

APPLICAZIONE DI MODELLI DI VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI MONOGLICERIDI DEGLI ACIDI GRASSI A CORTA E MEDIA CATENA NEI CONFRONTI DI *SALMONELLA* SPP.

Bilato D.*, Tosi G.*, Parini M.§, Paoli A.§, Fiorentini L.*, Cantini F.§, Massi P.*, Amadori M.*.

* *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Italia*
§ *Silo S.p.A., Firenze, Italia*

Summary

Antibiotic resistance and, in particular, the generation of multidrug resistant bacteria among zoonotic agents highlights the importance to develop research on new disease control strategies on farm. In this scenario, organic acid monoglycerides proved to be valid products in terms of antibacterial potency, cost-benefit profile and absence of withdrawal periods. In order to define reliable parameters of efficacy, an integrated potency score of such monoglycerides was developed *in vitro* in *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* (SE) and *S. typhimurium* (ST) models, based on inhibition of bacterial growth in medium, inhibition of intracellular invasion in Porcine Jejunal Epithelial Cells (IPEC-J2), and a killing test evaluated by flow cytometry. The above tests enabled us to detect significant differences in the activity of some monoglycerides. Results indicate that our panel of tests can be the foundation of a potency score system. This could be adopted to select proper monoglycerides for field trials in the target species. Further studies *in vivo* are necessary to confirm the predictive data *in vitro*. Moreover, the impact of monoglycerides on the innate and adaptive immune system and the development of assays on cell lines of poultry origin for pro-inflammatory cytokines should be further investigated.

INTRODUZIONE

Lo sviluppo dell'antibiotico resistenza, ed in particolare di multi-resistenze di batteri zoonosici, ha evidenziato l'importanza di sviluppare nuove strategie di controllo delle infezioni microbiche. Tali strategie sono state discusse all'OIE/IABS international conference on "Alternatives to antibiotics" (OIE/IABS, 2012) e al 3rd International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals (BASTIANSEE, 2014). Nell'ambito di queste varie strategie, gli acidi organici a corta e media catena hanno dimostrato sia *in vivo* che *in vitro* attività antimicrobica verso diversi agenti microbici, in particolare l'acido butirrico e caprilico (Kabara *et al.*, 1972; Hilmarsson *et al.*, 2006; Thormar *et al.*, 2007). Diversi vantaggi, come l'aumento delle *performance*, miglioramento della qualità delle carcasse, diminuzione della colonizzazione intestinale, ed effetti trofici sulla mucosa intestinale sono stati riportati (Leeson *et al.*, 2005). Inoltre, effetti secondari sul sistema immunitario hanno evidenziato una *down regulation* dell'espressione dei geni implicati nella invasione intestinale, in particolare della SPI-1 di *Salmonella* spp. (Gantois *et al.*, 2006) e sulla espressione di citochine pro-infiammatorie (Zhang

et al., 2011). L'obiettivo del presente lavoro è stata la valutazione di uno *score* di potenza *in vitro* di questi prodotti nei confronti di ceppi di SE e ST aviari, mediante un sistema integrato basato sulla inibizione della crescita batterica, sulla determinazione dell'invasione di cellule IPEC-J2 e test di *killing* batterico valutato mediante citofluorimetria a flusso.

MATERIALI E METODI

Identificazione dei monogliceridi

Sono stati utilizzati 6 monogliceridi di acidi organici identificati come M1, M2, M3, M4, M5, M6, di proprietà brevettuale di SILO S.p.A.

Ceppi batterici

Sono stati utilizzati 4 ceppi di SE, 4 di ST, di cui 3 di variante monofasica. I ceppi sono stati coltivati in terreno Luria-Bertani (LB) in fase stazionaria e incubati a + 37°C per 18 h. Prima dell'utilizzo, le sospensioni venivano misurate a 600 nm con Biochrom Biowave Cell Density Meter WPA CO8000 al fine di allestire le diluizioni per i relativi test secondo una curva standard.

Turbidimetria

I monogliceridi sono stati allestiti in LB in diluizioni seriali. I ceppi di Salmonella diluiti 1:500 sono stati inoculati in 6 mL di LB con differenti concentrazioni di monogliceride per 18 h a + 37°C in fase stazionaria. La relativa concentrazione batterica ed *end point* finale di attività dei monogliceridi sono state calcolate a 600 nm attraverso una curva standard.

Cellule IPEC-J2 e invasione batterica

Per la prova di invasione cellulare sono state utilizzate cellule IPEC-J2 (IZSLER Cell Bank code BS CL 205), mantenute in 1:1 DMEM/F12 con il 10% di siero fetale bovino e senza l'aggiunta di antibiotici. Sono state utilizzate piastre da 12 pozzetti, incubate a 37°C con 5% CO₂ per 24 h ai fini di ottenere un monostrato confluento con approssimativamente 5x10⁵ cellule/pozzetto. La sospensione batterica è stata centrifugata e risospesa in DMEM/F12 senza antibiotici. In seguito è stata diluita ad una densità di 1x10⁸ cfu/mL con e senza monogliceridi per 1 h a RT, previo allestimento degli stessi in DMEM/F12. Brevemente, il monostrato confluento di IPEC-J2 è stato incubato con 1 ml di sospensione batterica di controllo e di sospensione batterica/monogliceridi per 1 h a + 37 °C con 5% CO₂. In seguito, tale monostrato è stato incubato per 2 h a 37°C con 1 mL of 300 g/mL di colistina per eliminare i batteri extracellulari e successivamente lisato in Triton X-100 in PBS. Il lisato è stato diluito serialmente in PBS fino a 10⁻⁵. 100 µl di ogni diluizione sono stati piastrati in Trypticase Soy Agar e incubati a 37 °C per 18-24 h. Il numero di batteri intracellulari è stato valutato mediante calcolo di media bilanciata.

Test di killing

I monogliceridi sono stati allestiti in NaCl allo 0,85%. A partire da una sospensione

overnight di *Salmonella* spp., i ceppi sono stati incubati a 37°C per 2 h con i monogliceridi. La vitalità batterica è stata determinata mediante citofluorimetria a flusso utilizzando opportune modifiche del kit Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability and Counting (L34856) Molecular Probes®, su 20000 eventi.

RISULTATI

I risultati hanno evidenziato nei diversi test differenze significative di attività tra monogliceridi, come riassunto in tabella 1.

Tabella 1. Monogliceride con attività più elevata nei diversi saggi

Turbidimetria				Invasività		
Ceppo	%	% inibizione	P	%	% inibizione	P
SE1	M4 0,1%	42,3	0,0078	M4 0,2%	100	0,0092
SE2	M4 0,1%	49,5		M4 0,2%	100	
SE3	M4 0,1%	25,7		M4 0,2%	100	
ST1	*M6 0,02%	*2,6	*0.4 0,0005	*M5 0,05%	*95,27	*<0,0001 0,0067
	M2 0,2%	32,8		M1 0,2%	61,03	
ST2	*M4 0,02%	*35,9		*M5 0,05%	*62,2	
	M2 0,2%	59,5		M2 0,2%	50,26	
ST3	*M6 0,02%	*15,3	*M5 0,05%	*99,85		
	M2 0,2%	50	M2 0,2%	99,6		
ST4	*M5 0,02%	*22,7	*M5 0,05%	*73,6		
	M2 0,2%	42,8	M2 0,2%	71,43		

I dati ottenuti nei saggi sopra descritti sono stati controllati per normalità e sottoposti ad analisi della varianza con procedura parametrica e *t-test*, mentre le percentuali di *killing* sono state analizzate con test chi-quadrato in tabella di contingenza 2X2, come riportato nella tabella 2.

Tabella 2. Test di *killing*

Ceppo - % Monogliceride	% Inibizione	P
SE1-M4 0,2%	34,2	<0,0001
SE2-M4 0,2%	12	<0,0001
SE3-M4 0,2%	13,3	<0,0001
SE4-M4 0,2%	18,2	<0,0001
ST1-M6 0,05%	11,1	<0,0001
ST2-M6 0,05%	26,7	<0,0001
ST3-M6 0,05%	4,2	<0,0001
ST4-M6 0,05%	11,5	<0,0001

Tabella 3. *Score*

<i>Score</i>	Turbidimetria	Invasione	<i>Killing</i>
0	<1%	<1 %	< 1%
1	1-10%	1-25%	1-25%
2	10-20%	25-50%	25-50%
3	20-30%	50-75%	50-75%
4	>30	>75	>75

Sulla base dello *score* attribuito considerando una scala da 0 a 4, come descritto in tabella 3, per SE è stato evidenziato uno score di 8,5 per M4 rispetto a 5 per M1. Per ST è stata rilevata una maggiore attività di M2 (7,5) rispetto a M1 (5,75) e M3 (4,75) allo 0,2% ed una maggiore attività di M6 (6,75) rispetto a M5 (5,5) e M4 (4,75) alla concentrazione di 0,05%.

DISCUSSIONE

Lo sviluppo dell'antibiotico resistenza, ed in particolare di multiresistenze di batteri agenti di zoonosi, ha sottolineato l'importanza di un uso responsabile degli antibiotici negli animali a produzione zootecnica insieme alla necessità di sviluppare nuove e diverse strategie di controllo. Nell'ambito di tali strategie, i monogliceridi hanno dimostrato attività antibatterica verso ceppi di SE e ST, agendo in particolare sulla diminuzione dell'invasione cellulare. Inoltre, caratteristiche peculiari di questi prodotti quali un rapporto costo-beneficio favorevole, assenza di tempi di sospensione, palatabilità, e soprattutto la stabilità termica ed indipendenza dal pH, li rende biodisponibili in diversi ambienti come gozzo, stomaco, intestino e quindi utilizzabili su larga scala come supplemento del mangime o acqua di bevanda. Tali composti non rappresentano ovviamente una *panacea* ma dovrebbero essere opportunamente combinati nell'ambito di una corretta gestione aziendale e terapeutica insieme a strategie di prevenzione imperniata sulla biosicurezza e profilassi vaccinale.

CONCLUSIONI

I risultati dimostrano che i monogliceridi possono avere un effetto antibatterico, diverso in funzione dell'acido utilizzato e della dose d'impiego, e che il sistema di *score* in oggetto può permettere di selezionare i composti più idonei per prove di campo nelle specie di interesse. Sulla base del nostro *score*, alcuni monogliceridi si sono infatti rilevati più attivi di altri. Tale approccio di natura metodologica potrà essere applicato anche verso altri prodotti ad attività antibatterica. Prove *in vivo* saranno necessarie a confermare le prove eseguite *in vitro*, insieme alla valutazione approfondita dell'impatto sul sistema immunitario mediante ad esempio saggi di citochine infiammatorie. Inoltre, linee cellulari di enterociti di pollo saranno utili per meglio comprendere il meccanismo di azione di tali composti.

BIBLIOGRAFIA

1. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC and Van Immerseel F (2006). Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol.* 72(1): 946-949.
2. Hilmarsoon H, Thormar H, Thrainsson JH and Gunnarsson E (2006). Effect of Glycerol Monocaprate (Monocaprin) on Broiler Chickens: An Attempt at reducing Intestinal Campylobacter Infection *Poult Sci.* 85(4): 588-592.
3. Leeson S, Namkung H, Antongiovanni M and Lee EH. (2005). Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poult Sci.* 84(9): 1418-1422.
4. Thormar H, Hilmarsson H and Bergsson G. (2007). Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli*. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 91(7-8): 312-318.
5. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ and Truant JP (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2(1): 23-28.
6. Zhang WH, Jiang Y, Zhu QF, Gao F, Dai SF, Chen J and Zhou GH (2011). Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. *Br Poult Sci.* 52(3): 292-301.