenza estremamente significativa a favore del gruppo vaccinato ($P=0,00005$ – grafico 4).

Grafico 1: positività per *Salmonella* spp. 4° giorno post-infezione

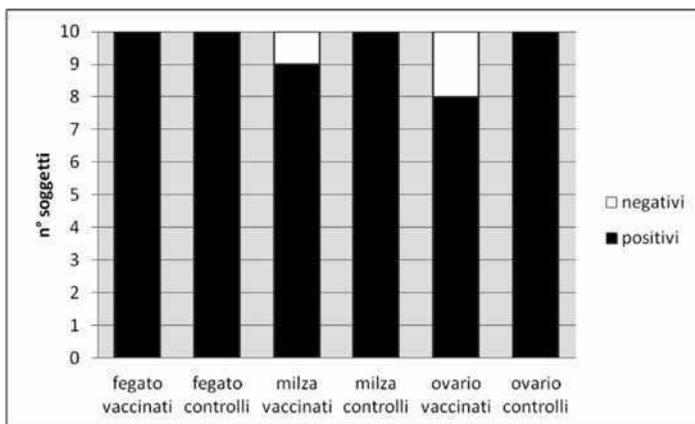
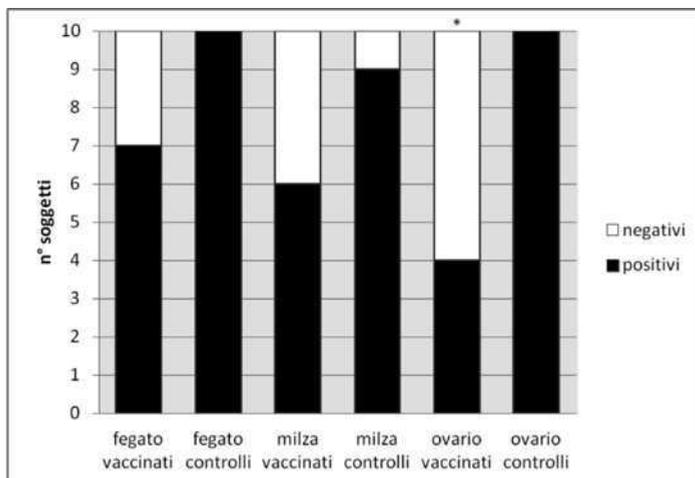
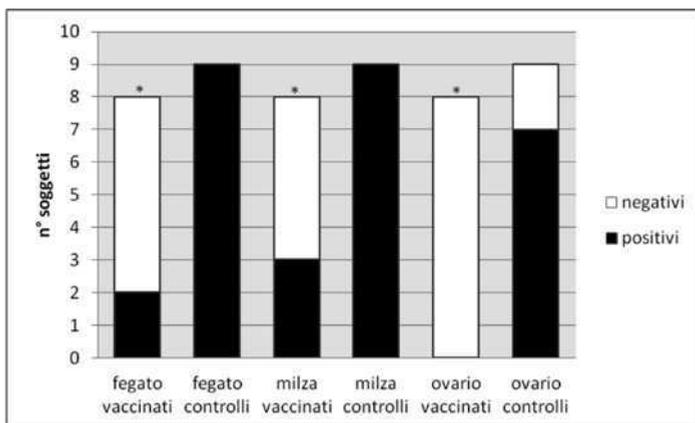


Grafico 2: positività per *Salmonella* spp. 7° giorno post-infezione



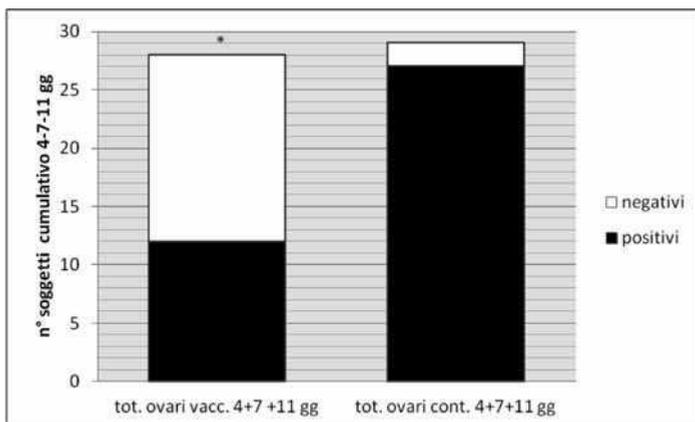
* differenza significativa rispetto al gruppo controllo ($P=0,01$)

Grafico 3: positività per *Salmonella* spp. 11° giorno post-infezione



* differenza altamente significativa rispetto ai gruppi controllo ($P < 0,001$)

Grafico 4: positività per *Salmonella* spp.: risultati complessivi da ovario 4°-7°-11° giorno post-infezione



* differenza estremamente significativa rispetto al gruppo controllo ($P < 0,0001$)

DISCUSSIONE RISULTATI

L'infezione sperimentale con *S. Enteritidis*, che solitamente in condizioni di campo non provoca forme sintomatiche, ha determinato la comparsa di malattia in un soggetto del gruppo controllo probabilmente a causa dell'elevato titolo infettante somministrato.

Inoltre in 3 soggetti del gruppo controllo sono state evidenziate lesioni anatomopatologiche a carico di ovario e peritoneo specifiche da salmonella come confermato dall'esame batteriologico.

Al contrario nel gruppo vaccinato, all'unico riscontro di lesione macroscopica (peritonite) è corrisposto un esame batteriologico negativo.

I risultati degli esami batteriologici per la ricerca di *Salmonella* spp. hanno permesso di evidenziare l'efficacia della vaccinazione con BIO-VAC SGP695 nel ridurre la colonizzazione a livello di organi viscerali a diversi intervalli dopo il *challenge* (4, 7 e 11 gg.p.i.).

Tale riduzione è risultata statisticamente significativa già a partire da 7 gg.p.i. per l'ovario ed 11 gg.p.i. per milza e fegato.

La vaccinazione si è dimostrata efficace soprattutto nella capacità di portare alla completa negativizzazione degli ovari degli animali vaccinati (0/8) rispetto ai controlli (7/9) esaminati a 11 gg.p.i.

Il risultato assume ancor più rilievo considerando che l'infezione è stata effettuata con un titolo ($1,3 \times 10^9$ UFC) molto più elevato di quello di analoghi studi (3, 4, 6, 7) e di gran lunga superiore a quello che si può verificare in condizioni di campo.

La riduzione della colonizzazione di organi interni e ovario è assolutamente comparabile, se non maggiore, di quella ottenuta da altri Autori con vaccini vivi attenuati omologhi *S. Enteritidis* (6).

CONCLUSIONI

Lo studio è in grado di dimostrare che il vaccino BIO-VAC SGP695, in somministrazione singola e al dosaggio minimo previsto, conferisce una buona protezione crociata dall'infezione sperimentale ad alto titolo infettante con *S. Enteritidis*.

La colonizzazione degli organi da parte di *S. Enteritidis* nelle galline vaccinate si è dimostrata significativamente ridotta nei tempi.

È soprattutto da sottolineare il risultato relativo alla protezione conferita all'ovario vista l'importanza che quest'organo riveste nel passaggio dell'infezione da gallina a uovo/pulcino (trasmissione verticale) e nel caso della gallina da uova da consumo per il rischio di trasmissione all'uomo per via alimentare.

BIBLIOGRAFIA

1. Legretto M., Circella E., Caroli A., Pugliese N., Meliota F., Lozito P., Camarda A. "Innocuità ed efficacia protettiva del ceppo attenuato *Salmonella gallinarum* SGP695AV nel pollo" Atti 51° Convegno Annuale SIPA Salsomaggiore Terme (PR) 11-12 ottobre 2012 – pp. 298-308
2. Gantois I, Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Gast R., Humphrey T.J. & Van Immerseel F. (2009) Mechanism of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiol Rev 33 718-738
3. Barrow P.A., Lovell M.A. Berchieri A. (1990). Immunization of laying hens against *Salmonella enteritidis* with live attenuated vaccines. Vet Rec. 126, 241-242
4. Barrow P.A., Lovell M.A. Berchieri A. (1991). The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4. Avian Pathology, 20 681-692

5. Chacana P.A. and Terzolo H.R. (2006) Protection Conferred by a Live *Salmonella* Enteritidis Vaccine Against Fowl Typhoid in Laying Hens. *Avian Disease* 50 (2): 280-283
6. Gantois I, Ducatelle R. Timbermont L., Boyen F., Bohez L. Haesebrouck F., Pasmans F., van Immerseel F. (2006) Oral immunization of laying hens with the live vaccine strains of TAD salmonella vac® E and TAD Salmonella vac® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 24 6250-6255
7. Nassar T.J., Al-Nakhli H.M. and Al-Ogaily Z.H (1994) Use of live and inactivated *Salmonella* enteritidis phage type 4 vaccine to immunize laying hens against experimental infections. *Rev.sci.tech. Off. Inte. Epiz.*, 13 (3) 855-867
8. Kramer TT. (1998). Effects of heterophil adaptation on *Salmonella enteritidis* fecal shedding and egg contamination. *Avian Dis.*, 42:6-13.
9. Kramer TT., Hirl M. (2001) Loss of virulence by heterophil-adapted *Salmonella pullorum*. *Avian Dis.*, 45:453-455.