



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Relazione di progetto finale

Multifocal strategies to improve gut health and reduce enterities in poultry and pigs

ACRONIMO DEL PROGETTO:

HealthyGut

Roma 11/10/2017



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Indice

1.	Progetto	3
2.	Descrizione del progetto	6
3.	Relazione intermedia/finale del progetto	7
3.1.	Obiettivi, benefici e criticità del progetto	19
4.	Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto	20



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

1. Progetto

Dati generali

Titolo del progetto	Multifocal strategies to improve gut health and reduce enterities in poultry and pigs
Acronimo del progetto	HealthyGut
Area strategica di intervento ¹	Area 1
Linea di attività ²	b. Uso sostenibile dei nutrienti, dei prodotti fitosanitari e dei prodotti zooprofilattici, utilizzazione di microrganismi, insetti utili e molecole bioattive per la difesa delle piante
Settore produttivo ³	a. Zootecnico;
Tipo di progetto	☒ Bando ☐ Affidamento diretto ☐ Sportello
Riferimento del Bando/Affidamento diretto/Sportello	EMIDA ERANET call 2009
Durata del progetto	36
Costo ammesso	300000
Contributo concesso	300000
Importo rendicontato	277.018,42

Soggetto proponente il progetto	Istituto Superiore di Sanità	Natura giuridica ☒ Pubblico ☐ Privato
Rappresentante legale	[Prof Gualtiero Ricciardi - 80211730587]	

Coordinatore del progetto	Paolo Pasquali PSQPLA67E01L117C
---------------------------	---------------------------------

Numero di Unità Operative	3 (tre)		
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE			
Unità Operativa n. 1 - Denominazione	Università di Tor Vergata	Natura giuridica ☒ Pubblico ☐ Privato	
Unità Operativa n. 2 - Denominazione	CRA	Natura giuridica ☒ Pubblico ☐ Privato	



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Unità Operativa n. 3 - Denominazione	Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche	Natura giuridica ☒ Pubblico ☐ Privato
---	---	---



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Numero di partner esterni al progetto	0 (zero)	
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE		
Partner n. 1 - Denominazione		Natura giuridica ☐ Pubblico ☐ Privato
Partner n. 2 - Denominazione		Natura giuridica ☐ Pubblico ☐ Privato

L'esempio riportato nel presente modello è riferito a un numero di due unità operative e di due partner. Qualora il progetto dovesse prevedere più unità operative o più partner aggiungere una riga per ogni unità operativa/partner.



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

2. Descrizione del progetto

Sintesi del progetto

Le malattie infettive degli animali inducono significative perdite produttive e in molti casi rappresentano dei rischi per la salute pubblica. E' stato riportato che tali patologie producano un effetto negativo pari a circa il 10% del prodotto stimato in 291 miliardi di euro nel 2005. Tra queste, le principali patologie enteriche (Salmonellosi, colibacillosi, enteriti da rotavirus, astrovirus, adenovirus e calicivirus) rappresentano i principali rischi.

La colonizzazione intestinale ad opera di un patogeno si verifica generalmente in periodi in cui l'animale è particolarmente suscettibile. In particolare per i suini si verifica nel periodo neonatale per mancanza di immunità passiva naturalmente acquisita dalla madre o per mancanza di una flora microbica non ancora sviluppata completamente e nel periodo post svezzamento per modificazioni del regime alimentare. Per le specie aviarie, nel periodo iniziale di ovodeposizione per una modificazione della costellazione ormonale.

Il controllo delle patologie enteriche è difficilmente realizzabile attraverso trattamenti chemioterapici o profilattici, pertanto il presente progetto intende esplorare la fattibilità di due approcci basati, il primo, sulla somministrazione di flora intestinale condizionata e, il secondo, sull'impiego di vaccini in grado di stimolare in maniera aspecifica la risposta immunitaria di tipo innato.

Le attività proposte nel piano sono finalizzate alla comprensione della composizione del microbiota intestinale dei polli e dei suini, in diverse fasi produttive, all'individuazione di una composizione del microbiota efficace per contrastare l'effetto dei patogeni enterici e allo sviluppo di vaccini in grado di stimolare una risposta immunitaria di tipo innato in grado di controllare l'infezione o i suoi effetti sull'organismo.

Il piano prevede un consorzio internazionale di cui il presente progetto è parte integrante. Nello specifico, la componente italiana si è occupata in particolare delle attività previste nel WP3 e WP5, organizzate nel progetto finanziato dal MIPAAF in 3 WorkPackages, finalizzati a:

- a) studiare i fattori di Salmonella enterica serovar Typhimurium (S.Typhimurium) che condizionano la virulenza;
- b) identificare il ruolo dei neutrofili e delle defensine nella salmonellosi (componenti della risposta immunitaria di tipo innata)
- c) studiare interazione tra S.Typhimurium e mucosa intestinale del suino.
- d) studiare la fattibilità dell'impiego di un ceppo attenuato di S.Typhimurium nel suino come vaccino in grado di aumentare la resistenza dei soggetti trattati.



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

3. Relazione finale del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO

Relazione tecnico-scientifica (max 20 pagine)



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

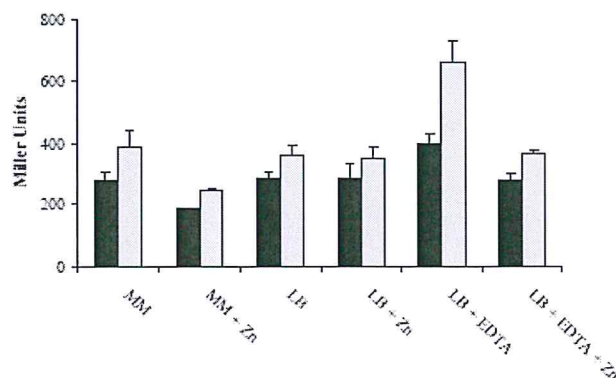
Le unità operative impegnate nel progetto hanno svolto attività finalizzate a:

- a) studiare i fattori di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S.Typhimurium*) che condizionano la virulenza (WP1);
- b) identificare il ruolo dei neutrofili e delle defensine nella salmonellosi (componenti della risposta immunitaria di tipo innata)(WP2);
- c) studiare interazione tra *S.Typhimurium* e mucosa intestinale del suino (WP2).
- d) studiare la fattibilità dell'impiego di un ceppo attenuato di *S.Typhimurium* nel suino come vaccino in grado di aumentare la resistenza dei soggetti trattati (WP3).

WP1

Per il punto a) è stato studiato il ruolo dei trasportatori dello zinco, come fattori di virulenza accessori, essendo già noto il ruolo fondamentale svolto dai geni che favoriscono la captazione dello zinco. Il proponente (ISS) insieme al dipartimento di Biologia dell'università di Tor Vergata (partner 1) ha condotto negli ultimi anni una serie di studi volti a comprendere il ruolo svolto dai metalli nel metabolismo batterico e questo progetto ne ha rappresentato la continuazione. In passato, è stato osservato che l'operone *ZnuABC* è necessario per *S.Typhimurium* per ottimizzare l'assunzione di zinco in condizione di scarsa biodisponibilità e quindi costituisce un fattore che promuove la sopravvivenza di *S.Typhimurium* nei tessuti infiammati dell'ospite, caratterizzati da un sequestro selettivo di zinco ad opera di chelanti prodotti dall'organismo a seguito della risposta infiammatoria (Ammendola et al., 2007). Inoltre è stato osservato che la mancanza dell'operone *ZnuABC*, riducendo la capacità di *S.Typhimurium* di sopravvivere nell'ospite, può determinare quell'attenuazione necessaria per ottenere ceppi vaccinali (Pasquali et al., 2008; Pesciaroli et al., 2011). Nel presente progetto, è stato investigato il significato biologico di *ZupT* in grado di trasferire lo zinco all'interno del citoplasma batterico. Per verificarne la funzione è stata prodotta una mutante contenente un marker per monitorare l'espressione di *ZupT* e, per delezione genica, una mutante priva di *ZupT*. Successivamente, è stata comparata la funzionalità di questi ceppi con il ceppo di origine. Utilizzando un modello sperimentale *in vitro*, è stato osservato che l'espressione di *ZupT* è significativamente aumentata in presenza di molecole chelanti (EDTA) lo zinco ed in mancanza dell'operone *ZnuABC* (Figure 1 di Cerasi et al., 2014).

Figure 1 Transcriptional analysis of the *zupT* promoter in *S. Typhimurium* Bacteria were grown overnight in minimal medium alone or supplemented with 0.01mM $ZnSO_4$ and LB alone or supplemented with 1mM $ZnSO_4$ or 1 mM EDTA or both. Black and grey bars represent the wild type strain (PP150) and *znuABC* strain (PP152) respectively. Each experiment was repeated at least twice and samples were always assayed in triplicate.





Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Successivamente, è stato valutato l'effetto del fattore ZupT nella virulenza di *S. Typhimurium*, utilizzando modelli sperimentali di competizione su topo. E' stato osservato che la sola mancanza di ZupT non modifica la capacità di colonizzare gli organi di animali infetti ma la sua mancanza associata a quella dell'operone ZnuABC riduce significativamente la virulenza di *S. Typhimurium* ZnuABC (Table 3 di Cerasi et al., 2014).

Table 3.
Mouse competition assays in Balb/C mice

Strain A (relevant genotype)	Strain B (relevant genotype)	Median CI ^a	N. mice	P ^b
ATCC14028 (wild type)	SA321 (<i>zupT::kan</i>)	0.902	5	NS
SA186 (<i>znuABC-scar</i>)	SA327 (<i>znuABC-scar zupT::kan</i>)	4.506	5	0.014

^a Competitive index (CI) = output (strain A/strain B)/inoculum (strain A/strain B).

^b Statistical differences between output and inocula (P values) were determined by Student's t test.
NS, Not Significant

Nel complesso, tali studi hanno dimostrato che *zupT* è un cofattore coinvolto nella virulenza di *S. Typhimurium*. Il suo ruolo, tuttavia, sembra essere ancillare rispetto all'operone ZnuABC, in quanto è particolarmente significativo solamente se lo zinco extracellulare risulta molto limitato e in mancanza dell'operone ZnuABC (Cerasi et al., 2014).

WP2

Per il punto b) è stato studiato il ruolo dei neutrofili nelle infezioni da salmonella, utilizzando un approccio basato su modelli sperimentali di salmonellosi nel topo.

E' stato recentemente verificato che uno dei meccanismi attraverso cui i neutrofili esplicano la loro azione antibatterica è mediato dalla produzione di molecole bioattive. Una di esse è la calprotectina in grado di chelare lo zinco e renderlo quindi indisponibile per il metabolismo batterico.

A tal proposito sono stati condotti studi in vitro per verificare l'effetto diretto della calprotectina nei confronti di *S. Typhimurium*, comparando l'effetto sia su batteri pienamente virulenti, sia su batteri privi dell'operone ZnuABC, in grado di ottimizzare l'utilizzo dello zinco.

E' stato osservato che quando la calprotectina è aggiunta ad una sospensione batterica la crescita di *S. Typhimurium* è inibita in maniera dose-dipendente ed è molto più marcata in mancanza di ZnuABC. La dose necessaria per l'inibizione è quella paragonabile a quella presente in tessuti infiammati ma non in quella normalmente presente nel lume enterico (Fig 3 di Liu et al., 2012).

Questi dati suggeriscono quindi che i neutrofili giocano un ruolo fondamentale nel controllo di *S. Typhimurium* attraverso la secrezione di calprotectina che però raggiunge livelli efficaci solamente in ambito sistemico. Di converso, *S. Typhimurium* ha selezionato meccanismi di risposta per contrastare l'attività di calprotectina, attraverso sistemi di captazione ad alta affinità dello zinco, come l'operone ZnuABC.

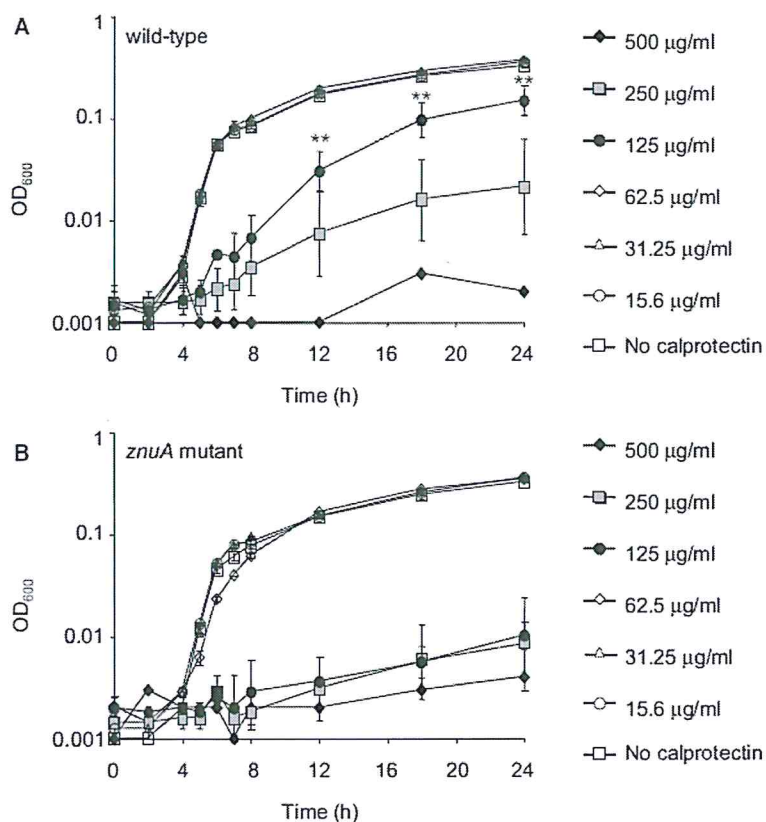


Figure 3. Growth of *S. Typhimurium* in Rich Media Supplemented with Calprotectin
(A and B) *S. Typhimurium* wild-type (A) or the *znuA* mutant (B) were grown in LB media supplemented with calprotectin at the indicated concentrations. Growth was determined by reading the OD₆₀₀ in a microplate reader at the indicated times. Data represent the geometric mean of four biological replicates $\pm$ standard error. A significant difference in growth between wild-type and the *znuA* mutant is indicated by ** (p value ≤ 0.01). (See also Figure S2 and Table S2).

Per il punto c), in collaborazione con il CRA (partner 2) e con l'IZS dell'Umbria e delle Marche (partner 3) sono stati condotti diversi studi, utilizzando un modello sperimentale di salmonellosi nel suino, per verificare l'interazione tra *S.Typhimurium* e l'ospite vertebrato, soprattutto a livello della mucosa intestinale.

Gli animali sono stati sperimentalmente infettati con il ceppo pienamente virulento di *S.Typhimurium*, con il ceppo attenuato *S.Typhimurium* ZnuABC o lasciati come controlli non infetti. A differenti giorni dopo il trattamento sono stati abbattuti e sono stati verificati la risposta immunitaria aspecifica, la risposta della mucosa intestinale e l'effetto sulla composizione microbiotica intestinale.

In linea generale è stato osservato che l'entità delle modificazioni indotte dall'infezione è proporzionale alla virulenza del ceppo utilizzato (Fig 1 e Fig 2 di Drumo et al., 2016).

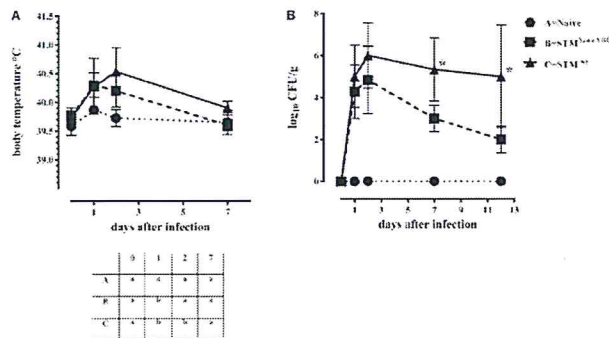


FIGURE 1 | *STM*^{ΔznuABC} (group B) shows a lower virulence in piglets compared to the *STM*^{wt} (group C). (A) Mean value and standard deviation (SD) bars of body temperature of study groups in different time points. In the table on the bottom the levels of significance were reported among groups at different time points. Different letters at each time point represent significant different results ($P \leq 0.05$, Dunnett's test). (B) Mean values and SD bars of CFU/g of *STM*^{ΔznuABC} and *STM*^{wt} shed in locus. Results of piglets infected with *STM*^{ΔznuABC} were compared to results of *STM*^{wt} and differences were statistically significant when $*P \leq 0.05$, Mann-Whitney test.

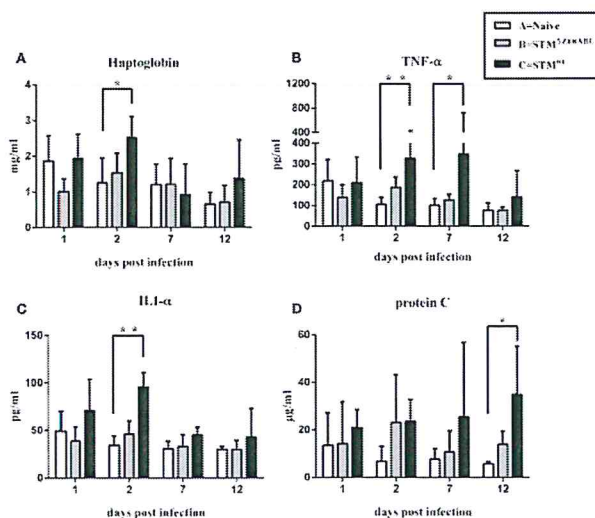


FIGURE 2 | (A–D) *S. Typhimurium* induces an inflammatory response correlated to the virulence of the bacterial strain. Haptoglobin, TNF- α , IL-1- α , and C-reactive protein levels in serum of animals were determined by ELISA. The asterisks indicate statistical significance: $*P \leq 0.05$ and $**P \leq 0.01$ (multiple comparisons-Dunn's test).

E' stato quindi osservato che *S.Typhimurium* è in grado di modificare le popolazioni batteriche che costituiscono il microbiota intestinale (Fig.7 di Drumo et al., 2016) e che l'organismo vertebrato, in risposta all'infezione, induce una modifica delle molecole prodotte nel lume intestinale per ridurre il substrato metabolico a disposizione di *S.Typhimurium* e quindi per cercare di ostacolare la colonizzazione del patogeno (effetto nutririvo) (Fig. 4 di Miarelli et al., 2016).

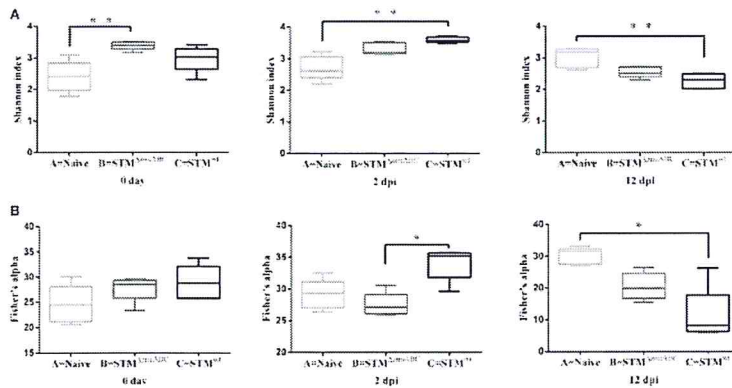


FIGURE 7 | Structural comparison of fecal microbiota among groups A, B, and C. The Shannon index (A) and Fisher's alpha (B) were used to estimate diversity of the fecal microbiota in naive animals (group A) and in *STM*^{ΔznuABC} (group B) and *STM*^{vir} (group C) infected piglets. Boxes represent median, and first and third quartiles, whiskers indicate minimum and maximum values. The asterisks indicate statistical significance **P* < 0.05 and ***P* < 0.01, Dunn's test.

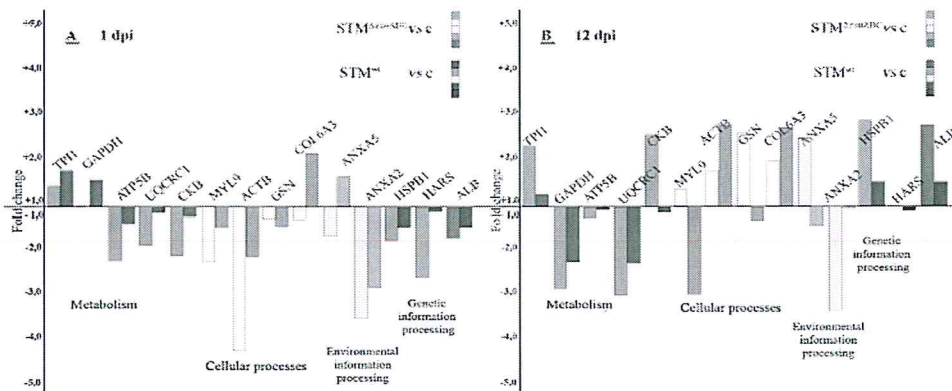


Fig. 4. Fold change of the 14 identified proteins at 1 dpi (A) and 12 dpi (B), from attenuated (*STM*^{ΔznuABC}) and virulent (*STM*^{vir}) strains infected piglets, compared to uninfected piglets (c). Y axis represents the ratio of spot photodensity (=fold change) of infected versus control piglets. The ratio was classified as positive if the protein concentration increased after inoculation, negative if it decreased after infection.



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Infine, una serie di esperimenti sono stati condotti anche in un modello sperimentale di salmonellosi del pollo. L'obiettivo è la comprensione del ruolo svolto dalle defensine, molecole prodotte dalla mucosa intestinale dei vertebrati, nell'interazione di questa con i batteri che costituiscono la flora intestinale e con i batteri patogeni, attenuati per produrre vaccini.

Il proponente ha partecipato in collaborazione all'INRA francese (partner del progetto europeo di cui il presente progetto è parte integrante, come precedentemente ricordato). È stato sviluppato un modello sperimentale in cui pulcini (White leghorn) di 1 giorno sono stati infettati per via orale con un ceppo attenuato di *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, ottenuto per delezione dell'operone ZnuABC (*S.Enteritidis* ZnuABC). Successivamente all'infezione a 3, 7, 17, 32 giorni dopo l'infezione, 5 animali infetti e 5 non trattati (controlli) sono stati sacrificati ed è stata valutata l'escrezione di *S.Enteritidis* ZnuABC nelle feci e la colonizzazione negli organi bersaglio. Contestualmente è stato prelevato una porzione di tonsille cecali per la valutazione dell'espressione delle citochine, effettuata presso i laboratori dell'UO5.

Risultati.

S.Enteritidis ZnuABC ha dimostrato di indurre un'infezione protratta nel tempo nell'ambito intestinale (figura 1) mentre negli organi bersaglio la colonizzazione è stata osservata solamente negli animali sacrificati a 3 giorni dopo l'infezione (dati non mostrati).

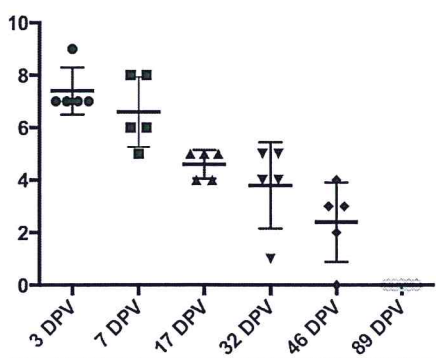


figura 1. Eliminazione di *S.Enteritidis* ZnuABC nelle feci, dopo infezione.

L'analisi dell'espressione genica di 14 geni esaminati ha dimostrato che 8 di essi sono rimasti debolmente espressi mentre AvBD1, AvBD4, AvBD2, AvBD12, AvBD7 e AvBD14 hanno mostrato una significativa espressione che in qualche caso si è anche tradotta in una marcata differenza tra gli animali trattati con *S.Enteritidis* ZnuABC o di controllo. In particolare, AvBD4, AvBD12 e AvBD14 sono risultati meno espressi negli infetti che nei controlli (figura 2).

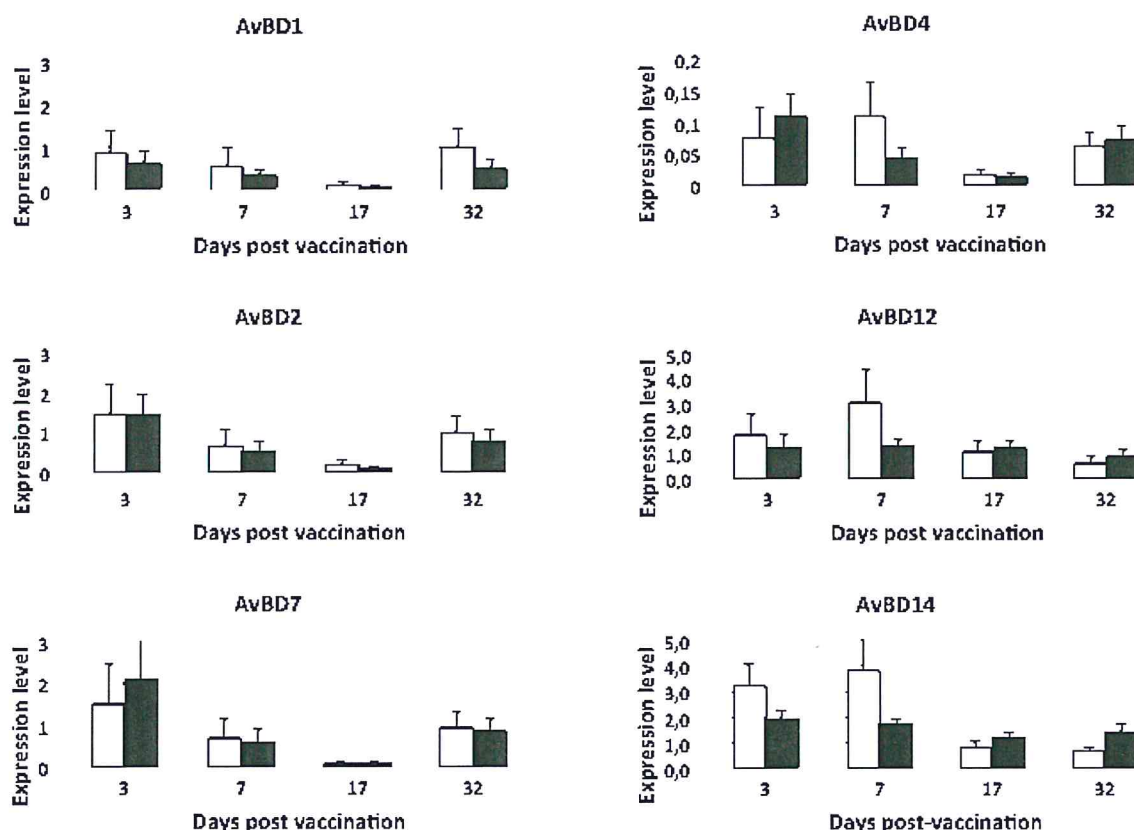


Figura 2. Espressione delle defensine

I dati ottenuti hanno dimostrato che il ceppo *S. Enteritidis* ZnuABC è risultato attenuato, essendo scomparso dopo soli tre giorni dall'infezione ma l'escrezione prolungata nelle feci non ne consente un ipotizzabile utilizzo come vaccino determinando, in questo caso una diffusione eccessiva e non controllata del ceppo. Inoltre, è risultato evidente che nel modello utilizzato le defensine prodotte dalla mucosa intestinale di pulcini di 1 giorno non svolgono un ruolo fondamentale, o almeno non particolarmente significativo, nell'interazione ospite-patogeno.

Visto che i dati non sono stati rilevanti né dal punto di vista speculativo né tantomeno sono risultati utili per una futura trasferibilità, non sono stati utilizzati per la redazione di pubblicazioni scientifiche.

WP3

Per il punto d) è stata verificata l'innocuità e l'immunogenicità di ceppi attenuati di *S. Typhimurium* privi dell'operone *ZnuABC* che, in base alle conoscenze acquisite precedentemente, risultavano idonei candidati come ceppi vaccinali (Pasquali et al., 2008; Pesciaroli et al., 2011). E' stato osservato che l'infezione con il ceppo attenuato di *S. Typhimurium* (*ZnuABC*) è molto limitata senza significativi effetti sulle condizioni cliniche dei suini (Fig.1 di Pesciaroli et al., 2013).

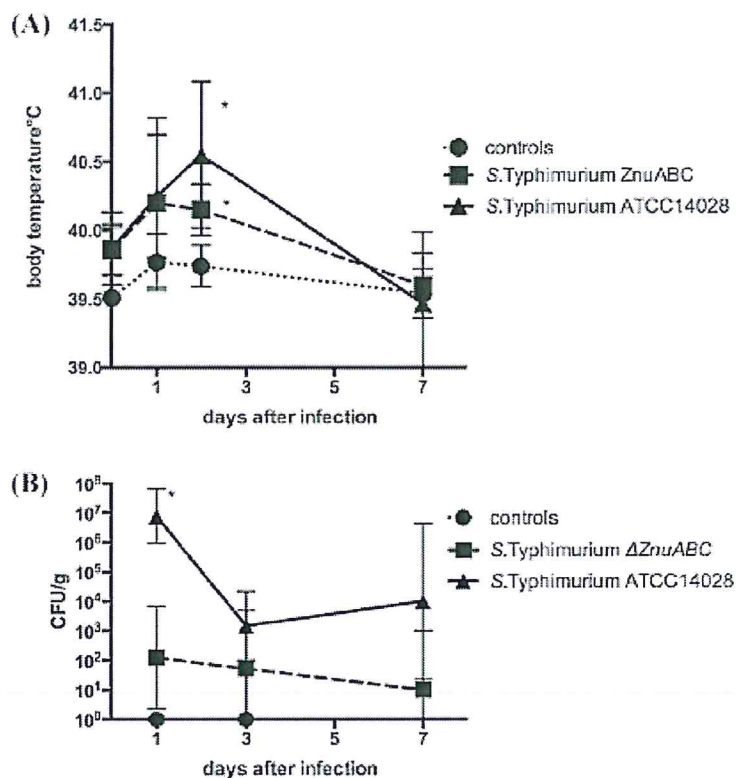


Fig. 1. *S. Typhimurium* $\Delta znuABC$ shows lower virulence in pigs compared to wild type *S. Typhimurium* ATCC 14028. (A) Mean values and SD bars of body temperature of groups (A–C) at different time points. Results of group A or B were compared with results of group C. Differences were estimated using 2 ways analysis of variance with a Tuckey's multiple comparison test and considered significant when **P*-value ≤ 0.05 . (B) Mean values and SD bars of CFU/g of *S. Typhimurium* $\Delta znuABC$ (group A) and *S. Typhimurium* ATCC14028 (group B) shed in feces. Results of group A were compared with results of group B. Differences were estimated using non parametric Mann Whitney test and were considered significant when **P*-value ≤ 0.05 .

Inoltre, il ceppo attenuato induce una risposta immunitaria in grado di limitare l'effetto di una successiva infezione con *S. Typhimurium* pienamente virulento (Fig. 4 di Gradassi et al., 2013).

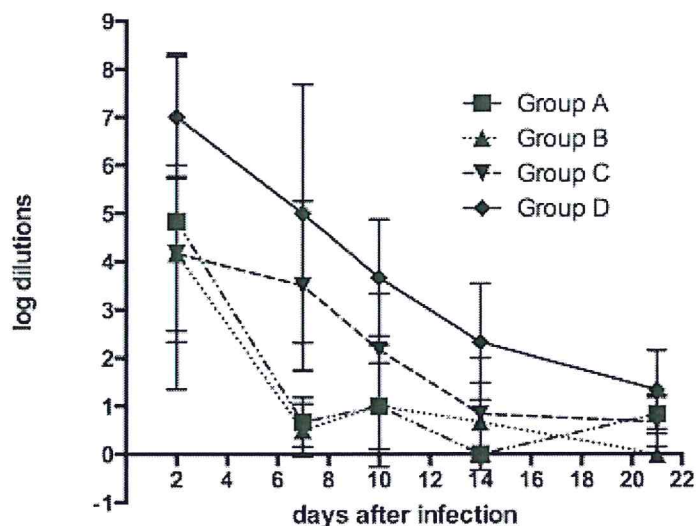


Fig. 4. *S. Typhimurium* $\Delta znuABC$ vaccination reduces *Salmonella* faecal shedding in infected pigs. *Salmonella* faecal shedding, at different time points after a challenge infection with virulent *S. Typhimurium*, in pigs vaccinated with either 5×10^8 CFU (group A) or 5×10^7 CFU (group B) of attenuated *S. Typhimurium* $\Delta znuABC$; in pigs vaccinated with inactivated *S. Typhimurium* (group C); and in unvaccinated controls (group D). Symbols represent group means; bars represent 95% confidence intervals. Data refer to one out of two separate experiments performed with comparable results.



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Referenze citate (in **grassetto** gli articoli prodotti con il contributo del presente progetto)

AMMENDOLA S., PASQUALI P., PISTOIA C., PETRUCCI P., PETRARCA P., ROTILIO G., BATTISTONI A., 2007. The high affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to virulence of *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 75: 5867-76

CERASI M, LIU JZ, AMMENDOLA S, POE AJ, PETRARCA P, PESCIAROLI M, PASQUALI P, RAFFATELLU M, BATTISTONI A, 2014. The ZupT transporter plays an important role in zinc homeostasis and contributes to *Salmonella enterica* virulence. *Metallomics*. Jan 16

DRUMO R, PESCIAROLI M, RUGGERI J, TARANTINO M, CHIRULLO B, PISTOIA C, PETRUCCI P, MARTINELLI N, MOSCATI L, MANUALI E, PAVONE S, PICCIOLINI M, AMMENDOLA S, GABAI G, BATTISTONI A, PEZZOTTI G, ALBORALI GL, NAPOLIONI V, PASQUALI P, MAGISTRALI CF. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Modify Swine Intestinal Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Jan 22;5:106.

GRADASSI M, PESCIAROLI M, MARTINELLI N, RUGGERI J, PETRUCCI P, HASSAN WH, RAFFATELLU M, BATTISTONI A, ALBORALI L, PASQUALI P., 2013. Efficacy of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZnuABC transporter against salmonellosis in pigs *Vaccine*, 31 :3695-701.

LIU J.Z., JELLBAUER, POE A., PESCIAROLI M., KEHL-FIE T., HOSKING M, EDWARDS R. A., BATTISTONI A, PASQUALI P, LANE T, WALTER J., CHAZIN WJ, VOGL T., SKAAR E P., RAFFATELLU M., 2012. Zinc Sequestration by the Neutrophil Protein Calprotectin Enhances *Salmonella* Growth in the Inflamed Gut. *Cell Host & Microbe*, 11: 227–239

MIARELLI M, DRUMO R, SIGNORELLI F, MARCHITELLI C, PAVONE S, PESCIAROLI M, RUGGERI J, CHIRULLO B, AMMENDOLA S, BATTISTONI A, ALBORALI GL, MANUALI E, PASQUALI P. *Salmonella* Typhimurium infection primes a nutriptive mechanism in piglets. *Vet Microbiol*. 2016 Apr 15;186:117-25.

PASQUALI P., AMMENDOLA S., PISTOIA C., PETRUCCI P., TARANTINO M., ROTILIO G., BATTISTONI A., 2008. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking ZnuABC transporter (*S.*Typhimurium SA 186) confer immune-based protection against challenge infections in mice. *Vaccine*, 26:3421-6.

PESCIAROLI M., AMMENDOLA S., RAFFATELLU M., PISTOIA C., PETRUCCI P., TARANTINO M., BATTISTONI A., PASQUALI P., 2013. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking ZnuABC transporter (*S.*Typhimurium SA 186) confers immune-based protection against challenge infections in piglets. *Vaccine*, 31: 2868-73.

PESCIAROLI M., AMMENDOLA S., PISTOIA C., PETRUCCI P., TARANTINO M., BATTISTONI A., PASQUALI P., 2011. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking ZnuABC transporter (*S.*Typhimurium SA 186) confers immune-based protection against challenge infections in streptomycin pretreated mice. *Vaccine*, 29: 1783-1790



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Osservazioni alla relazione tecnico-scientifica



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

3.1. Obiettivi, benefici e criticità del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO				
Descrizione degli obiettivi del progetto				
Obiettivi generali	Obiettivi specifici	Linee di attività in WP	Risultati attesi	Risultati raggiunti (Se il risultato atteso non è stato raggiunto specificare la motivazione nel campo note)
a. fattori di virulenza di S.Typhimurium	1. mutanti di S.Typhimurium	• WP 1	• Ceppi di S.Typhimurium (ceppi marker e deleti per i fattori di virulenza da studiare)	• Raggiunto (2 ceppi di S.Typhimurium)
	2. Comprendere i meccanismi di virulenza di S.Typhimurium	• WP 1	• Acquisizione delle informazioni inerenti il ruolo dei fattori di virulenza	• Raggiunto (pubblicazione scientifica (Cerasi et al., 2014))
b. ruolo dei neutrofili e delle difese nella salmonellosi	1. ruolo dei neutrofili	• WP 2	• Acquisizione delle informazioni inerenti il ruolo ed il meccanismo dei neutrofili	• Raggiunto (pubblicazione scientifica (Liu et al., 2014))
	2. ruolo delle difese	• WP 2	• Acquisizione delle informazioni inerenti il ruolo delle difese	• Raggiunto (informazioni presentate ma non pubblicate)
c. interazione tra S.Typhimurium e mucosa intestinale del suino (WP2).	1. Effetto dell'infezione di S.Typhimurium su risposta immunitaria	• WP 2	• Acquisizione delle informazioni inerenti la risposta immunitaria in corso di infezione da S.Typhimurium	• Raggiunto (pubblicazione scientifica (Drumo et al., 2016))
	3. Effetto dell'infezione di S.Typhimurium su metabolismo dell'ospite	• WP 2	• Acquisizione delle informazioni inerenti la modifica del metabolismo in corso di infezione da S.Typhimurium	• Raggiunto (pubblicazione scientifica (Miarelli et al., 2016))
	4.	•	•	•
d. Sviluppo di vaccini	5. Informazioni inerenti la capacità di ceppi attenuati	• WP 3	• Acquisizione delle informazioni inerenti innocuità ed	• Raggiunto (pubblicazione scientifica (Pesciaroli et al., 2013; Gradassi et al., 2013))



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

	di S.Typhimurium di indurre protezione		efficacia	
	6.	• xxx • xxx	• xxx • xxx	• xxx • xxx
NOTE				
.....				
SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)				
Osservazioni al raggiungimento degli obiettivi del progetto				

4. Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto

Descrivere gli ostacoli occorsi durante la realizzazione delle attività del progetto indicando la linea di attività interessata, l'Unità operativa coinvolta e le azioni che sono state attivate al fine di rimuovere gli ostacoli che impedivano la realizzazione degli obiettivi.

Numero WP	Unità operative coinvolte	Ostacolo	Azioni correttive
SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)			
Osservazioni alle azioni correttive messe in atto			

Timbro dell'Ente proponente il progetto



Firma leggibile del Coordinatore del progetto

Paolo Pasquali



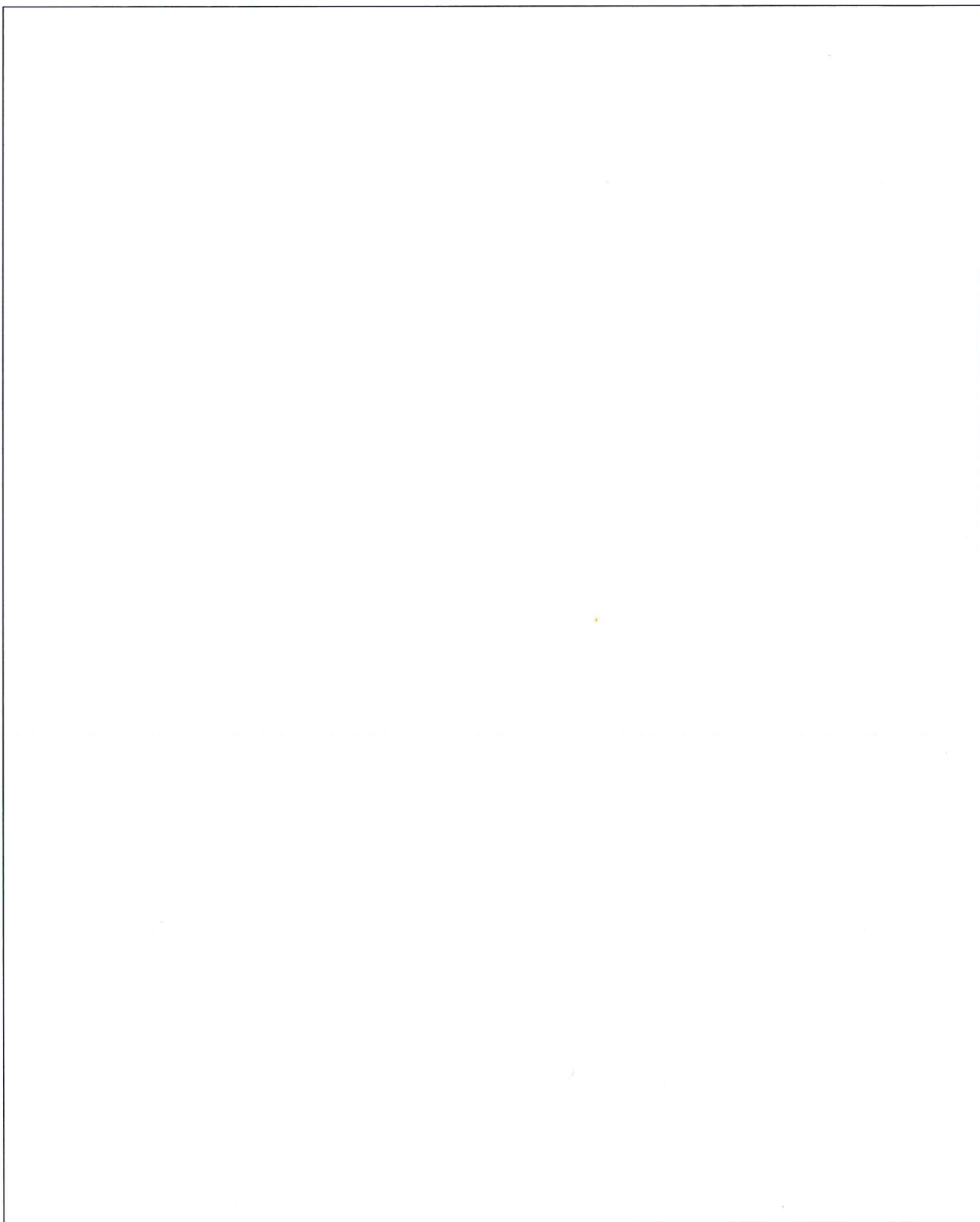
Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Valutazione complessiva del progetto



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma





Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Luogo e Data

Firma leggibile dell'Esperto (qualora designato)



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

Note

¹ Inserire una delle 6 aree prioritarie previste dal capitolo 2 del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

- Area 1 - Aumento sostenibile della produttività, della redditività e dell'efficienza delle risorse negli agro ecosistemi
- Area 2 - Cambiamento climatico, biodiversità, funzionalità suoli e altri servizi ecologici e sociali dell'agricoltura
- Area 3 - Coordinamento e integrazione dei processi di filiera e potenziamento del ruolo dell'agricoltura
- Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani
- Area 5 - Utilizzo sostenibile delle risorse biologiche a fini energetici ed industriali
- Area 6 - Sviluppo e riorganizzazione del sistema della conoscenza per il settore agricolo, alimentare e forestale
- Area 7 - Pesca e acquacoltura

² Inserire una delle seguenti linee di attività (previste dal Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale 2014-2020). La linea di attività da inserire dovrà corrispondere all'area strategica di intervento indicata nel precedente campo, ovvero per la:

Area 1 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Scelte varietali, di razza, di destinazione d'uso, miglioramento genetico mediante l'utilizzo di biotecnologie sostenibili;
- b. Uso sostenibile dei nutrienti, dei prodotti fitosanitari e dei prodotti zooprofilattici, utilizzazione di microrganismi, insetti utili e molecole bioattive per la difesa delle piante;
- c. Ottimizzazione dei processi produttivi (tecnica colturale, alimentazione, benessere animale, pratiche di prevenzione, risparmio energetico, ecc.), anche mediante l'utilizzo di sistemi di supporto alle decisioni (telerilevamento, agricoltura e zootecnia di precisione, meccanizzazione integrale, robotica e altri sistemi automatici intelligenti, applicazione di principi e strumenti di intelligenza artificiale ecc.) e biotecnologie sostenibili;
- d. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento degli impianti e delle strutture aziendali;
- e. Gestione efficiente della risorsa idrica e della qualità delle acque;
- f. Conservazione, conservabilità e condizionamento delle produzioni (riduzione degli sprechi, conservanti naturali ecc.);
- g. Strumenti e sistemi funzionali alla gestione aziendale (pianificazione, costi di produzione, diversificazione ecc.) e alla sua caratterizzazione (impronta ecologica).

Area 2 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Strategie per la mitigazione e per lo studio dell'adattamento al cambiamento climatico;
- b. Valorizzazione delle varietà e razze locali e salvaguardia delle risorse genetiche;
- c. Tutela del fattore "suolo": conservazione, qualità, fertilità e salvaguardia della biodiversità microbica;
- d. Valorizzazione di alcuni servizi ecologici forniti dal settore primario: manutenzione e ripristini ambientali, verde urbano, agricoltore/selvicoltore custode, bonifica dei terreni inquinati ecc.;
- e. Valorizzazione del ruolo sociale dell'agricoltura: "agricoltura sociale", relazioni urbano – rurale, accettabilità sociale dell'attività agricola.

Area 3 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Soluzioni organizzative, economiche e sociali alle difficoltà strutturali di integrazione orizzontale e verticale nei distretti e nelle filiere;
- b. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento dei processi di filiera;
- c. Sviluppo di sistemi distributivi, commerciali, promozionali e di marketing.

Area 4 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Produzione di alimenti di qualità per tutti (food security);
- b. Miglioramento, tutela e tracciabilità della qualità e della distintività e adeguamento dei relativi standard di certificazione;
- c. Tecniche sostenibili per la trasformazione, conservazione e confezionamento dei prodotti agroalimentari;
- d. Valorizzazione della relazione tra alimentazione e salute e della valenza nutraceutica dei prodotti agroalimentari.

Area 5 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Sviluppo e razionalizzazione delle filiere di biomasse e di biocarburanti con adeguati requisiti di sostenibilità ambientale ed economica;
- b. Sviluppo di bioraffinerie per la produzione di materiali industriali e mezzi tecnici a partire da residui e scarti agricoli nell'ottica dell'adeguata remunerazione del settore agricolo.

Area 6 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Nuovi strumenti di governance per il coordinamento e l'efficienza del sistema della conoscenza: analisi dei fabbisogni, pianificazione, monitoraggio, valutazione ecc.;
- b. Promozione del trasferimento dell'innovazione mediante servizi di supporto, formazione e consulenza alle imprese agricole, alimentari e forestali;
- c. Sviluppo di nuove modalità.



Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299 Roma

³ Inserire uno degli 13 settori produttivi previsti dall'Allegato A del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

- a) Zootecnico;
- b) Orticolo;
- c) Cerealicolo;
- d) Viticolo;
- e) Frutticolo;
- f) Olivicolo;
- g) Biologico;
- h) Floricolo;
- i) Forestale;
- j) Innovazione sociale;
- k) Piante officinali;
- l) Risicolo;
- m) Pesca e acquacoltura.**