

RICERCA CORRENTE 2002

IZSSA 005/02

**Prove di stabilità, innocuità ed efficacia di un
vaccino vivo attenuato nei confronti
dell'aborto ovino da *Salmonella abortusovis*.**

Responsabile scientifico del progetto:

Giuseppe Schianchi.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"

Via Duca degli Abruzzi, 8 – 07100 Sassari

Telefono 0792892288 Fax 079272189

Email giuseppe.schianchi@izs-sardegna.it

RELAZIONE FINALE

Introduzione

Nell'allevamento ovino l'aborto rappresenta uno dei fattori negativi che maggiormente incidono sull'economia dell'impresa, inficiando lo scopo stesso dell'attività, cioè la produzione di nuovi animali ed il loro conseguente sfruttamento ai fini produttivi.

Fra gli agenti abortigeni più comunemente diagnosticati nell'allevamento ovino, occupa una posizione di rilievo la *Salmonella abortusovis*. In Sardegna si calcola che le perdite dovute all'infezione da *Salmonella abortusovis* (tipica Salmonella con specificità d'ospite), possano essere quantificate in circa 5 milioni di Euro all'anno; non sono al momento disponibili analoghe segnalazioni per altre Regioni italiane nelle quali l'allevamento ovino è sviluppato.

Per quanto concerne alle possibili forme di contrasto alla diffusione del patogeno, è difficile, per le attuali condizioni in cui versa l'allevamento ovino, riuscire a mettere a punto e a far osservare norme di profilassi diretta in grado di contrastare lo sviluppo della malattia; allo stesso tempo, l'uso di vaccini stabulogeni non è in grado di prevenire nei giusti tempi la malattia, considerato che, per la normativa in vigore, il vaccino stabulogeno andrebbe utilizzato quando la malattia è presente in allevamento, e quindi l'infezione è già in atto.

A parte i vaccini stabulogeni, gli immunizzanti tradizionali allestiti in Italia sono pochi e scarsamente efficaci, mentre quelli prodotti all'estero non sempre sono funzionali sia per la diversità genetica dei ceppi utilizzati e che degli animali inoculati.

A tutto ciò consegue che la messa a punto di un vaccino specifico, efficace nei confronti dell'aborto da *Salmonella abortusovis* è una necessità sanitaria impellente per l'allevamento ovino nazionale.

Lavori preliminari compiuti in questa direzione sono stati condotti nel corso di una precedente ricerca corrente (IZS SA 003/98).

Utilizzando diversi sistemi bio-molecolari si è riusciti ad ottenere ceppi di *Salmonella abortusovis* con attenuazioni stabili nei geni di virulenza, attenuazioni legate alla presenza del plasmide di virulenza (*pla-*) o a sistemi di regolazione che coinvolgono diverse funzioni cellulari (*crp*; *aroA*).

Al momento di iniziare questa ricerca non possedevamo dati sulla capacità dei nuovi ceppi di continuare a mantenere le caratteristiche di attenuazione una volta inoculati negli animali di elezione e, analogamente, non avevamo riscontri sulla capacità dei ceppi di suscitare una risposta immunitaria, anticorpale o cellulo-mediata, in grado di assicurare una protezione nei confronti dell'infezione.

Il presente progetto si prefiggeva come primo obiettivo quello di sperimentare l'efficacia dei ceppi attenuati come possibili vaccini.

Si intendeva quindi investigare, in considerazione delle scarse conoscenze sugli specifici meccanismi dell'aborto negli ovini, sulla definizione in termini di citochine e risposta linfocitaria, nel rapporto tra infezione da *Salmonella abortusovis* e gravidanza; altrettante importanti informazioni si volevano ottenere sul ruolo degli antigeni immuno-dominanti nelle risposte naturali od indotte da vaccino.

In generale, al momento della stesura del progetto, non si conosceva l'effetto della somministrazione di ceppi di *Salmonella abortusovis* a virulenza attenuata in animali sensibili (specie di destinazione) ed in particolare durante la gravidanza. Delle tre Unità Operative coinvolte nel progetto, ciascuna ha svolto una serie di specifici compiti assegnati, che verranno descritti di seguito.

Obiettivo perseguito nell'ambito del progetto dall'U.O.: 1

Gli obiettivi di questa Unità possono essere riassunti in 5 punti:

1. Testare *in vivo* e *in vitro* la stabilità dei mutanti avirulenti di *Salmonella abortusovis*;
2. Verificare la possibilità di eliminazione dei ceppi avirulenti nell'ambiente od in altri animali;
3. Sviluppare uno specifico protocollo di vaccinazione e mettere a punto un sistema di aborto sperimentale utilizzando il ceppo selvaggio *SS44*;
4. Eseguire una prova sperimentale, su pecore appositamente selezionate, per valutare l'efficacia del vaccino contro la *Salmonella abortusovis*. I principali indici di valutazione utilizzati saranno basati sul confronto percentuale di aborti tra il campione saggiato ed il campione di controllo, nonché sul raffronto dei titoli anticorpali delle pecore vaccinate e dei controlli;
5. Monitoraggio delle pecore vaccinate nel tempo, per verificare l'escrezione dei ceppi mediante periodici tamponi vaginali e rettali, e monitoraggio di parametri fisiologici e clinici.

***1. Testare in vivo e in vitro la stabilità dei mutanti avirulenti di
Salmonella abortusovis***

I mutanti avirulenti candidati per essere utilizzati come ceppi vaccinali, ottenuti con una precedente ricerca (IZSSA003/98) sono stati coltivati in terreni sintetici (LB broth, DIFCO) per tre successivi passaggi, e poi sottoposti ad identificazione fenotipica mediante test biochimici (API 20 E, BioMerieux, France) e a fingerprinting con la sonda IS200, per verificare se la coltura, nelle condizioni normalmente utilizzate per ottenere la quantità sufficiente di cellule batteriche per la dose vaccinale, potesse alterare la struttura genomica dei mutanti, o far riacquistare caratteristiche fenotipiche perse durante la mutazione.

Tutti i 4 ceppi utilizzati hanno mostrato le identiche caratteristiche iniziali.

La stessa procedura è stata eseguita su topini Balb/c dopo l'inoculazione *per os* e successivo re-isolamento dalla milza.

Nessuno dei ceppi mutanti utilizzati ha mostrato variazioni nelle caratteristiche fenotipiche e genotipiche.

2. Verifica della possibilità di eliminazione dei ceppi nell'ambiente od in altri animali

TOPI: Sono state eseguite coprocolture giornaliere nei topi Balb/c inoculati *per os* con i mutanti di *Salmonella abortusovis*, seguendo le normali procedure batteriologiche. Da nessuna coprocoltura è stato possibile isolare ceppi di Salmonella.

I risultati sono riportati nella tabella 2 di UZZAU ET AL., INFECTION AND IMMUNITY, July 2005, p. 4302–4308, in allegato.

PECORE: Le pecore inoculate per la prova sperimentale sono state monitorate con tamponi rettali e vaginali per 12 giorni consecutivi all'inoculazione dei mutanti, con esiti costantemente negativi.

Inoltre, nessuna delle pecore inoculate con i mutanti avirulenti ha manifestato aborto fino all'inoculazione del ceppo virulento, a dimostrazione che i mutanti non vengono eliminati e nel contempo sono sicuramente avirulenti.

I risultati sono riportati nella tabella 3 del lavoro precedentemente citato e allegato.

3. Sviluppo di un protocollo di vaccinazione e messa a punto di un sistema di aborto sperimentale utilizzando il ceppo selvaggio SS44

Nella pratica quotidiana, utilizzando i vaccini stabulogeni spenti, lo schema di vaccinazione tende a far produrre anticorpi circolanti che possano proteggere i 5 mesi di gravidanza della pecora.

Purtroppo la durata degli anticorpi prodotti dopo inoculazione con questi vaccini non sempre è sufficiente a garantire questo risultato.

Le cause possono essere molteplici e sono probabilmente dovute: o alla scarsa risposta della pecora alla stimolazione vaccinale, o all'insufficiente stimolazione da parte del vaccino spento, oppure ad una combinazione di questi fattori.

Inoltre, la titolazione degli anticorpi circolanti a seguito di queste vaccinazioni, non conferisce garanzie adeguate sulla protezione nei confronti dell'aborto.

Per questo motivo i protocolli vaccinali con lo stabulogeno consigliano una triplice inoculazione, con una prima stimolazione a ridosso dell'accoppiamento, un primo richiamo all'incirca 30 giorni dopo e un secondo richiamo a circa 2/3 di gravidanza.

Per stabilire il protocollo di vaccinazione da adottare, ci siamo rifatti a quanto schematicamente viene utilizzato con i vaccini spenti, e cioè una prima inoculazione nel periodo pre-estrale (nel nostro caso durante la

sincronizzazione, con le pecore sotto trattamento progestinico), quindi una seconda inoculazione (booster) entro il primo mese dal giorno dell'accoppiamento.

Trattandosi di vaccini che utilizzano ceppi vivi ci si aspettava che queste due inoculazioni fossero più che sufficienti a determinare una risposta immunitaria che garantisse la protezione nei confronti dell'aborto.

Per verificare l'effettiva protezione conferita dai mutanti avirulenti, abbiamo proceduto a provocare l'aborto con l'inoculazione di un ceppo virulento di *Salmonella abortusovis* sia nelle pecore vaccinate che nei controlli non vaccinati, a circa 100 giorni di gravidanza.

Precedenti lavori eseguiti da ricercatori francesi, indicavano proprio in questo stadio di gestazione, il periodo più congeniale per provocare l'aborto con l'infezione sperimentale.

4. Prova sperimentale su pecore selezionate per valutare l'efficacia del vaccino ottenuto con i metodi descritti contro la *S. abortusovis*.

Un gruppo di 36 pecore di razza Sarda, adulte, pluripare, con età compresa fra 34 e 46 mesi, in buono stato di nutrizione (valutato tramite BCS), prive di segni clinici riferibili a patologie in atto, preventivamente trattate contro infestazioni parassitarie, sono state selezionate per la prova.

Preliminarmente si testavano i capi utilizzando un metodo OMP-ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-*Salmonella abortusovis* negli ovini come riportato in: Spaziani A. et altri, dal titolo "Allestimento di un metodo OMP-ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-*Salmonella abortusovis* negli ovini" pubblicato negli Atti del VI Congresso Nazionale S.I.Di.LV. del 2004 che si allega.

Tutti gli animali selezionati risultavano negativi allo screening anticorpale.

Le pecore venivano quindi sincronizzate in asciutta per l'induzione dell'estro, mediante introduzione per via vaginale di spugne imbevute di 40 mg di fluorogestone acetato (Intervet).

Le spugne venivano rimosse dopo 12 giorni, e si completava la sincronizzazione stimolandole con una iniezione intra-muscolo di PMSG (Intervet) alla dose di 300 UI capo.

A questo punto gli animali venivano messi a contatto con arieti adulti di comprovata fecondità per la fertilizzazione.

Per monitorare i salti si provvedeva a munire di tamponi colorati l'area sternale degli arieti, che quindi "marcavano" la groppa delle pecore recettive. Per ulteriore conferma dell'avvenuta fecondazione, a circa 3 settimane dall'accoppiamento, si provvedeva a confermare la gravidanza con esame ecografico.

Le pecore selezionate che confermavano la gravidanza a seguito del primo estro (32 animali) venivano divise in 4 gruppi di 8 animali ciascuno. I primi tre gruppi siglati con le lettere A-B-C venivano vaccinati con i tre ceppi mutanti alla dose di 1×10^9 ufc/ml, mentre il terzo gruppo siglato con la lettera D veniva vaccinato con placebo (sol.fis.) seguendo i criteri sopra esposti.

Ogni gruppo veniva tenuto in un box separato per evitare eventuali contaminazioni e per una maggiore facilità di controllo.

Al 110° giorno di gravidanza le pecore venivano infettate con una dose di 1×10^9 ufc/ml di un ceppo selvaggio e virulento (SS44) di *Salmonella abortusovis*.

Prima dell'inoculazione con il ceppo virulento gli animali venivano confinati all'interno di stabulari conformi al DLgs 116 del 27 gennaio 92 in modo da ridurre al minimo il rischio di diffusione del patogeno.

I risultati sono riportati nella tabella n°3 e 4 di : UZZAU ET AL.,

INFECTION AND IMMUNITY, July 2005, p. 4302–4308, in allegato.

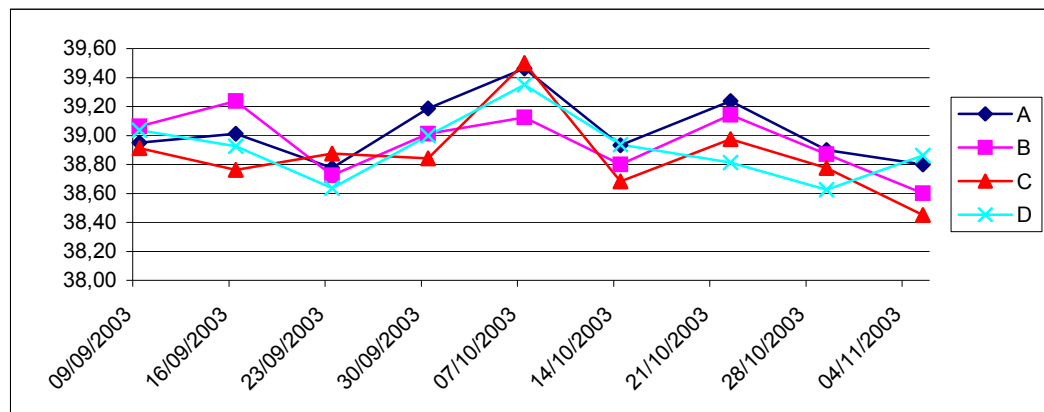
5. Monitoraggio delle pecore vaccinate nel tempo per verificare l'escrezione dei ceppi mediante periodici tamponi vaginali e rettali, e monitoraggio di parametri fisiologici e clinici.

Tutte le pecore utilizzate nella prova venivano alimentate *ad libitum* con un mangime pellettato completo (Unipellet – Martini).

Gli animali venivano monitorati 2 volte al giorno con un esame clinico completo, comprensivo di rilievo giornaliero della temperatura rettale.

Nel grafico sottostante si ha il quadro dell'andamento delle temperature per tutta la durata del monitoraggio.

Grafico 1:



Curva delle temperature rettali rilevate durante l'esperimento.

Nessuno degli animali presentava segni clinici in conseguenza delle inoculazioni vaccinali.

A seguito dell'inoculazione del ceppo selvaggio per l'induzione dell'aborto, diversi soggetti abortivano nei tempi meglio precisati nella pubblicazione: UZZAU ET AL., INFECTION AND IMMUNITY, July 2005, p. 4302–4308, in allegato, peraltro senza mostrare segni evidenti di debilitazione generale, al contrario mostrando lochiazioni vaginali maleodoranti per diversi giorni dopo l'aborto.

Durante i mesi della prova alcuni dei soggetti venivano a morte per cause accidentali comunque indipendenti dalle pratiche eseguite per la sperimentazione.

Obiettivo perseguito nell'ambito del progetto dall'U.O.:2

Gli obiettivi perseguiti da questa Unità vengono riassunti nei seguenti punti:

- 1) Identificare i ceppi vaccinali e selvaggi isolati dagli animali inoculati o nell'ambiente mediante il metodo di fingerprinting con il trasposone IS200;
- 2) Verificare la possibilità della restaurazione della virulenza. Allo scopo, i ceppi isolati dagli animali verranno utilizzati inoculandoli in topi Balb/c per verificare la persistenza della loro a virulenza. L'andamento dell'infezione nei topi Balb/c sarà stabilito sulla base dei risultati degli esami clinici, sulla conta delle UFC negli organi interni e dall'esito dell'esame istologico degli organi 7giorni dopo l'infezione;
- 3) Verifiche sui ceppi: i ceppi privi del plasmide saranno sottoposti a PCR per verificare la presenza dei geni *spv* caratteristici del plasmide di virulenza e quindi per escludere una ricomplementazione del plasmide. I ceppi *crp* e *AroA* saranno saggiati per le caratteristiche fisiologiche della regolazione di funzioni quali tempo di

duplicazione, motilità, fermentazione degli zuccheri ed altri test;

- 4) Determinazione dei profili delle citochine espresse da pecore sane e le loro eventuali modificazioni durante gravidanza e nelle fasi della vaccinazione con mutanti a virulenti;
- 5) Messa a punto di un test Elisa per verificare la risposta anticorpale degli animali verso i tre mutanti utilizzati negli esperimenti di vaccinazione.

Identificazione dei ceppi vaccinali e selvaggi isolati dagli animali inoculati o nell'ambiente mediante il metodo di fingerprinting con il trasposone IS200.

Per poter identificare i ceppi vaccinali dai ceppi selvaggi è stata fatta un'analisi dei profili IS200 dei ceppi selvaggi di *Salmonella abortusovis* circolanti in Sardegna, utilizzando le metodiche descritte in un nostro precedente lavoro: SCHIAFFINO A., BEUZÒN C.R., UZZAU S., LEORI G., CAPPUCINELLI P., CASADESUS J., & RUBINO S. (1996) Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*. J.Appl. and Env.Microbiol. **62**,(7), pp 2375-2380.

Dagli studi sono emersi tre patterns differenti.

Il pattern A possiede 4 bande sovrapponibili a quelle di *Salmonella abortusovis* SS44 usata per generare il ceppo vaccinale *crp* ed *AroA*, con un peso di 16547 bp, 7976 bp, 5245 bp e una da 3234bp.

Il profilo B, che consta di 4 bande di peso molecolare differente: 16547 bp, 7975 bp, una di circa 6000bp e una di 5245bp.

Il profilo C mostra solo tre bande che vanno dai 16547bp, a 7975 bp e la più piccola di 5244,98 bp.

Il ceppo mutante *crp* ha invece una banda in più dovuta al fatto che la mutazione ha ecciso un pezzo di DNA contenente l'inserzione IS200.

Questo comporta che sia facilmente identificabile il ceppo vaccinale *crp* dai selvaggi che circolano in Sardegna.

Con questa metodica invece non è stato possibile distinguere il ceppo *Aro* da quelli selvaggi.

Verifica della possibilità della restaurazione della virulenza

Topi Balb/c sono stati inoculati *per os* ed in peritoneo con i ceppi modificati per verificare la persistenza o la restaurazione della loro virulenza *in vivo*

L'andamento dell'infezione nei topi Balb/c è stata stabilita sulla base dei risultati degli esami clinici, sulla conta delle UFC negli organi interni e dall'esito dell'esame istologico degli organi 7giorni dopo l'infezione. I risultati sono riportati nella Tab. 2 del lavoro allegato.

Sicurezza di ceppi ricombinanti in pecore gravide.

Per valutare la possibilità di interruzione di gravidanza in seguito ad infezione con tre ceppi vaccinali, sono stati utilizzati gruppi di 5 pecore gravide (vedi la sezione Materiali e Metodi) che sono state inoculate s.c. a 90-110 giorni di gravidanza. Dopo somministrazione sottocutanea dei ceppi vaccinali vivi (gruppi A, B e C) o del ceppo selvatico (gruppo D), le pecore infette hanno mostrato una reazione infiammatoria cutanea che è persistita per 1-2 settimane, con un aumento del gonfiore della pelle nel sito di iniezione; l'infiammazione risultava più intensa in tutti gli animali inoculati col ceppo curato dal plasmide (SU40), per

evolversi infine in un ascesso. Durante l'esperimento, il comportamento degli animali era normale, senza indebolimento, diminuzione dell'appetito o minore consistenza delle feci.

Come mostrato nella Tabella 3, i ceppi SU304 (gruppo A), SU40 (gruppo B) ed SSM189 (gruppo C) del serovar Abortusovis non hanno causato aborto. Una pecora del gruppo A ed una del gruppo C hanno partorito ognuna una agnello morto sviluppato normalmente. Per mezzo di analisi batteriologiche, è stato accertato che tali agnelli non hanno mostrato alcun segno dell'infezione del serovar Abortusovis. Una delle due pecore del gruppo D che non ha abortito ha dato alla luce un agnello sano, mentre l'altra ha partorito un agnello morto senza segni di infezione. In tutte le pecore che hanno abortito è stato recuperato il serovar Abortusovis dal tratto riproduttivo (fino a quattro settimane dopo) e gli stessi feti erano infetti. Presi insieme, questi dati suggeriscono che i tre ceppi vaccinali testati sono altamente attenuati nell'ospite naturale del serovar Abortusovis.

Protezione contro l'aborto indotta nella pecora da ceppi ricombinanti del serovar Abortusovis.

Dato che i tre vaccini candidati non hanno mostrato virulenza nel topo e nella pecora, abbiamo testato la loro capacità di indurre nelle pecore gravide un'effettiva protezione contro l'infezione col ceppo selvatico

del serovar Abortusovis. Quindi, sono stati immunizzati s.c. tre gruppi di 13 pecore ciascuno con i ceppi vaccinali SU304 (gruppo A), SU40 (gruppo B) o SSM189 (gruppo D), a tre settimane di gravidanza; un quarto gruppo di 16 pecore non è stato immunizzato (gruppo D). Come osservato nell'esperimento precedente, tutti gli animali hanno presentato una reazione infiammatoria leggera e persistente nel sito di inoculo, inclusi quegli animali vaccinati col ceppo SU40 curato dal plasmide, nei quali è stato osservato lo sviluppo di un ascesso. Tre settimane dopo la prima immunizzazione, agli animali è stata somministrata la seconda dose del vaccino. Gli animali sono rimasti vivaci, hanno prodotto feci normali ed hanno mantenuto il loro appetito per l'intera durata dell'esperimento. La gravidanza è stata confermata, per mezzo di un esame con gli ultrasuoni al trentesimo giorno dopo la prima immunizzazione, per 9 pecore del gruppo A, 13 del gruppo B, 6 del gruppo C e 14 del gruppo D. A 110 giorni di gravidanza, gli animali sono stati inoculati s.c. con 10^9 cfu del ceppo selvatico SS44. La temperatura rettale media delle pecore vaccinate non è aumentata in seguito all'esposizione al ceppo selvatico virulento del serovar Abortusovis, SS44 (Fig. 1). D'altra parte, le pecore non vaccinate (gruppo D) hanno mostrato una moderata, ma significativa, risposta febbrile durante la prima settimana dopo l'infezione con SS44 (Fig. 1).

L'evoluzione degli anticorpi IgG ed IgM anti-OPM è stata monitorata settimanalmente tramite ELISA indiretto. I sieri raccolti dalle pecore pre-immunizzate hanno dato, in media, una lettura dell'assorbanza a 450 nm di 0.188 ± 0.033 (IgG) e di 0.270 ± 0.077 . Il "cut-off" calcolato è stato di 0.254 (IgG) e 0.424 (IgM). Tutti gli animali immunizzati hanno risposto con una produzione significativa di anticorpi IgM anti-OPM dopo 7 giorni dalla prima somministrazione del vaccino (Fig. 2). Le IgM sono tornate sotto il valore "cut-off" 7 giorni dopo e non sono aumentate in seguito alla seconda dose del vaccino, con eccezione per i sieri del gruppo B che risultavano positivi fino ad un mese dopo la prima somministrazione del vaccino. Con l'infezione successiva col ceppo selvatico SS44, le IgM anti-OMP non sono aumentate negli animali del gruppo B ed i sieri degli animali del gruppo A risultavano positivi solo dopo 7 giorni dall'infezione. La produzione di IgM anti-OMP è aumentata significativamente negli animali non vaccinati del gruppo di controllo (D) e negli animali del gruppo C, rispettivamente fino a 17 e 32 giorni dopo l'infezione. I sieri delle pecore immunizzate dei gruppi A, B e C erano positivi alle IgG anti-OMP dal settimo giorno dopo la prima dose del vaccino, con un picco 3 settimane dopo la seconda dose del vaccino (Fig. 3). I sieri degli animali del gruppo C hanno fatto eccezione dando valori più bassi del "cut-off" al momento dell'infezione (70 giorni dopo la

seconda dose del vaccino). Come per i valori delle IgM anti-OMP, anche le IgG anti-OMP sono aumentate più drasticamente negli animali non immunizzati del gruppo D e negli animali vaccinati con crp-cya (gruppo C) rispetto agli animali dei gruppi A e B (Fig. 3).

Rispetto alle pecore dei gruppi A, B e C, per le pecore del gruppo D è stata osservata una minore capacità di far nascere agnelli (Tabella 4). Nel gruppo D, 8 pecore su 14 hanno abortito a breve termine ed una pecora ha partorito un agnello debole che è morto dopo tre giorni. Solo cinque pecore hanno dato agnelli sani (interruzione di gravidanza del 64%). I nostri dati suggeriscono che avvenga l'acquisizione di un certo grado di protezione contro l'infezione col ceppo selvatico virulento SS44 per gli animali immunizzati con SU304 (gruppo A) ed SSM189 (gruppo C), nei quali l'interruzione di gravidanza era rispettivamente del 44% e del 50%. Le pecore vaccinate con SU40 (gruppo B) hanno mostrato un'aumentata capacità di far nascere agnelli (interruzione di gravidanza del 23%), suggerendo che il serovar Abortusovis curato dal plasmide è capace di indurre un'efficace risposta immunitaria contro la salmonellosi ovina. Il ceppo del serovar Abortusovis SS44 è stato isolato dal cervello di ciascun feto abortito, dimostrando che il ceppo selvatico è stato la causa dell'aborto.

Caratterizzazione dei ceppi *crp* e *AroA* per le caratteristiche fisiologiche della regolazione di funzioni quali tempo di duplicazione, motilità, fermentazione degli zuccheri ed altri test.

L'adenosin monofosfato ciclico (cAMP) e il suo recettore (CRP) costituiscono un sistema di regolazione della repressione catabolica presente nella totalità dei batteri enterici inclusa *Salmonella* spp.

Tale sistema opera mediante un controllo positivo o negativo a livello trascrizionale su una grande varietà di geni che codificano per enzimi del metabolismo fermentativo, per fattori di motilità, di crescita e di patogenicità.

Nello studio è stato valutato il ruolo del cAMP-CRP nella determinazione di caratteri fenotipici sierotipo-specifici attraverso la mutagenizzazione del gene *crp* di *Salmonella abortusovis* utilizzato come vaccino.

Sono stati analizzati diversi caratteri biochimici, motilità in terreno semisolido, velocità di crescita *in vitro*, patogenicità in modello murino (topi BALB/c), e adesione/invasione in colture di cellule epiteliali (CHO, Hep2 e HeLa).

I risultati ottenuti hanno mostrato che in *S. abortusovis*, il sistema cAMP-CRP controlla la motilità batterica e la virulenza nel modello murino come in *S. typhimurium* mentre; al contrario, *S. abortusovis* si

comporta in maniera peculiare in quanto: (i) controlla negativamente alcuni caratteri biochimici (tra cui L-ARA e ODC); (ii) controlla positivamente la velocità di crescita con controllo integrato con almeno un altro sistema di regolazione presente nel plasmide di virulenza; (iii) induce la trascrizione di fattori di colonizzazione dell'epitelio intestinale differenti da quelli modulati dallo stesso sistema in *S. typhimurium*.

Nei ceppi di *S. abortusovis* mutati nel gene *AroA* si manifesta invece solo una ridotta velocità di crescita nei confronti del ceppo selvaggio, caratteristica che lo rende particolarmente esigente.

Messa a punto di un test Elisa per verificare la risposta anticorpale degli animali verso i tre mutanti utilizzati negli esperimenti di vaccinazione.

Le metodiche di microagglutinazione lenta attualmente in uso per la valutazione del titolo anticorpale anti-*Salmonella* in animali vaccinati o immunizzati per infezione naturale, non consente di discriminare tra risposta anticorpale IgM e IgG. In questo lavoro è stato necessario discriminare tra le due classi di anticorpi per poter valutare correttamente la risposta immune nei confronti dei vaccini nel corso di tutta la sperimentazione. Allo scopo di migliorare l'analisi della risposta anticorpale, è stato allestito un saggio ELISA indiretto, per l'identificazione di anticorpi rivolti contro le principali proteine della membrana esterna del batterio. Il metodo allestito ha consentito di valutare la sieroconversione di pecore gravide immunizzate con i vaccini attenuati sperimentali o inoculate con il ceppo selvaggio di *S. Abortusovis*.

Per tutta la durata della sperimentazione, settimanalmente, ed occasionalmente nei 7 mesi successivi, sono stati prelevati campioni di sangue per l'analisi dei titoli anticorpali specifici anti-*Salmonella*. Il sangue (3-5 ml) è stato sierizzato secondo i protocolli standard ed il siero è stato conservato a -80°C in aliquote di 500 μl per evitare frequenti scongelamenti. I titoli anticorpali sono stati saggiati in piastre

multiwells a 96 pozzetti (Maxisorp, Nunc), precedentemente adsorbite con antigene specifico costituito da una preparazione di proteine della membrana esterna di *S. Abortusovis*. L'antigene è stato preparato come frazione insolubile in SDS. In breve, un litro di coltura batterica (ceppo selvaggio SS44) è stato centrifugato per raccogliere i batteri (ca 10^{11} CFU) ed il pellet è stato lavato tre volte in soluzione salina tamponata (PBS) ghiacciata. I batteri sono stati lisati mediante sonicazione a temperatura controllata (ca 4°C) ad intervalli di 30 sec e pause di 60 sec per 6 volte. I batteri integri sono stati eliminati mediante centrifugazione a $2,000 \times g$ per 10 min. Il sopranatante è stato successivamente ultracentrifugato a $100.000 \times g$ per 30 min a 4°C . Il pellet, contenente la frazione sub-cellulare costituita prevalentemente dalla parte batterica, è stato finemente risospeso in 10 ml di PBS ghiacciato mediante passaggio ripetuto attraverso un ago 25 G. Sono stati poi aggiunti 10 ml di SDS al 2% in PBS e la sospensione è stata incubata per 30 min a temperatura ambiente, agitando leggermente. Infine, la sospensione è stata centrifugata a $100.000 \times g$ per 30 min a 4°C . Il pellet (una preparazione cruda di OMPs) è stato finemente risospeso in 3 ml di PBS. La resa della preparazione proteica è stata determinata col metodo di Bradford. La purezza di ciascuna preparazione di OMP è stata analizzata mediante corsa elettroforetica su

gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) e colorazione con Coomassie (Bio-Rad).

Ciascun pozzetto delle piastre multiwells è stato attivato con 0.5 µg di antigene specifico mediante incubazione a 4°C per 18 ore. I pozzetti sono stati lavati tre volte con Tween 20 allo 0.05% in PBS (PBS-Tween). Siti aspecifici di legame proteico sono stati “bloccati” mediante aggiunta di albumina bovina sierica all’1% in PBS per 2 ore a 37°C. I sieri sono stati diluiti 1:500 in PBS ed aggiunti ai pozzetti per 90 minuti a temperatura ambiente. Dopo avere proceduto a lavare i pozzetti, le IgG sieriche specifiche anti-OMP sono state misurate mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi anti-IgG di pecora coniugati con perossidasi (Kirkegaard & Perry Laboratories), diluiti 1:1,500 in PBS contenente BSA all’1%. Per misurare le IgM sieriche specifiche anti-OMP, è stata fatta un’incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi anti-IgM di pecora coniugati con perossidasi (Kirkegaard & Perry Laboratories), diluiti 1:500 in PBS contenente BSA all’1%. Dopo tre lavaggi in PBS, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto, per 30 minuti, 0.1 ml di una soluzione di 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina -dimetilsolfossido - 0.02% perossido di idrogeno. La piastra multiwell è stata letta mediante un lettore ELISA automatizzato (VersaMax, Molecular Devices) impostato ad una lunghezza d’onda di 450 nm. Il valore cut-off è stato calcolato

come la media \pm il doppio della deviazione standard degli OD registrati per i sieri pre-immuni.

I sieri raccolti dagli animali pre-immuni hanno dato una media di lettura a 450 nm di 0.188 \pm 0.033 OD (IgG) e di 0.270 \pm 0.077 (IgM). Il valore di cut-off è stato di 0.254 OD (IgG) e 0.424 OD (IgM). Tutti gli animali immunizzati hanno risposto con una significativa produzione di anticorpi IgM anti -OMP a partire da 7 giorni dalla prima immunizzazione (Fig. 1). Le IgM sono tornate a livelli al di sotto del valore cut-off tre settimane dopo la seconda immunizzazione. Negli animali inoculati con il ceppo selvaggio SS44 la produzione di IgM si è manifestata dalla settimana successiva all'inoculo per tornare a livelli inferiori al valore cut-off 24 giorni dopo. Per quanto concerne le IgG, titoli significativi sono stati osservati a partire da 7 giorni dopo l'inoculo e si sono mantenuti superiori al cut-off fino a circa sei mesi dall'inoculo con il ceppo selvaggio (Fig. 2). I titoli degli anticorpi IgG anti-OMP sono rimasti pressoché invariati negli animali vaccinati e con maggiore protezione al challenge (gruppo B) a seguito dell'infezione con il ceppo selvaggio SS44. Questo risultato era atteso essendo stati gli animali già immunizzati.

Figura 1

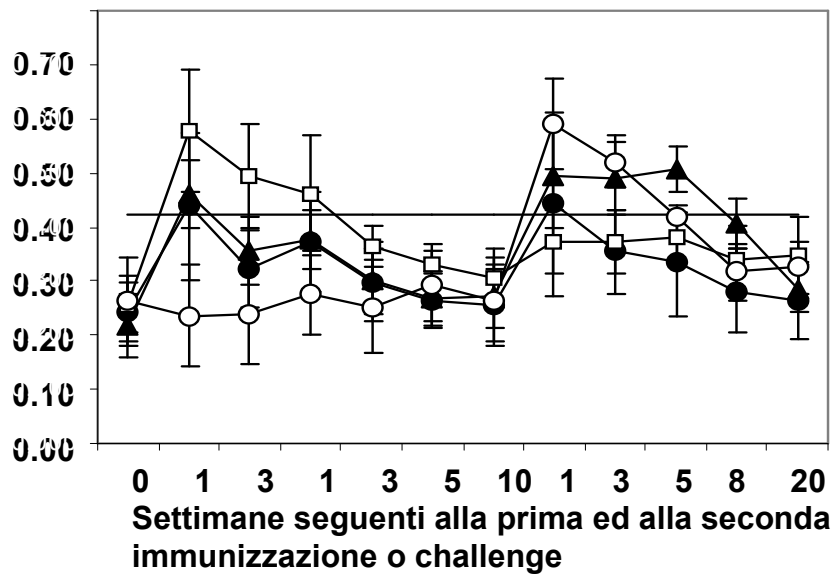
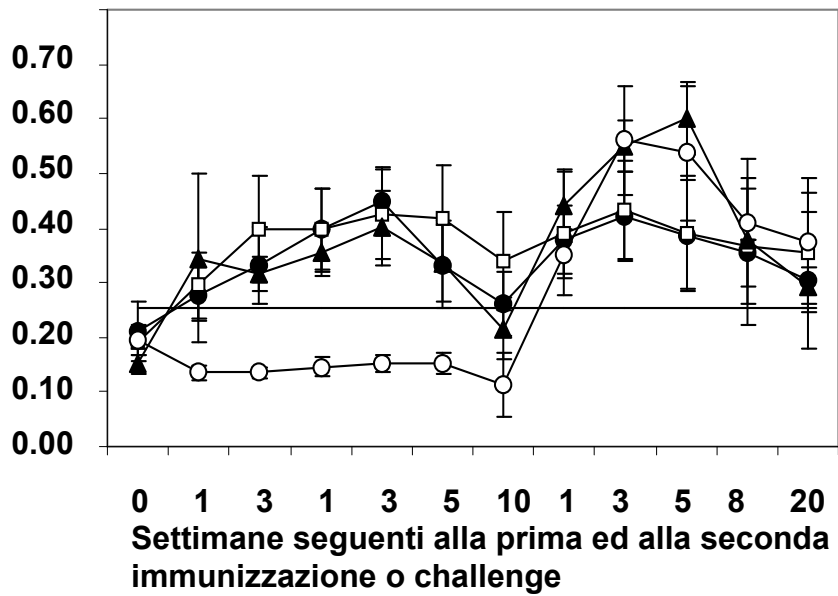


Figura 2



Obiettivo perseguito nell'ambito del progetto dall'U.O.: 3

Gli obiettivi perseguiti da questa Unità sono riassunti in 3 punti:

1. Produzione di coppie di oligonucleotidi (primers) idonei a studiare, mediante RT-PCR, gli mRNA delle principali citochine ovine.
2. Validazione dei primers delle principali citochine infiammatorie ed immunomodulatrici su linfociti di pecora stimolati
3. Messa a punto di una metodica per la valutazione delle citochine dal sangue di pecore in trial vaccinali mediante RT-PCR

U.O. Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Firenze
(Resp. Scientifico: Prof. Gianfranco Del Prete)

Premesse

La *Salmonella abortusovis* è un patogeno altamente specifico per la pecora, nella quale causa aborto tramite meccanismi non ancora chiariti. Le modalità di trasmissione della malattia non sono ancora completamente chiarite. Per quanto riguarda il contagio diretto tra animali adulti, esso sembra particolarmente frequente durante il periodo dell'estro e dei parti.

Attualmente, esistono evidenze che suggeriscono un ruolo importante dei linfociti T materni nello sviluppo della tolleranza immunologica nei confronti del feto. E' probabile che il mantenimento dell'unità feto-placentare dipenda fortemente dal tipo di citochine prodotte dai linfociti T che infiltrano la decidua durante la gravidanza ove realizzerebbero un milieu citochinico che antagonizza i naturali meccanismi di rigetto del feto, che a tutti gli effetti è analogo ad un trapianto parzialmente incompatibile. E' stato dimostrato che l'iniezione di citochine pro-infiammatorie di tipo Th1 (es. TNF- α , INF- γ ed IL-2) aumenta la frequenza di aborto in animali di laboratorio, mentre tale frequenza è ridotta in seguito a somministrazione di IL-4 e IL-10 (citochine di tipo Th2). Per converso, la somministrazione di anticorpi anti-INF- γ e/o pentoxifillina (un agente anti-INF) ha prodotto una sinergica riduzione dell'incidenza di aborto.

Numerosi studi di infezione sperimentale in modelli murini con *Salmonella* spp. e altri patogeni intracellulari come *Leishmania*, *Listeria*, *Micobacterium*, *Brucella* spp., hanno dimostrato un ruolo fondamentale delle citochine di tipo Th1 nella protezione da questi patogeni. La modificazione del rapporto Th1/Th2 nella produzione di citochine a livello sistemico e/o locale (linfociti infiltranti l'endometrio o la decidua in animali gravidi) sembra essere essenziale per il fisiologico mantenimento della gravidanza e la salute del feto, anche nella specie umana. Un analogo paradigma immunologico potrebbe essere presente anche negli ovini. Una risposta immunitaria caratterizzata da un incremento locale e/o circolante di citochine di tipo Th1 in seguito a infezione da *S. abortusovis* spiegherebbe l'alta percentuale di aborto fra le pecore, specie alla prima gravidanza. D'altra parte, la variazione del profilo delle citochine, in particolare a livello endometriale e/o placentare, potrebbe a sua volta incrementare la sensibilità dell'animale all'infezione.

Obiettivi della della ricerca

La dettagliata conoscenza delle modificazioni dei profili Th1/Th2 delle citochine circolanti e distrettuali (endometrio e placenta, in particolare) negli ovini, in seguito ad infezione con *S. abortusovis* e/o

gravidanza, appare di estrema importanza nella rivalutazione dell'intervento terapeutico e, soprattutto profilattico. In particolare, la messa a punto di un saggio per la misurazione delle citochine ovine, basato sull'uso tecniche di biologia molecolare e PCR, rappresenta un importante progresso nello studio dell'interazione tra microrganismo e ospite, sfruttabile anche per altre infezioni di interesse medico sia veterinario che umano.

Il progetto prevede un protocollo di immunizzazione di pecore con quattro immunogeni: A) con il ceppo mutante attenuato SSM1835 (alias SU304, *aroA*), B) con il ceppo attenuato SSM883 (alias SU40, privo di plasmide), C) con il mutante attenuato SSM189 (*crp-cya*) e D) con il ceppo "wild type" parentale SS44 per il challenge. Il protocollo prevede due inoculi a distanza di tre settimane, al rispettivamente al 20° ed al 40° giorno di gravidanza, e challenge con il ceppo wild type al 110° giorno di gravidanza.

Risultati

Scopi della U.O. di Firenze erano: 1) valutare l'immunogenicità degli immunogeni determinando il livello di risposta proliferativa in vitro dei linfociti T degli animali immunizzati in risposta ai lisati dei tre ceppi vaccinali a confronto con il lisato del patogeno wild type; 2) contribuire alla realizzazione di un metodo di monitoraggio

dell'espressione di un pannello di citochine in risposta ai diversi vaccini.

1. Effetti dell'immunizzazione sulla risposta cellulo-mediata.

Poiché era molto improbabile che l'immunizzazione inducesse modificazioni significative della risposta immune globale, sono state studiate le modificazioni indotte dai **vari ceppi di Salmonelle attenuate** usate come vaccino sulla **risposta linfocitaria T specifica**, arricchendo la quota di linfociti T Salmonella-specifici dal sangue periferico di pecore vaccinate.

1.1. Preparazione degli antigeni di Salmonelle attenuate (Sat) e wt (Swt).

L'U.O. diretta dal Prof. Rubino ha preliminarmente provveduto a realizzare colture massive di ciascuno dei ceppi Sat usati per l'immunizzazione, nonché coltura della Salmonella wt usata per l'infezione. I batteri sono stati centrifugati ed i vari pellets dopo sonicatura sono stati risospesi in acqua distillata e posti a dializzare a freddo contro acqua distillata con cambi ripetuti ogni 12 ore. Alla fine del procedimento ciascun lisato acquoso è stato sterilizzato per filtrazione con Millipore 0.25 nm e ne è stata valutata la concentrazione

proteica. Le quattro preparazioni di lisato acquoso contenevano rispettivamente:

- A) ceppo mutante attenuato SSM1835 (alias SU304, *aroA*): 2,0 mg/ml (5 ml in totale),
- B) ceppo attenuato SSM883 (alias SU40, privo di plasmide): 1,86 mg/ml (5 ml in totale),
- C) mutante attenuato SSM189 (*crp-cya*): 1,34 mg/ml (5 ml in totale),
- D) ceppo “wild type” parentale SS44: 1,55 mg/ml (5 ml in totale).

1.2. Test di tossicità o mitogenicità aspecifiche dei lisati antigenici di Sat e Swt.

Preliminarmente ai test di stimolazione in vitro con i quattro lisati acquosi delle tre Sat e di Swt, è stata valuta la possibile tossicità o mitogenicità aspecifica delle quattro preparazioni antigeniche allestendo colture di linfociti T umani stimolati per 3 giorni in vitro con dosi subottimali di fitoemoagglutinina (PHA) ed aggiungendo in curva di dose (da 100 a 1 µg/ml) i quattro lisati batterici.

Nessuno dei lisati ha indotto un'inibizione superiore al 10% della media degli indici proliferativi delle diverse colture di linfociti T umani, escludendo così la presenza nei lisati batterici di agenti “tossici” o più semplicemente inibitori aspecifici della proliferazione linfocitaria T.

Parimenti, il mancato aumento degli indici proliferativi in presenza dei lisati batterici a confronto con i controlli ha permesso di escludere la presenza nei lisati batterici di agenti mitogeni aspecifici o di superantigeni che avrebbero reso difficile l'interpretazione dei dati nelle colture allestite con linfociti di pecora.

1.3. Verifica dell'efficienza degli antigeni di Sat ed Swt.

A 4-5 settimane dall'ultimo boost vaccinale (ma prima del challenge), quando il pool di linfociti T specifici dovrebbe essere al massimo della sua espansione (circa 1:1000 nel sangue periferico), sono stati fatti prelievi sterili di sangue eparinato alle pecore sottoposte ai 3 diversi vaccini ed al challenge con il ceppo wild type ed alle pecore non vaccinate (3 animali per ogni tipo di Sat). I campioni di sangue fresco sono stati rapidamente trasferiti a Firenze e sono state isolate le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) degli animali. Sono state quindi allestite microcolture in triplicato (2×10^5 PBMC in 0,2 ml) in medium RPMI 1640 addizionato al 10% con siero normale di pecora, in presenza di medium o di ciascuno dei lisati acquosi dei tre differenti ceppi vaccinali o del ceppo wild type, alle concentrazioni di 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$. Al quinto giorno di coltura ad ogni micropozzeto sono stati aggiunti 0,5 μCi di timidina tritiata. Dopo ulteriori 18 ore le colture sono state sacrificate e l'incorporazione di ^3H -timidina è stata valutata

con un beta-counter. I valori di proliferazione sono stati espressi come indice mitogenico (rapporto fra cpm delle colture stimulate con antigene e cpm delle colture di controllo stimulate con solo medium). I risultati ottenuti possono essere sintetizzati come segue:

1) I linfociti T di tutti gli animali vaccinati con ceppo mutante attenuato SSM1835 (alias SU304, *aroA*) hanno mostrato una significativa risposta proliferativa al lisato di SSM1835 con un effetto dose-risposta con l'incremento della concentrazione dell'antigene, ma già ben apprezzabile alla dose di 1 µg/ml. Al contrario, la risposta proliferativa degli stessi PBMC degli animali del gruppo hanno mostrato una risposta minimale al lisato del ceppo SSM883 privo di plasmide, mentre la risposta al lisato del mutante attenuato SSM189 è risultata alquanto superiore, specie alla massima concentrazione di antigene (100 µg/ml), verosimilmente per una reazione crociata verso antigeni condivisi fra i vari ceppi vaccinali. Per quanto concerne la risposta proliferativa al lisato del ceppo wild type, la risposta è risultata uniformemente modesta ed al limite della significatività (indice mitogenico ≤ 3.0) anche alle concentrazioni più elevate di antigene.

2) I linfociti T degli animali vaccinati con il mutante attenuato SSM189 (*crp-cya*) hanno mostrato una brillante risposta proliferativa (indice mitogenico > 30) in curva dose-risposta al lisato di SSM189, peraltro già apprezzabile alla dose di 1 µg/ml (indice mitogenico medio di 11,5).

Specularmene a quanto sopra riferito, i linfociti T degli animali di questo gruppo mostravano una risposta proliferativa più modesta nei confronti del lisato di SSM1835, ma sempre con un effetto dose-risposta con l'incremento della contrazione dell'antigene, fenomeno verosimilmente attribuibile ad una reazione crociata verso antigeni condivisi fra i due ceppi vaccinali. Una risposta crociata di minore entità era riscontrabile nelle colture stimulate con il lisato del ceppo attenuato SSM883 ed ancora minore era la risposta al lisato del ceppo wild type, ben apprezzabile solo alle concentrazioni più alte di antigene.

3) I linfociti T degli animali vaccinati con il ceppo attenuato SSM883 privo di plasmide hanno mostrato una risposta proliferativa inferiore a quella ottenuta negli animali vaccinati con i due mutanti di cui sopra. In particolare, non era apprezzabile un effetto dose-risposta, con risposte più significative alle basse (0,1 µg/ml) ed alle alte (100 µg/ml) concentrazioni e risposte più modeste alle dosi intermedie dell'antigene. Tale risultato è di difficile interpretazione anche perché non era riscontrabile in tutti gli animali. Inaspettatamente in questo gruppo di animali la risposta proliferativa T all'antigene immunizzante è risultata mediamente inferiore alla risposta ottenuta con i lisati dei ceppi SSM1835 e SSM189 che hanno indotto risposte significative e con effetto dose-risposta. Va inoltre rilevato che anche in questo gruppo di animali la risposta linfoproliferativa T al lisato del ceppo wild type è

risultata assai modesta (indice mitogenico ≤ 3) anche alle dosi più alte di antigene.

1.4. Conclusioni

Questa serie di dati permette di concludere che l'immunizzazione degli animali con i ceppi di Salmonella attenuati o mutanti utilizzati in questo studio ha evocato una risposta linfocitaria T specifica ben rilevabile in vitro. In particolare, l'immunizzazione con i mutanti SSM1835 e SSM189 ha dato luogo a risposte cellulo-mediate di entità maggiore rispetto alla risposta evocata dall'immunizzazione con il ceppo attenuato SSM883 privo di plasmide, la cui risposta specifica tuttavia è già rilevabile a concentrazioni molto modeste di antigene (0,1 µg/ml).

Come era prevedibile, i dati ottenuti in questa fase dello studio indicano che fra i vari ceppi vaccinali vi è un'ampia condivisione di antigeni che danno luogo a reazioni crociate da parte dei linfociti T dei diversi animali. In particolare, i mutanti SSM1835 e SSM189 sembrano mostrare la maggiore cross-reattività a livello della risposta linfocitaria T.

2. Studio della risposta citochinica ad antigeni di Sat ed Swt in linee T da pecore vaccinate.

In una fase successiva dello studio, si è tentato di realizzare linee linfocitarie T antigene-specifiche da pecore vaccinate con le diverse Sat. Allo scopo, macrocolture di linfociti di pecore vaccinate sono stati stimolati con dosi ottimali dei lisati dei Sat vaccinali ed a 6 giorni dall'inizio delle colture è stata aggiunta IL-2 umana ricombinante che in molti mammiferi può vicariare l'effetto linfoproliferativo T della IL-2 specie-specifica. Lo scopo della realizzazione di linee T Sat-specifiche era di ottenere materiale idoneo all'estrazione di mRNA per citochine nelle cellule T specificamente stimulate dai Sat vaccinali. Purtroppo, dopo una fase di circa 9-12 giorni di espansione in vitro (verosimilmente riferibile all'effetto della IL-2 endogena), tutte le linee T Sat-specifiche hanno arrestato la loro crescita, con progressivo aumento della mortalità cellulare. Un tentativo di stimolazione massimale con un mitogeno come la PHA non ha sortito effetto positivo e le diverse linee T sono andate incontro ad apoptosi.

2.1. Analisi quantitativa delle citochine espresse dalle cellule di sangue periferico di pecore gravide infettate con *S. abortusovis*

A causa dell'insuccesso di cui sopra, la caratterizzazione dell'espressione delle citochine dopo immunizzazione con i Sat vaccinali è stata eseguita a livello dei linfociti circolanti prelevati dagli animali nel corso della malattia sperimentale.

Dai linfociti circolanti dei diversi animali è stato estratto l' RNA che è stato conservato in aliquote a -80 °C fino al momento dei vari tests. L'RNA è stato quantificato sia con un gel di agarosio colorato con bromuro di etidio e sia con l'utilizzo dello spettrofotometro. Una volta calcolata la concentrazione di ogni campione, la stessa quantità di RNA (1 µg/ml) è stata retrotrascritta in cDNA con un kit per RT-PCR (Promega).

In questo studio è stata messa a punto una metodica di analisi quantitativa delle principali citochine proinfiammatorie specifiche della risposta immune di tipo Th1 (INF gamma, TNF alfa) e di quelle di tipo Th2 (IL-4, IL-10) utilizzando come gene di controllo un gene costitutivamente espresso, la gliceraldeide-3-fosfodeidrogenasi (G3PDH).

Ciascuna citochina è stata quantificata con l'utilizzo della Real-Time PCR (BIO-RAD) e come marker quantitativo è stato scelto un intercalante di DNA, Sybr green. Poiché gli ampliconi per la Real-Time PCR devono essere compresi tra 75-200 bp, sono state disegnate nuove coppie di primers, che sono stati testati allo scopo di identificare la temperatura di annealing ottimale (Tabella 1).

Tabella 1. Elenco dei primers specifici per citochine di pecora

| Citochine | Primers | Amplicone | Temperatura di annealing |
|--------------------------------|---|-----------|--------------------------|
| IL-4 | Fw 5'-AACGCCGAACATCCTCAC-3 Rv5'- CTCCTGTAGATACGCCTAAGC-3 | 138 bp | 58 °C |
| IL-10 | Fw 5'- GACCTCCAGGATGGTACTC-3 Rv 5'- TTCGGCTTCTTCCCAAATACG-3 | 199 bp | 58 °C |
| INF-γ | Fw 5'- TGCTCTGTGTGCTTTTGGG -3 Rv 5'- GAAGTAGAAGGAGACAATTTGGC-3 | 200bp | 58 °C |
| TNF alfa | Fw 5'- TTCTCAAGCCTCAAATAACAAG-3 Rv 5'- AGGACCTGCGAGTAGATG-3 | 177 bp | 58 °C |
| G3PDH | Fw 5'- CTCACTGGCATGGCCTT-3 Rv 5' - TTGGCAGGTTTCTCCAGG - 3' | 80 bp | 58 °C |

Dopo essere riusciti a retrotrascrivere gli RNA in cDNA si e' proceduti alla quantificazione delle citochine di interesse del progetto con l'utilizzo dei primers specifici e della Real-Time PCR.

E' stato osservato che in pecore gravide sane di circa 3 mesi si ha una produzione prevalente di citochine di tipo Th2 (IL-4, IL-10) sia nel sangue periferico che nella placenta.

Mentre in pecore gravide di circa 3 mesi infettate con *Salmonella abortusovis*, dopo circa 3 o 4 giorni dall'infezione si ha un aumento dell'espressione delle citochine di tipo Th1 (INF gamma, TNF alfa) sia nel sangue periferico che nella placenta.

Per confermare ulteriormente questi dati nei prossimi mesi verranno effettuate nuove Real-Time PCR.

CONCLUSIONI

Il progetto ha consentito di ottenere una serie di risultati utili alla migliore comprensione del meccanismo di protezione della pecora nei confronti dell'infezione da *Salmonella abortusovis*. L'attenuazione dei ceppi attraverso meccanismi naturali consente di ottenere una risposta cellulo-mediata importante anche se non efficace in vivo; i mutanti prodotti si mostrano stabili ed incapaci di restaurare la virulenza, poiché la modificazione dei ceppi in due o più siti del genoma diversi e fisicamente distanti non consente un facile ri-arrangiamento. La chiave della piena comprensione del meccanismo dell'aborto è probabilmente legata alla modulazione della risposta Th1-Th2, soprattutto nell'infezione con il ceppo selvaggio.

E' stata messa a punto una tecnica ELISA in grado di rivelare gli anticorpi nel corso dell'infezione da *Salmonella abortusovis*, che potrà essere agevolmente utilizzata dai laboratori diagnostici interessati alla problematica, in sostituzione di vecchie metodiche poco indicative ed incapaci di distinguere le classi di anticorpi coinvolti.

Anche la messa a punto di metodiche in grado di studiare l'andamento dell'immunità cellulo-mediata e i suoi mediatori consente di aprire interessanti prospettive per una migliore comprensione di fenomeni ancora poco investigati nella specie ovina.

Nel contempo ci sembra importante aver messo a punto un sistema di riproduzione dell'aborto nella pecora che consente di studiare meglio tutta una serie di agenti eziologici che danno questa sintomatologia.

La pubblicazione dei risultati ottenuti da questo progetto su una prestigiosa rivista testimonia la validità scientifica del lavoro svolto.

Inoltre, l'approccio multi-disciplinare utilizzato in questo come in altri progetti, a mio parere, è quello che consente di ottenere i risultati più interessanti dal punto di vista scientifico. E' chiaro che questi risultati, lungi dall'essere conclusivi, aprono una serie di interessanti prospettive speculative che si spera di poter investigare in prossimi progetti. Uno dei percorsi che ci sembra di particolare interesse riguarderà il sequenziamento del genoma di *Salmonella abortusovis*, che consentirà di studiare la funzionalità dei geni coinvolti nella patogenicità dei microrganismi.