

Université de Montréal

Étude de l'efficacité de la vaccination à *Salmonella* Enteritidis chez la poule  
pondeuse et de la protection contre l'infection

par

Thi Quynh Lan Tran

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

*philosophiae doctor* (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

Janvier 2010

© Thi Quynh Lan Tran, 2010

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

Étude de l'efficacité de la vaccination à *Salmonella* Enteritidis chez la poule  
pondeuse et de la protection contre l'infection

présentée par

Thi Quynh Lan Tran

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Marie Archambault, présidente-rapporteuse

Martine Boulianne, directrice de recherche

Sylvain Quessy, codirecteur

Ann Letellier, codirectrice

Amer Silim, membre du jury

Anne Christine Lalmanach, examinatrice externe

John Morris Fairbrother, représentant du doyen

## RÉSUMÉ

Les infections à *Salmonella* Enteritidis chez les humains sont associées à la consommation d'œufs ou d'ovoproduits contaminés. La vaccination est un outil utilisé pour diminuer les risques d'infection à SE chez la volaille, mais avec des résultats variables. Au Canada deux bactérines, MBL SE4C et Layermune, sont couramment utilisées pour lutter contre SE. Cependant, leur efficacité n'a pas été complètement déterminée chez les poules pondeuses plus âgées. Par ailleurs, la capacité de ces vaccins à prévenir la transmission verticale et horizontale n'a pas encore été étudiée.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet des deux bactérines sur la réponse immunitaire chez les poules pondeuses, de vérifier la protection conférée par ces vaccins contre l'infection expérimentale à SE, et d'identifier des protéines immunogènes afin de développer un vaccin sous-unitaire.

Les oiseaux ont été vaccinés avec deux protocoles d'immunisation en cours d'élevage (soit à 12 et 18, ou à 16 semaines d'âge). Le groupe contrôle a été injecté avec la solution saline. Les oiseaux ont été inoculés *per os* avec  $2 \times 10^9$  CFU de la souche SE lysotype 4 à 55 ou à 65 semaines d'âge. Les anticorps (IgG et IgA) ont été mesurés à différents temps avec un ELISA maison en utilisant l'antigène entier de SE. La phagocytose, flambée oxydative, les populations des splénocytes B et T ont été analysées en utilisant la cytométrie en flux. Les signes cliniques, l'excrétion fécale, la contamination des jaunes d'œufs et l'invasion des salmonelles dans les organes ont été étudiés pour évaluer l'efficacité de protection. La transmission horizontale a aussi été étudiée en évaluant l'infection à SE chez les oiseaux mis en contact avec les oiseaux inoculés. Les protéines immunogènes ont été identifiées par SDS-PAGE et Western blot à l'aide d'antisérums prélevés suite à la vaccination et/ou à l'infection expérimentale/naturelle, puis caractérisées par la spectrométrie de masse.

Le protocole de vaccination avec deux immunisations a généré un niveau élevé de séroconversion à partir de 3 jusqu'à 32-34 semaines post-vaccination par rapport à celui avec une seule immunisation ( $p < 0.02$ ), mais il n'y avait plus de différence

entre les groupes à 54 et 64 semaines d'âge. Il n'y a pas eu de corrélation entre les niveaux d'IgG et les taux d'isolement des salmonelles dans les organes et des jaunes d'œuf. La production des IgA n'a été observée que chez les oiseaux vaccinés avec 2 injections de MBL SE4C ( $p \leq 0.04$ ). Après l'infection expérimentale, la production des IgA a été significativement plus élevée aux jours 1 et 7 p.i dans l'oviducte des oiseaux vaccinés (sauf pour le groupe vacciné avec 2 injections de Layermune) par comparaison avec le groupe contrôle ( $p \leq 0.03$ ). Seule la bactérine MBL SE4C a eu un effet protecteur contre la contamination des jaunes d'œuf chez les oiseaux infectés. Ce vaccin réduit partiellement en utilisant deux immunisations, le taux d'excrétion fécale des salmonelles chez les oiseaux inoculés et les oiseaux horizontalement infectés ( $p \leq 0.02$ ).

Cinq des protéines identifiées par la spectrométrie de masse sont considérées comme des protéines potentiellement candidates pour une étude plus approfondie de leur immunogénicité: Lipoamide dehydrogenase, Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase), Elongation factor Tu (EF-Tu), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) et DNA protection during starvation protein.

En général, les bactérines ont induit une immunité humorale (IgG et IgA) chez les poules pondeuses. Cette réponse immunitaire a protégé partiellement les oiseaux quant à l'élimination des salmonelles, la contamination des jaunes d'œuf, ainsi que la transmission horizontale. Dans cette étude, la bactérine MBL SE4C (avec deux immunisations) s'est montrée plus efficace pour protéger les oiseaux que la bactérine Layermune. Nos résultats apportent des informations objectives et complémentaires sur le potentiel de deux bactérines pour lutter contre SE chez les poules pondeuses. Étant donné la protection partielle obtenue en utilisant ces vaccins, l'identification des antigènes immunogènes a permis de sélectionner des protéines spécifiques pour l'élaboration éventuelle d'un vaccin plus efficace contre SE chez les volailles.

**Mots-clés :** *Salmonella* Enteritidis, poule pondeuse, œuf, bactérine, vaccination, réponse immunitaire, infection expérimentale, protéine immunogène.

## SUMMARY

Contaminated eggs and egg products have been associated with outbreaks of human *Salmonella* Enteritidis (SE) infections. Killed bacteria (bacterins) have been used to control *Salmonella* infections in poultry but variation in the conferred protection has been observed. In Canada the bacterins MBL SE4C and Layermune are currently used to control SE. However, their efficacy in protecting older layers has not been fully determined. Furthermore, the capacity of these bacterins to prevent vertical and horizontal transmissions has not yet been investigated.

The main objectives of this study were to evaluate the effect of two available commercial bacterins on the immune response of laying hens, to verify the protection conferred by these vaccines against SE challenge and to identify immunogenic proteins to develop an oral subunit vaccine.

Laying hens were vaccinated with two immunization schedules prior to the lay cycle (either at 12 and 18, or 16 weeks of age). The control group was injected with a saline solution. Laying hens were later inoculated *per os* with  $2 \times 10^9$  CFU of SE PT4 strain either at 55 or 65 weeks of age. Serum IgG and mucosal IgA antibodies were measured with an in-house SE whole cell antigen ELISA. The phagocytosis, oxidative burst, splenic T and B cells populations were analyzed using flow cytometry. Clinical signs, fecal shedding, egg yolks contamination and organ invasion by SE were assessed to evaluate vaccine protection. Potential horizontal transmission from inoculated laying hens to non-inoculated laying hens, housed in the same isolator unit, was also evaluated. Immunogenic proteins were identified by SDS-PAGE and Western blot with sampled antisera during vaccination and/or infection of poultry with SE and then subjected to mass spectrometry.

The vaccination protocol with two immunizations showed a higher seroconversion level than the single vaccination at 3 until 32-34 weeks post vaccination ( $p < 0.02$ ) but no difference before challenge (54 and 64 old weeks). There was no relationship between high IgG level and SE isolation rates in organs and egg yolks. Only the MBL SE4C vaccine elicited IgA antibody production at 3 weeks post vaccination in both

immunization protocols ( $p \leq 0.04$ ). Significant higher mucosal IgA levels were observed at day 1 and 7 post challenge in oviduct of vaccinated birds (except for the twice vaccinated Layermune group) compared to the control group ( $p \leq 0.03$ ). Humoral efficacy to protect from SE contamination of egg yolk was only observed in MBL SE4C vaccinated group and only this bacterin administered twice reduced SE shedding rate in inoculated birds and their exposed cagemates ( $p \leq 0.02$ ).

A set of 5 proteins were considered as putative protein candidates to further detailed study on their immunogenicity: Lipoamide dehydrogenase; Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase); Elongation factor Tu (EF-Tu); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and DNA protection during starvation protein.

Overall, the commercial bacterins induced humoral immunity (IgG and IgA antibodies) in laying hens. This immune response partially protected for SE clearance, egg yolks contamination as well as horizontal transmission. In this study, MBL SE4C bacterin appeared to be more efficient in comparison to Layermune for protection of hens with a vaccination protocol comprising two immunizations. Our results provide additional and objective information on the potential of these vaccines for the control of SE in laying hens. Considering the partial protection achieved with the use of these bacterins, the identification of immunogenic antigens could help in the selection of specific proteins to elaborate a more efficient vaccine against SE in poultry.

**Key words:** *Salmonella* Enteritidis, laying hen, egg, bacterin, vaccination, immune response, challenge, immunogenic protein.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
SUMMARY .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	xi
LISTE DES FIGURES .....	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xviii
Chapitre 1. INTRODUCTION .....	1
Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE .....	5
2.1 Revue générale des infections à <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) .....	6
2.1.1 Caractéristiques générales des salmonelles et classification du microorganisme..	6
2.1.2 Infection à SE chez l'humain.....	7
2.1.2.1 Prévalence chez l'humain .....	7
2.1.2.2 Infection à <i>S. Enteritidis</i> chez l'homme .....	9
2.1.2.2.1 Infection chez l'homme à SE liée à la consommation d'œufs .....	9
2.1.2.2.2 Signes cliniques chez les humains .....	9
2.1.3 Infection à SE chez les volailles .....	10
2.1.3.1 Prévalence des infections à SE chez les volailles .....	10
2.1.3.2 Signes cliniques et lésions chez les volailles .....	12
2.1.3.3 Contamination des œufs.....	13
2.1.4 Transmission de <i>Salmonella</i> Enteritidis chez les poules pondeuses.....	14
2.1.4.1 Transmission verticale .....	14
2.1.4.2 Transmission horizontale .....	15
2.1.5 Persistance de SE dans l'environnement .....	17
2.1.6 Méthodes de détection de SE.....	17
2.1.6.1 Méthodes bactériologiques .....	17

2.1.6.1.1	Échantillonnage.....	17
2.1.6.1.2	Analyses bactériologiques .....	18
2.1.6.2	Détection sérologique .....	19
2.2	Pathogénie et virulence de SE.....	19
2.2.1	Structure antigénique .....	19
2.2.1.1	Lipopolysaccharide .....	19
2.2.1.2	Antigène O .....	21
2.2.1.3	Antigène flagellaire (Ag H) .....	21
2.2.1.4	Antigène de virulence (Ag Vi).....	22
2.2.1.5	Protéines de la membrane externe (OMPs).....	22
2.2.2	Les facteurs de virulence .....	23
2.2.2.1	L'adhésion bactérienne et la mobilité .....	24
2.2.2.2	L'invasion bactérienne.....	24
2.2.2.3	L'infection des macrophages .....	25
2.2.2.4	Adaptation métabolique .....	26
2.2.2.5	Résistance aux composantes de la défense immunitaire non spécifique .....	27
2.2.3	Pathogénie de SE chez les volailles .....	27
2.2.3.1	Colonisation intestinale.....	28
2.2.3.2	Invasion et dissémination.....	29
2.2.4	Les facteurs principaux influençant l'infection à SE chez les volailles.....	30
2.3	La réponse immunitaire suite à l'infection à SE chez les volailles.....	32
2.3.1	Immunité innée .....	33
2.3.1.1	Les hétérophiles .....	34
2.3.1.2	La phagocytose et la survie intracellulaire.....	36
2.3.2	Immunité acquise contre l'infection à <i>Salmonella</i> .....	38
2.3.2.1	L'immunité médiée par les cellules B.....	41
2.3.2.2	L'immunité médiée par les cellules T.....	42



2.3.2.3	Immunité locale .....	45
2.4	Prévention et surveillance des infections à <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	46
2.4.1	Les méthodes de prévention sans vaccination .....	46
2.4.1.1	Biosécurité .....	46
2.4.1.2	Exclusion compétitive.....	46
2.4.2	Vaccination et la réponse immunitaire des oiseaux .....	47
2.4.2.1	Vaccins disponibles contre SE pour les volailles.....	47
2.4.2.2	Les bases scientifiques de la vaccination.....	48
2.4.2.3	La protection croisée entre les différents sérovars lors de vaccination.....	49
2.4.2.4	Vaccins vivants versus vaccins tués.....	50
2.4.2.5	Vaccination contre SE et la réponse immunitaire chez les volailles.....	51
Chapitre 3.	ARTICLE 1.....	61
	Immune response following <i>Salmonella</i> Enteritidis vaccination with two commercial bacterins in laying hens.....	63
Chapitre 4.	ARTICLE 2.....	96
	Effects of <i>Salmonella</i> Enteritidis bacterins vaccination on layers' protection and immune response .....	98
Chapitre 5.	ARTICLE 3.....	134
	Identification of Immunoreactive Antigens of <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	136
Chapitre 6.	CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE.....	171
Chapitre 7.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	174
6.1	Réponses immunitaires .....	176
6.1.1	Réponse immunitaire humorale systémique (IgG) .....	177
6.1.2	Réponse immunitaire humorale locale (IgA).....	186
6.1.3	Réponse immunitaire à médiation cellulaire (IMC) .....	191
6.2	L'effet de la vaccination sur la transmission verticale.....	194
6.3	L'effet de la vaccination sur la transmission horizontale .....	196

6.4 L'identification des protéines bactériennes immunogènes *in vivo* durant l'infection/la vaccination des poules pondeuses..... 197

Chapitre 8. CONCLUSIONS ..... 200

Chapitre 9. BIBLIOGRAPHIE..... 205

ANNEXE..... 245

Article 2. Effects of *Salmonella* Enteritidis bacterins vaccination on layers' protection and immune response ..... 245

## LISTE DES TABLEAUX

### Recension de la littérature

Tableau 1. Les facteurs de virulence de SE classifiés selon leurs fonctions.....	23
Tableau 2. Les vaccins disponibles autorisés au Canada contre SE .....	48

### Article 1

Table I. Intracellular survival of <i>Salmonella</i> Enteritidis in leucocytes following variant immunization protocols in hens, expressed in number of bacteria ( $\times 10^3$ CFU/ml) .....	90
--	----

### Article 2

Table I. Experimental design and number of birds assigned to each group for the experimental infection .....	129
Table II. IgA oviductal response to SE infection in inoculated laying hens as measured with ELISA .....	129
Table III. Percent laying hens with SE positive organs post-inoculation .....	130
Table IV. Percent laying hens with SE positive egg yolks post-inoculation .....	130
Table V. Percent contact-exposed laying hens with SE faecal shedding.....	131
Table VI. Percent contact-exposed laying hens with SE positive organs .....	131
Table VII. Percent contact-exposed laying hens with SE positive egg yolks .....	132

### Article 3

Table 1. Bacterial strains for antigenic extracts.....	163
Table 2. Recognition of SE proteins with sera from SE infected hens related to shedding profiles .....	163
Table 3. Mass spectrometry analysis of immunogenic candidate proteins.....	164

### Annexe

Table I. Clinical signs and lesions observed in SE challenged hens.....	245
Table II. Phagocytosis level of mononuclear cells before challenge .....	246
Table III. Intracellular survival of SE in leucocytes of laying hens one week before challenge 1 (54 weeks of age) and challenge 2 (64 week of age), expressed in number of bacteria ( $\times 10^3$ CFU/ml).....	246

## LISTE DES FIGURES

### Recension de la littérature

Figure 1. Les 15 principaux sérovars de <i>Salmonella</i> de source humaine au Canada.....	8
Figure 2. Transmission de SE chez les poules pondeuses .....	14
Figure 3. Structure du lipopolysaccharide .....	20
Figure 4. Mécanisme de l'invasion de <i>Salmonella</i> médiée par le SST-III.....	25
Figure 5. Colonisation et invasion de la muqueuse intestinale par les salmonelles.....	28
Figure 6. Réponse immunitaire innée contre l'infection à <i>Salmonella</i> .....	34
Figure 7. Réponse immunitaire acquise contre l'infection à <i>Salmonella</i> .....	38
Figure 8. Détail dans le temps des manipulations pour les groupes ayant reçu une seule immunisation (incluant le groupe contrôle).....	59
Figure 9. Détail dans le temps des manipulations pour les groupes ayant reçu deux immunisations (incluant le groupe contrôle) .....	60
Figure 10. Détail dans le temps des manipulations lors des deux infections expérimentales pour tous les groupes .....	60

### Article 1

Figure 1. Detection of antibodies (IgG) in sera of laying hens vaccinated analysed by SE Antibody Test kit (Flockchek SE, Idexx) .....	91
Figure 2. IgA levels in the intestinal mucus of laying hens vaccinated.....	92
Figure 3. IgA levels in the oviductal mucus of laying hens vaccinated.....	93
Figure 4. The CD3/IgM cells ratio after immunization with single immunization (A) and two immunizations (B) .....	94
Figure 5. The CD4/CD8 ratio after immunization with single immunization (A) and two immunizations (B). .....	95

### Article 2

Figure 1. Percent laying hens with SE faecal shedding post-inoculation .....	133
--	-----

**Article 3**

Figure 1. *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (ST), *S. Heidelberg* (SH) and *S. Kentucky* (SK) by Western blot using a pool (PS5) of individual immune sera. .... 167

Figure 2. Comparative pattern analysis of immunoreactive proteins depending on antisera source: sera from experimentally challenged hens (PS1), sera from naturally infected hens (PS2), sera from vaccinated hens (PS3) or a mix (PS5) of sera 1 to 3. .... 168

Figure 3. Comparative pattern analysis of immunoreactive proteins related to shedding profiles. .... 169

Figure 4. Extraction of immunogenic proteins for mass spectrometry identification: SDS-PAGE of whole-cell bacterial proteins of various *Salmonella* serovars ..... 170

**Annexe**

Figure 1. Detection of IgG in sera of laying hens post challenge 1 (A) and 2 (B) ..... 247

**LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

ADN :	Acide désoxyribonucléique
APC :	<i>Antigen-presenting cell</i>
Bp :	<i>Base pair</i>
°C :	Degré celsius; Degree Celsius
CD :	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC :	<i>The Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFU :	<i>Colony forming unit</i>
cm :	Centimètre; <i>Centimeter</i>
CMI :	<i>Cellular mediation immunity</i>
DCFHDA :	<i>2',7'-dichlorofluorescein-diacetate</i>
DNA :	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
D-PBS :	<i>Dulbecco's phosphate buffer saline</i>
D-PBS-G :	<i>D- Phosphate buffer saline- Glucose</i>
EFSA :	<i>Autorité Européenne de Sécurité des Aliments</i>
ELISA :	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS :	<i>Fetal calf serum</i>
FITC :	<i>Fluorochrome Fluorescein Isothyocyanate</i>
FSC :	<i>Forward scatter</i>
GALT :	<i>Gut –associated lymphoid tissues</i>
HBSS :	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HMM :	<i>High molecular mass</i>
HMWP :	<i>High molecular weight plasmid</i>
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i>

IFN :	<i>Interferon</i>
Ig :	<i>Immunoglobuline</i>
IL :	<i>Interleukine</i>
Kb :	<i>Kilobase</i>
kDa :	<i>Kilodalton</i>
KV:	<i>Killed vaccine</i>
LB :	<i>Luria-Bertani Muller Broth</i>
LMHP :	<i>Low molecular weight plasmid</i>
LPS :	<i>Lypopolysaccharide</i>
LT :	Lysotype
M :	Molaire
MALT :	<i>Mucosa-associated lymphoid tissues</i>
mg :	Microgramme
MHC :	<i>Major histocompatibility complex</i>
min :	Minute
ml :	Millilitre
mM :	Millimolaire
MNC:	<i>Mononuclear cells</i>
NaCl :	Chlorure de sodium
NB :	<i>Nutrient broth</i>
nm :	Nanomètre
OD :	<i>Optical density</i>
PBS:	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH :	<i>Potential hydrogen</i>

PMA :	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMN :	Polymorphonucléaire
PP :	Plaques de Peyer
PT :	<i>Phage type</i>
PVDF :	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RNA :	<i>Ribonucleic acid</i>
R-PE:	<i>R-phycoerythrin</i>
RV:	<i>Rappaport Vassiliadis</i>
SDS-PAGE :	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE PT4:	<i>Salmonella Enteritidis phage type 4</i>
SPI :	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
SSC :	<i>Side scatter</i>
SST :	Système de sécrétion de type
TCR :	<i>T-cell receptor</i>
µg :	Microgramme
µm :	Micromètre
µM :	Micromolaire
U :	<i>Unit</i>
UV :	Ultraviolet
V :	Volt
v/v :	<i>Volume to volume</i>
w/v :	<i>Weight/volume percentage solution</i>



*À Minh, mon trésor*

*Pour ton amour et ton courage*

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé ou contribué de près ou de loin à ce projet et je vous remercie également pour tous les encouragements reçus.

Je souhaite exprimer mes remerciements en particulier à :

Ma directrice de recherche, Dre Martine Boulianne, pour m'avoir acceptée comme étudiante et pour son support, son appui, ses encouragements et sa confiance. Merci aussi pour ta très grande disponibilité, malgré tes nombreuses occupations et pour ta compréhension, ta patience, afin de trouver des mots français convenables ...

Mon co-directeur, Dr Sylvain Quessy, pour son appui, la confiance qu'il m'a témoignée, ses précieux conseils, sa très grande disponibilité. Merci de m'avoir amenée à découvrir des nouvelles connaissances pendant ces années d'études.

Ma co-directrice, Dre Ann Letellier, pour m'avoir accepté comme étudiante dans son laboratoire, pour son appui, sa très grande disponibilité ainsi que ses conseils. Merci aussi pour ton amitié et ta compréhension.

L'équipe de la CRSV, spécialement Annie Desrosiers, Hélène Bergeron, Sylvette Laurent-Lewandowski, Nadia Bergeron, Alexandre Thibodeau, Mathieu Bélanger, Bénédicte Bouchet, Manon Tremblay, Karine Giguère, Guillaume Larivière-Gauthier, Philippe Fravallo, Valérie Normand, Louise Lessard et Sophie Lachambre pour leur aide immense, leur amitié et leur support moral ...

Tous les étudiants et stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces années ...

Les membres du GREMIP pour les activités scientifiques et sociales que nous avons eues au cours de mes études.

Aux membres du jury lors de l'examen pré-doctoral et les membres du jury qui vont prendre le temps de lire ma thèse.

La Fédération des Producteurs d'Œufs de Consommation du Québec (Québec Egg Board), Les Producteurs d'œufs du Canada et Le Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec pour leur soutien et leur appui financier.

Minh, mon étincelle, ma motivation pendant ces années ...

Ma famille, pour la confiance et la fierté qu'ils me témoignent depuis toujours.

## **Chapitre 1. INTRODUCTION**

Au point de vue de la santé publique, les infections causées par *Salmonella enterica* sont considérées des maladies infectieuses communes chez les animaux et chez les humains. Depuis 1987, *Salmonella enterica* serovars Enteritidis (SE) a été une des sérovars majeurs isolés dans des cas de toxi-infections alimentaires dans plusieurs pays (230). Au Canada, les infections à *Salmonella* se classent au deuxième rang sur le plan de la fréquence. Cinquante-deux pourcent de toutes les infections chez les humains ont été causées par les trois sérovars suivants : *S. Enteritidis* (SE) (23 %) *S. Typhimurium* (17 %), et *S. Heidelberg* (12 %). Cependant, depuis 2002 le nombre d'isolements de SE est en progression au Canada, celui-ci étant le sérovar le plus courant dans plusieurs provinces (211).

Les toxi-infections alimentaires causées par SE sont le plus souvent liées à la consommation d'œufs et d'ovo-produits (38) et dans ces cas, ce sont des poules pondeuses infectées qui sont à la source de tels épisodes (99). Au cours des dernières années, et ce malgré le programme québécois de surveillance et d'éradication pour SE chez la poule pondeuse, le nombre de troupeaux trouvés infectés au Québec fut plus élevé qu'à l'habitude. Ainsi, alors qu'un seul troupeau de 30,000 poules pondeuses, avait été trouvé positif à SE en 2003, ce nombre a grimpé à 4 troupeaux, représentant 100,000 pondeuses, positifs à SE à l'automne 2004. Cet épisode fut la conséquence de contamination croisée entre la filière des poulets de chair et les pondeuses commerciales via le transport (164). Il ne va pas sans dire que ces épisodes, tout en étant très coûteux pour l'industrie, sont sources de stress pour les producteurs affectés. Ceux-ci doivent se soumettre à diverses mesures sévères de biosécurité, adopter un protocole de lavage et désinfection extraordinaire, contrôler les rongeurs, retester à répétition l'environnement et le troupeau suivant pour le dépistage de SE.

Malheureusement, l'expérience nous démontre qu'il y a près de 50% de chance pour que le prochain troupeau de poules soit aussi positif à SE et ce, malgré toutes les précautions prises. Comme il a été démontré que la vaccination diminue le risque d'obtenir des œufs positifs d'oiseaux exposés à SE (104, 276, 277), la Fédération des producteurs d'œufs de consommation du Québec (FPOCQ) désirerait ajouter la vaccination au programme de prévention pour les troupeaux précédemment affectés par SE.

Cependant, un problème que peuvent rencontrer les producteurs utilisant la bactérine contre SE est la forte réaction tissulaire que les poules peuvent expérimenter suite à la vaccination. Cette réaction entraîne de la douleur, une baisse de consommation alimentaire, une perte d'uniformité du troupeau en poids et un retard dans la mise en ponte pouvant aller jusqu'à deux semaines, et donc la perte de revenus de plusieurs œufs par poule par troupeau (37). Suite à ces divers problèmes, plusieurs producteurs ne vaccinent qu'une seule fois et ce, plusieurs semaines avant le début de la ponte, soit à 16 semaines d'âge. Une étude en ferme commerciale a cependant démontré qu'un protocole à une seule vaccination avec une bactérine commerciale ne protégeait que partiellement les oiseaux contre l'infection à SE (64). Par ailleurs, les niveaux de protection des organes des poules vaccinées deux fois ne sont statistiquement pas différents des contrôles non-vaccinés (64). Cependant, les données actuellement disponibles quant à l'efficacité et à la protection offerte par ces vaccins portent sur un protocole avec deux immunisations (10, 104, 186, 193, 276). Ainsi, la prévention contre une contamination à SE est critique si l'on veut inciter le consommateur québécois à continuer à consommer des œufs frais en coquille. Le programme québécois de surveillance et d'éradication de SE chez la poule pondeuse est unique

en Amérique du Nord et fait l'envie de plusieurs provinces et états. Il est donc important de vérifier l'effet du protocole de vaccination et de deux bactérines sur la charge SE de l'œuf et de divers organes de la poule lors d'infection survenant durant la ponte. Ces données permettront de pouvoir continuer à assurer la qualité et l'innocuité de l'œuf en coquille québécois au consommateur et de vanter les mérites de ce programme de surveillance et de détection de SE, et ce même en présence d'un environnement positif à SE.

Cette thèse comparera l'efficacité de deux vaccins commerciaux et de deux protocoles de vaccination à protéger les poules pondeuses contre l'infection à SE. De plus, nous évaluerons la capacité de ces vaccins à parvenir à protéger les poules pondeuses et leurs œufs destinés à la consommation, après une seule vaccination à 16 semaines d'âge ou 2 vaccinations à 12 et 18 semaines d'âge et lors d'exposition à cette bactérie à différents stades tardifs de la production (55 semaines et 65 semaines). Cette thèse portera également sur la détermination des principaux épitopes externes de nature protéique de SE au cours de l'infection afin de développer prochainement des vaccins efficace contre SE chez les poules pondeuses.

## **Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE**



## 2.1 Revue générale des infections à *Salmonella* Enteritidis (SE)

### 2.1.1 Caractéristiques générales des salmonelles et classification du microorganisme

Appartenant à la grande famille des *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* est une bactérie intracellulaire facultative, à Gram négatif, asporulée, mobile grâce à des cils péritriches. SE est subdivisé en 27 lysotypes ou types phagiques qui expriment différents niveaux de virulence chez les animaux domestiques, l'humain et dans l'environnement (269). SE croît sur gélose nutritive, caractérisée par la fermentation du glucose, avec une production de gaz et d'acide ainsi que la réduction des nitrates en nitrites (109).

Plus de 2500 sérovars de *Salmonella enterica* ont été identifiés. Les salmonelles comprennent deux espèces (*S.bongori* et *S.enterica*) et six sous-espèces (154). Des sous-espèces sont divisées en sérovars selon la structure du flagelle, des carbohydrates et des lipopolysaccharides (LPS) (54).

Au cours des dernières années, des tests biomoléculaires ont permis de classer les *Salmonella* en trois catégories ou groupes (114). Le groupe 1 : des sérovars adaptés spécifiques à l'hôte, restrictifs et invasifs (*S. pullorum*, *S. gallinarum* chez la volaille, *S. typhi* chez l'humain), le groupe 2 : vingt sérovars sans hôte spécifique, adaptés et invasifs (*S. Typhimurium*, *S.Hadar*, *S. Arizonae* et *S.Enteritidis*) et le groupe 3 : des sérovars sans hôte spécifique adaptés et non invasifs.

Bien que la plupart des sérovars puissent infecter de nombreuses espèces animales, chaque espèce animale est associée à des sérovars spécifiques et la volaille n'y fait

pas exception. Le sérovar SE appartient à l'espèce *Salmonella enterica*. Avec *Salmonella* Typhimurium (ST), SE est responsable de la majorité des entérites causée par les salmonelles chez les humains (159).

### 2.1.2 Infection à SE chez l'humain

#### 2.1.2.1 Prévalence chez l'humain

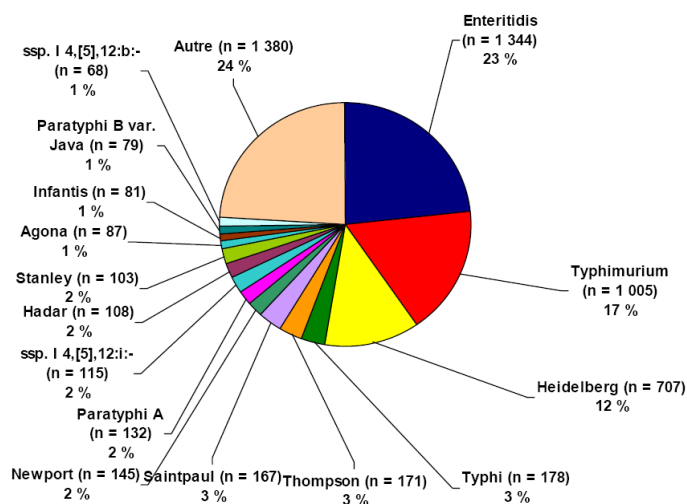
Des données provenant de 27 pays en 2007 ont confirmé que la prévalence de SE était plus élevée (43,1 %) par rapport à celle de ST (21,6 %) (212). En Europe, au cours des dernières années, les deux sérovares les plus courants de *Salmonella* étaient SE et ST qui représentaient 81 % de tous les sérotypes identifiés dans les cas humains en 2007 (74). L'infection à SE aux États-Unis représente environ quatre cas par 100 000 habitants (111) et a été classée au second rang, causant 16,3% des cas de salmonelloses humaines en 2006 (46).

Au Canada, le lysotype (LT) 13 a déjà été associé à une septicémie et de la mortalité chez des poulets. Le LT14 et le LT13 sont les lysotypes prédominants, représentant chacun environ 24 % de tous les isolats de SE trouvés chez les humains (211). Les souches de SE appartenaient à 15 profils plasmidiques (PP) dont un plasmide de 36 mégadalton (MDa) était présent chez 97 % des souches (217). SE, ST et *S.* Heidelberg (SH) demeurent les sérovares les plus isolés chez les cas humains en 2006, SE étant le plus courant (23 %, n=1344) (Figure 1) (211). En effet, il a surpassé ST et SH en 2005, et est maintenant le sérovar le plus prévalent chez les humains pour une deuxième année consécutive (2005-2006).

En ce qui concerne la distribution provinciale et territoriale, SE est actuellement le sérovar le plus courant dans toutes les provinces et territoires. Les proportions les

plus importantes d'isolats de *Salmonella* caractérisés comme étant SE ont été enregistrées dans l'ordre en Ontario (25%), Saskatchewan (26%) et Québec (19%) (211).

Figure 1. Les 15 principaux sérovars de *Salmonella* de source humaine au Canada



\*Les nombres totaux de sérovars correspondent aux isolats de *Salmonella* confirmés en laboratoire, d'après les données transmises au PNSME, auxquelles s'ajoutent les identifications fournies par les services de référence du LNM. Les nombres totaux incluent les isolats de souches responsables d'éclotions.

L'incidence par province/territoire de SE étaient compris entre 0 et 6,22 (médiane : 3,34 cas pour 100000 habitants-année) (214). La distribution nationale du taux de l'infection humaine à SE (cas/100000 population) était  $\geq 4$  au cours de quatre dernières années (2005-2008). De plus, les cas humains positifs à SE ont augmenté à près 6% selon des données préliminaires en 2008 (181).

### 2.1.2.2 Infection à *S. Enteritidis* chez l'homme

#### 2.1.2.2.1 *Infection chez l'homme à SE liée à la consommation d'œufs*

Les cas humains de toxi-infection alimentaires à SE sont fréquemment liés à la consommation des œufs ou des ovo-produits (75, 182). Selon le Center for Disease Control and Prevention (CDC, USA), chaque année aux Etats-Unis, environ 50000 à 100000 des infections à SE sont attribuées à des œufs (38). Les toxi-infections ont été associées à la consommation des œufs crus ou insuffisamment cuits dans des épisodes à SE (38).

#### 2.1.2.2.2 *Signes cliniques chez les humains*

L'apparition des signes cliniques d'une toxi-infection alimentaire à SE sont précédés par une période d'incubation de quelques heures à 72 heures. La maladie persiste de 4 à 10 jours. Les symptômes communément observés sont la diarrhée, le mal de tête, les crampes abdominales, la nausée, la fièvre et des vomissements. La septicémie n'est pas observée chez les patients sous-cliniques, mais ceux-ci peuvent éventuellement développer diverses séquelles telles que la péricardite, les maladies neurologiques et neuro-musculaires, les arthrites et/ou les ostéomyélites. Les dommages à la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon peuvent entraîner de la malabsorption. La déshydratation sévère et la diarrhée sanguinolente sont généralement observées chez l'enfant (12).

### 2.1.3 Infection à SE chez les volailles

#### 2.1.3.1 Prévalence des infections à SE chez les volailles

En Europe, SE a été le sérovar dominant détecté chez les poules pondeuses et leurs œufs en 2002. Pendant deux années consécutives (2004 et 2005), SE a été le sérovar le plus fréquemment isolé à partir des échantillons environnementaux des troupeaux de pondeuses (52,3%) par rapport à d'autres isolats appartenant aux autres sérotypes (72). Récemment, la prévalence de SE et ST dans les troupeaux de pondeuses a augmenté: passant de 0,5 % en 2005, 2,3 % en 2006) à 3,2 % en 2007 (76). Dans plusieurs pays, la prévalence des troupeaux positifs à SE varie entre 1,5% et 37% de 2000 à 2002 (75).

Aux États-Unis, la présence de SE a été détectée dans 35% des troupeaux de pondeuses à la fin de la période de ponte, à partir d'échantillon de caecum prélevés dans des abattoirs du nord de ce pays (71). La prévalence de contamination environnementale à SE a été de 7,1 % pour 200 fermes des poules pondeuses dans 15 états (94). Également, une étude portant sur 91% des poulaillers de la Californie (cet état représente la majorité de la production d'œufs aux É.U) a démontré une prévalence de 10,5 % des troupeaux positifs (45). La contamination environnementale à SE est fréquente lors des prélèvements des courroies d'œufs (48%), des monte-charges (45%), des passages (18%) et des fumiers (17%) (87). Parallèlement, les prélèvements positifs à SE a été détectés chez les poulettes au sol (0,46%, 8/1722 échantillons) et les poulets à griller (0,26%, 124/47090 échantillons) (166).

Au Canada, SE se classe au 4<sup>e</sup> rang des isolats de *Salmonella* provenant de sources non humaines. Son taux d'isolement, qui était de moins de 1% en 2002, était de 7% en 2006 (211). En outre, SE chez le poulet à griller a aussi connu une hausse marquée au cours des cinq dernières années, passant d'un peu moins de 1% en 2002 à 13% en 2006 dans les prélèvements de caecum à l'abattoir (211). En parallèle, cette augmentation a été observée toujours chez les poulets à griller (prélèvements du duvet pris au couvoir) avec les augmentations successives observées au cours des 3 dernières années (2006 : 20%, 2007 : 30% et 2008 : 40% de pourcentage des cultures positif) (181).

Au Québec, lors de la compilation des tests de dépistage de salmonelles en 2004, le pourcentage des pondoirs positifs à SE était de 2,26% parmi des pondoirs positif à tous les sérovars de *Salmonella* (89). Entre les mois d'août et d'octobre 2004, quatre élevages de poules pondeuses de la région de Québec ont été trouvés positifs à SE dans le cadre du programme de surveillance de la FPOCQ. Parallèlement à cette éclosion, le Laboratoire de santé publique du Québec signalait presque au même moment une augmentation des cas d'infection humaine à SE. L'enquête de santé animale a démontré que la bactérie avait aussi été isolée dans deux couvoirs en avril et en août 2004, ceci dans le cadre du programme de dépistage de la pullorose et de la typhose aviaire de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). Les échantillons positifs avaient été prélevés sur des résidus d'éclosion d'œufs importés des États-Unis et destinés à la production de poulets de chair. L'enquête épidémiologique effectuée conjointement par le Centre québécois d'inspection des aliments et de santé animale (CQIASA) et la FPOCQ a permis de mettre en évidence de nombreux points de contamination croisée possibles entre l'industrie de la ponte et

celle du poulet de chair, ce qui a pu mener accidentellement à l'introduction du pathogène en cause dans certains élevages de pondeuses. À l'intérieur de la filière ponte, l'infection a pu être transmise par l'échange de matériel d'emballage contaminé et insuffisamment nettoyé et désinfecté d'un producteur à l'autre par l'intermédiaire du classificateur ou du transformateur (165).

### 2.1.3.2 Signes cliniques et lésions chez les volailles

Les jeunes oiseaux infectés par SE présentent une morbidité et une mortalité pouvant être sévères, tandis que cette infection chez les oiseaux plus âgés peut être silencieuse. Les bactéries colonisent l'intestin et par la suite se disséminent dans les organes internes (111). Keller (1995)(142) n'ont observé ni mortalité ni signe clinique après l'infection expérimentale par la voie orale des poulets de 23-25 semaines d'âge avec une dose de  $10^8$  CFU /oiseau de SE. Cependant, les signes cliniques causés par l'infection à SE LT4 sont observés le plus souvent chez des jeunes oiseaux avec une morbidité d'environ 20% (176). Dans cette étude, les signes cliniques observés étaient les suivants: anorexie, adypsie, dépression, somnolence, déshydratation et diarrhée blanchâtre. À l'examen post-mortem, on retrouve fréquemment une splénomégalie, hépatomégalie, de la nécrose et des pétéchies au foie et à la rate, une périhépatite et péritonite, de l'entérite, voire de la typhlite (57, 108, 176, 222). Les poules pondeuses ne présentent de la mortalité que très occasionnellement et des signes cliniques modérés tels qu'une dépression légère et une faible diarrhée de courte durée (trois jours après l'infection à SE) (148). SE peut aussi entraîner une chute de ponte (10-30%) chez les oiseaux de 27 à 62 semaines d'âge après l'infection orale (97). En outre, la chute de ponte peut persister jusqu'à 4 semaines chez les poules pondeuses expérimentalement infectées avec une dose orale

de  $10^5$  organismes (18). Néanmoins, cette perte de production n'est pas constante, les troupeaux infectés naturellement ou expérimentalement (avec une dose de  $10^6$  CFU) à SE pouvant aussi maintenir une courbe de ponte similaire à celle de troupeaux sains (238).

### 2.1.3.3 Contamination des œufs

Des rapports annuels des pays européens ont cité que les œufs et les ovo-produits sont une source fréquente d'éruptions épidémiques causée par SE (72, 75). La prévalence globale de la contamination d'œuf à *Salmonella* était 0,8% en 2006. Cependant plus de 90 % de ces œufs ont été positifs à SE. Une éruption épidémique nationale de SE en 2000 en Grande-Bretagne a été rapportée et fut associée à l'importation d'œufs de l'Espagne dont 5,6% (sur un total de 11718 coquilles d'œufs testés) ont été positifs à *Salmonella spp* (107). Néanmoins, le dépistage de troupeaux de pondeuses avec une forte prévalence de SE a démontré que la fréquence de contamination des œufs individuels est faible. En effet, on estime aux États-Unis que la fréquence de contamination moyenne pour SE est de 1 œuf par 20,000 œufs (71). De plus, la fréquence de la contamination des œufs dépend de l'intensité de l'infection intra-troupeau et du moment de la production de l'œuf relative à l'infection. Le pourcentage des œufs positifs à SE a été de 0,6% dans une étude sur des œufs provenant des 15 troupeaux de pondeuses (n= 5700 oiseaux) naturellement infectés (134). Au Canada, la prévalence de contamination des œufs à SE fut inférieure à 0,06% dans deux troupeaux de pondeuses naturellement infectés à SE (219). Les échantillons qui contenaient des œufs craqués et sales ont été plus souvent contaminés par *Salmonella spp.* que tous les autres types d'échantillons d'œufs. Dans

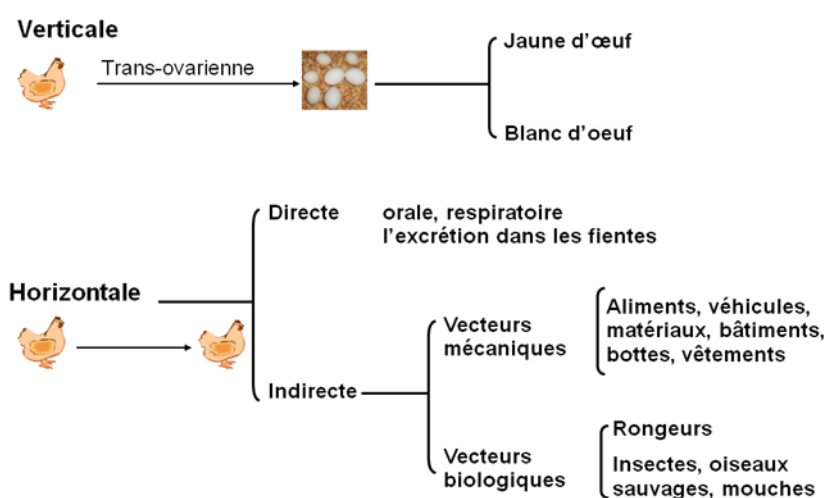


son ensemble, le taux de contamination des oeufs de consommation par *Salmonella* spp. a varié de 0,07 à 0,4 % en 1998 (218).

#### 2.1.4 Transmission de *Salmonella* Enteritidis chez les poules pondeuses

La transmission et la dissémination de SE se font par deux voies : la voie verticale et la voie horizontale (Figure 2).

Figure 2. Transmission de SE chez les poules pondeuses



##### 2.1.4.1 Transmission verticale

La transmission verticale primaire se fait directement par la transmission ovarienne, par le passage à travers l'oviducte ou par le contact avec le péritoine ou le sac aérien infectés. La transmission verticale secondaire se produit par la contamination des contenus d'œufs et des coquilles d'œuf par la voie cloacale, entraînant la pénétration des salmonelles dans les œufs (114). Une poule pondeuse infectée pourrait pondre un œuf sur 200 qui sera infecté par SE (187). Le mécanisme de la transmission trans-ovarienne a été identifié par Thiagarajan et coll., (1994) (249). Ainsi SE ciblerait plus

spécifiquement les cellules de la granulosa des ovaires et leur invasion permettrait la multiplication bactérienne dans l'ovaire.

Au cours des dernières années, la vaccination et l'application de strictes mesures d'hygiène ont pu réduire la prévalence de la contamination chez des troupeaux primaires. Ceci a aussi contribué à la réduction de la transmission verticale de SE.

#### 2.1.4.2 Transmission horizontale

Le poulailler est un lieu idéal où les salmonelles peuvent survivre et se multiplier sur une longue période (62, 111). Le vide sanitaire a été associé à la réduction de risque de l'infection (94). Par contre, cette mesure ne prévient malheureusement pas à elle seule les infections à SE entre chaque troupeau (62, 83). Le couvoir est fréquemment une des sources majeures de la transmission horizontale car un œuf ou un poussin contaminé par *Salmonella* peut à son tour transmettre la bactérie aux autres œufs et poussins présents dans le même incubateur ou éclosier. Ce pathogène alors peut se disséminer par voie aérienne, par le biais de gouttes ou de particules de poussières. Ce type de transmission est également observé dans les élevages (102, 191).

Sur le terrain, la bactérie est transmise horizontalement à la ferme soit par le contact direct entre les oiseaux infectés et les oiseaux sains, soit par le contact avec l'environnement contaminé du poulailler (matières fécales, aliment, litière, eau, équipement, poussière). La colonisation intestinale des salmonelles est une source fréquente de la contamination de l'environnement car les oiseaux porteurs peuvent excréter des bactéries de façon intermittente au moins 28 semaines post-infection (194). En conditions contrôlées, suite à un contact direct avec des poules oralement inoculées avec SE, les oiseaux infectés expérimentalement par contact après 5

semaines d'exposition, ont démontré des pourcentages d'infection à SE suivant dans les différents organes : caecum (43%), foie (36%), rate (36%), oviducte (21%) et ovaire (7%) (97). Nakamura et al., (1993) (194) ont rapporté que l'excrétion intermittente des salmonelles dans les fèces persiste plus de 28 semaines chez les oiseaux infectés.

Une autre source fréquente d'infection par les salmonelles est l'aliment. La prévalence de la contamination dans l'aliment peut varier de 3 à 9 % (39, 115). Une bonne compréhension des modes de transmission horizontale permet de prévoir et de prévenir les infections à *Salmonella* pour les nouveaux troupeaux. Cependant, le nettoyage et la désinfection seuls peuvent être insuffisants pour l'élimination de ce pathogène dans les élevages alors les mesures de biosécurité doivent être combinées au programme de l'éradication (264).

En effet, une des principales difficultés pour l'élimination de ce pathogène sur le terrain est la diversité des réservoirs, tels que les humains, les animaux de compagnies, les pigeons, les oiseaux aquatiques et les oiseaux sauvages. Les rongeurs et les insectes sont aussi d'importants réservoirs (147, 206). Les rongeurs sont considérés comme des porteurs qui excrètent par intermittence des salmonelles dans les fèces, et ces dernières contaminent alors l'environnement de l'élevage. Dans une étude de Henzler et Opitz (1992) (123), une souris peut excréter en moyenne  $2,3 \times 10^5$  salmonelles par fèces. Ce nombre bactérien est suffisant pour infecter une poule adulte. En fait, les poulaillers positifs à SE ont eu un taux de souris positif à SE près de 4 fois plus important que celui des poulaillers négatifs (94). C'est probablement pourquoi la présence de population de souris infectées à SE est directement associée à la contamination des œufs (63, 112, 122, 123). Donc, l'application de mesures pour

contrôler la présence des rongeurs contribue à la diminution de SE dans le poulailler (122). Idéalement, le poulailler devrait être exempt de rongeurs, être propre et posséder une ventilation adéquate afin de réduire le niveau de poussière pouvant favoriser la dissémination des bactéries (126, 133).

### 2.1.5 Persistance de SE dans l'environnement

SE persiste dans la litière plus de 9 mois (111), dans les fientes sèches et l'aliment jusqu'à 26 mois et dans les prélèvements de sol jusqu'à 8 mois après la dépopulation des oiseaux infectés d'une ferme (62). Cette bactérie a été expérimentalement détectée pour une période de 2 ans dans les aliments contaminés avec une dose de  $10^5$  salmonelles/100g d'aliments (63). Dans une étude, un total de 152 pondoires (ceux-ci ont été positifs à SE entre 1998 et 2007) a été suivi pour la persistance des sérovars de *Salmonella* dans les bâtiments. Ainsi, SE persiste au moins 15 mois dans les bâtiments lorsque des rongeurs sont présents dans l'environnement (40). Au Québec, le suivi diagnostique d'un lot de pondeuse au début de ponte (23 semaines d'âge) a confirmé la persistance de SE jusqu'à 49 semaines d'âge (164).

### 2.1.6 Méthodes de détection de SE

#### 2.1.6.1 Méthodes bactériologiques

##### 2.1.6.1.1 Échantillonnage

L'analyse bactériologique peut être effectuée à partir d'échantillons d'oiseaux (fèces, écouvillons cloacaux, organes et œufs) ou les échantillons environnementaux (poussières, litière...). Les méthodes bactériologiques donnent des informations sur le statut courant des oiseaux si le niveau d'excrétion des salmonelles des oiseaux permet

d'être détecté selon l'échantillonnage et la méthode d'analyse (208). Ces méthodes sont généralement utilisées pour le diagnostic des troupeaux récemment infectés, lorsque la fréquence de l'excrétion fécale est élevée. Cependant, si quelques oiseaux excrètent des salmonelles de façon intermittente, on doit augmenter la taille de l'échantillonnage ou encore modifier le type d'échantillonnage. De plus, il a été démontré que l'excrétion des salmonelles peut être réduite chez des troupeaux vaccinés (60). En général, si la prévalence à l'intérieur du troupeau est faible, un plus grand nombre d'échantillons devrait être prélevé afin d'évaluer le statut. Par exemple, on suggère 60 prélèvements pour détecter une prévalence de 5% et plus (75). Idéalement, afin d'augmenter la sensibilité de détection, on peut remplacer les prélèvements individuels (fécaux ou cloacaux) par des prélèvements de l'environnement tels des pédichiffonnettes ou chiffonnettes. Ainsi on estime que 5 paires de pédichiffonnettes ont la même sensibilité de détection que 300 échantillons fécaux (12 pools de 5) (240).

#### 2.1.6.1.2 *Analyses bactériologiques*

La présence de plusieurs bactéries compétitives est un des facteurs majeurs limitant dans l'isolement des salmonelles à partir des prélèvements fécaux et environnementaux (41). La détection bactériologiques des salmonelles demande 4 étapes successives : (1) pré-enrichissement dans le milieu liquide non-sélectif (2) enrichissement sur le milieu sélectif (3) ensemencement sur l'agarose sélectif et (4) identification (207). À côté des méthodes de culture traditionnelles, il existe aussi d'autres méthodes alternatives, telles que les techniques de PCR (66, 141, 268), les

techniques de PCR en temps réel (157, 199), soit la méthode qualitative ou la méthode quantitative.

#### 2.1.6.2 Détection sérologique

Lors d'une infection à SE, le système immunitaire répond par la production d'anticorps envers les déterminants antigéniques. En fait, les déterminants antigéniques de *Salmonella* spp. sont les éléments de structure à la surface de la paroi cellulaire bactérien (LPS, OMP) et les protéines structurales du flagelle. Tous sont capables de stimuler la production des anticorps au cours de l'infection (174, 250, 266, 278). Plusieurs tests basés sur le LPS ou la flagelline sont commercialement disponibles (75). Les anticorps peuvent être détectés le plus tôt une semaine après l'infection (280) dans le sérum des oiseaux infectés, le pic de production des anticorps a été observé à 2 semaines post – infection (28, 69, 266). Les méthodes sérologiques peuvent être utilisées parallèlement avec les analyses bactériologiques afin d'augmenter la sensibilité de détection. En raison de la dynamique de l'infection, de l'irrégularité dans l'excrétion, la détection des bactéries n'est pas toujours facile chez les troupeaux infectés, tandis que la réponse d'anticorps peut persister pour plusieurs mois et indique donc que l'oiseau a été infecté par SE (75).

### 2.2 Pathogénie et virulence de SE

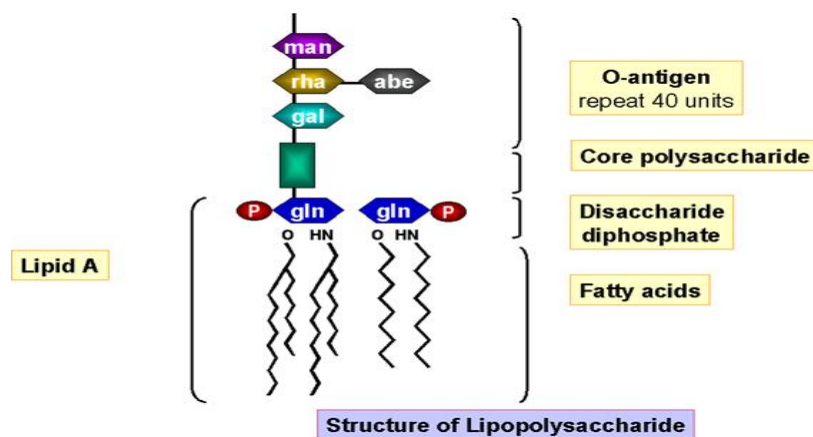
#### 2.2.1 Structure antigénique

##### 2.2.1.1 Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) sur la membrane externe de la bactérie à Gram négatif est fait du lipide A, de l'oligosaccharide basal et des chaînes spécifiques O-

polysaccharides (Figure, Adapté de Paul, 2005) (210). Le LPS est considéré comme une substance qui peut modifier ou moduler une réponse immunitaire (121).

Figure 3. Structure du lipopolysaccharide



Le lipide A (endotoxine) a une activité biologique potentielle qui est capable d'entraîner des effets patho-physiologiques, tels que le choc endotoxique, le pyrogénicité, l'activation du complément, les changements de la coagulation et des changements hémodynamiques. Le lipide A contribue à la pathogénie et à l'activité toxique des *Salmonella*.

L'influence de la structure chimique du LPS sur la pathogénie de *Salmonella* a été mentionnée dans des différentes études. La présence ou absence de la chaîne O détermine si le LPS est considéré être lisse (la chaîne O est complète) ou rugueux (réduction ou absence de la chaîne O). Au Canada, l'étude de Poppe (1993) (217) a démontré que la plupart des souches isolées à partir de volailles et de leur environnement (36 sur 41) avaient un LPS lisse. L'analyse de la constitution des sucres de la chaîne O, quatre types de la chaîne O ont été associés à SE et ST. Les isolats de SE qui produisent le type « glucosylated high molecular mass (HMM) LPS » sont associés à la contamination des œufs. Approximativement 40% des

isolats de *Salmonella* isolés à partir des œufs et 10% des isolats de *Salmonella* isolés à partir des rates des souris infectés naturellement produisent le « glucosylated HMM LPS » (59).

La virulence des souches varie en fonction de la composition isogénique de la chaîne O. Ainsi, la souche de *S. Montevideo* possédant l'antigène (O6,7) est moins virulente, tandis que *S. Typhimurium* (antigène somatique O4, 12) est plus virulente et SE (O9, 12) est moyennement virulente (260).

#### 2.2.1.2 Antigène O

Le système utilisé pour différencier des sérovars de *Salmonella* est basé sur la structure des chaînes polysaccharide O antigénique couplée à la détermination de la spécificité sérologique de l'antigène H (flagelle) afin de grouper des souches de *Salmonella* (White-Kauffmann-Le Minor). L'antigène O est un antigène de la paroi. Les antigènes O sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS). L'antigène O possède des propriétés immunes, c'est un complexe contenant un polysaccharide et un composé phospholipidique (234). La constitution de l'antigène O est importante dans l'interaction initiale avec les cellules phagocytaires de l'hôte, particulièrement pour échapper aux défenses innées de l'hôte (234).

#### 2.2.1.3 Antigène flagellaire (Ag H)

L'antigène H est un polymère de flagelline (protéine de structure des flagelles). Les flagelles existent sous deux formes antigéniques qualifiées de phase 1 et de phase 2 alors les antigènes H sont diphasiques (109). Pour SE, l'antigène H est qualifié de monophasique (phase 1 : g,m). La flagelline est une protéine du flagelle, son poids moléculaire est environ 58,4 kDa (174). Les recherches ont montré que la flagelline



élicite les réponses immunitaires innées contribuant à la prévention de la colonisation des salmonelles à la surface muqueuse de l'hôte. Cette protéine est extraite en forme relativement pure à partir de la surface des salmonelles. La flagelline (g, m) est utilisée commercialement pour l'analyse sérologique parce que la production de cet antigène est relativement facile. Ceci permet de distinguer de l'infection à SE et celles d'autres souches de *Salmonella* (174).

#### 2.2.1.4 Antigène de virulence (Ag Vi)

C'est un antigène capsulaire et il a été identifié chez trois types de sérovars : Typhi, Paratyphi C et Dublin. Cependant, toutes les souches de ces sérovars ne possèdent pas forcément cet antigène (215). Cet antigène est considéré comme un antigène de surface, il est distinct de l'antigène somatique et de l'antigène flagellaire.

#### 2.2.1.5 Protéines de la membrane externe (OMPs)

SE contient généralement trois protéines majeures dans sa membrane externe : OmpC (36 kDa), OmpF (35 kDa) et OmpA (33 kDa). L'expression de OMP chez SE peut être influencée significativement par des conditions de croissance de la bactérie (48). Par exemple, sous certaines conditions de culture, SE exprime la protéine OmpE (35,5 kDa). Autrement, la croissance de SE sous condition de restriction ferrique induit l'expression des OMPs additionnelles : 74, 78 et 81 kDa (48). Une étude canadienne (217) portant sur 318 souches de SE isolées au Canada principalement à partir des volailles et de l'environnement a démontré que 35 souches sur 36 souches possédaient le même profil de OMP (42, 40 et 37 kDa). Les vaccins à base d'OMPs induisent une plus forte réponse d'anticorps que les vaccins à base de bactéries

entières. Ceci peut indiquer que les OMPs contiennent les protéines majeures immuno-dominantes (179).

### 2.2.2 Les facteurs de virulence

L'évolution de la maladie est liée à l'action entre des facteurs de virulence et à la réponse immunitaire de l'hôte. L'expression des facteurs de virulence dépend des sérovars de *Salmonella* et de l'hôte. Ces facteurs de virulence peuvent être encodés par le matériel génétique sur le chromosome, par les bactériophages, les plasmides, et les transposons. Les facteurs de virulence de SE peuvent se distinguer selon leurs différentes fonctions (79, 110).

Tableau 1. Les facteurs de virulence de SE classifiés selon leurs fonctions

Type de fonction	Structure
Adhésion et Mobilité	Flagelle Fimbriae SEF21, SEF17, SEF14 Adhésines
Invasion	Systèmes de sécrétion de protéines de type III (SST-III)/ Ilôt de pathogénicité de <i>Salmonella</i> 1 (IPS-1)
Infection des macrophages ou survie intra-phagocytaire	IPS-2 (Ilôt de pathogénicité de <i>Salmonella</i> 2) IPS-3 (Ilôt de pathogénicité de <i>Salmonella</i> 3) IPS-4 (Ilôt de pathogénicité de <i>Salmonella</i> 4)
Adaptation métabolique	Groupe des gènes : Starvation-stress response genes (ex : <i>aroA</i> , <i>narZ</i> , <i>fadF</i> , <i>eutE</i> )

### 2.2.2.1 L'adhésion bactérienne et la mobilité

L'attachement de la bactérie à la surface de la muqueuse de l'hôte initie le cours de l'infection. Les bactéries adhèrent aux cellules cibles via l'interaction entre les composantes de la surface bactérienne et les récepteurs spécifiques de l'hôte. *Salmonella* utilise ainsi des appendices de sa surface cellulaire pour initier l'adhérence, soit des pili (fimbriae) et le flagelle.

SE exprime le flagelle et au moins trois fimbriaes différents : SEF14, SEF17 et SEF21 (70). Le flagelle peut d'ailleurs être un facteur de virulence qui contribue à la contamination des œufs via l'adhérence de SE à l'oviducte des poules pondeuses (158). Ainsi, un mutant du sérovar SE (dépourvu de flagelle) s'attachera moins aux cellules intestinales de poulet que la souche sauvage de SE (3). Le fimbriae de type 1 (SEF21) joue un rôle dans l'adhésion de SE aux cellules eucaryotes, et le fimbriae SEF17 est impliqué dans la fixation aux fibronectines. Tandis que le fimbriae SEF14 ne contribue qu'à la résistance à la phagocytose des neutrophiles humains (221) et est limité à la virulence de SE et à la colonisation intestinale (251).

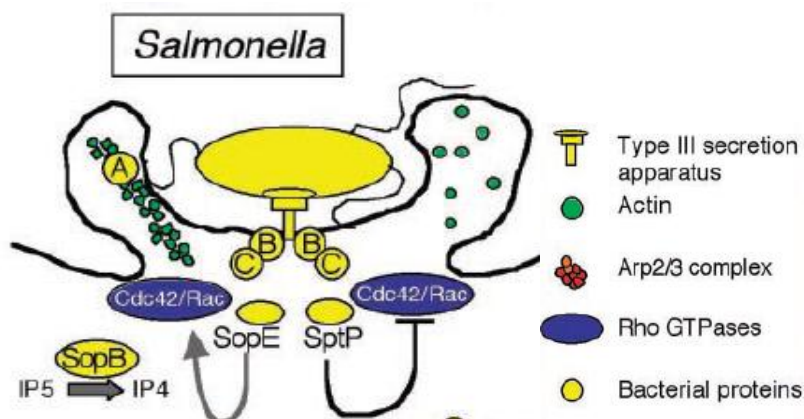
La mobilité des salmonelles se fait grâce au flagelle, et cette fonction est essentielle pour l'invasion et l'attachement (4, 138, 144). Dans plusieurs mécanismes d'infection, le flagelle peut lui-même conduire la bactérie qui pénètre ainsi la muqueuse de l'hôte et atteint rapidement la surface cellulaire de l'hôte (51).

### 2.2.2.2 L'invasion bactérienne

La pénétration de la bactérie à la muqueuse intestinale est souvent une étape importante pour traverser la barrière épithéliale. Les deux types de cellules épithéliales, entérocytes et cellules M, peuvent être envahis par *Salmonella* (86, 137).

L'invasion de *Salmonella* est conférée principalement par le système de sécrétion de type III (SST-III) qui est localisé sur l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* 1 (IPS-1) (25, 79, 139, 175). Le contact entre *Salmonella* et les cellules hôtes actives, le SST-III, est associé à l'invasion par le mécanisme « trigger » (58). Le SST-III permet d'activer directement des composants du cytosquelette en délivrant des effecteurs bactériens tels que les protéines effectrices (SopE, SopB, SipA et SptP) pour établir les différentes étapes successives de l'interaction entre la bactérie et les cellules épithéliales cibles (Figure 4) (58).

Figure 4. Mécanisme de l'invasion de *Salmonella* médiée par le SST-III



### 2.2.2.3 L'infection des macrophages

Dès que les salmonelles franchissent la barrière épithéliale, elles entrent en contact avec des cellules du système réticulo-endothélial, plus particulièrement les macrophages résidents initialement associées aux cellules M. *Salmonella* peut envahir et survivre à l'intérieur des macrophages en empêchant la maturation des phagosomes en phagolysosomes (95, 96). Le mécanisme moléculaire de *Salmonella* pour

l'infection des macrophages est associée à l'îlot de pathogénicité 2 (IPS-2). L'IPS-2 est identifié comme un gène cluster qui est nécessaire pour la survie des salmonelles à l'intérieur des cellules de l'hôte (200). L'IPS-2 comporte des gènes qui codent pour le SST de type II secondaire (SST-II). L'homologie génétique du SST -II de *Salmonella* avec celui de *Yersinia* suggère que *Salmonella* libère des protéines aux vacuoles ou à travers la membrane au cytosol de la cellule de l'hôte. Ceci influence le processus d'englobement des bactéries par le macrophage, et par conséquent, *Salmonella* peut survivre à l'intérieur du macrophage (259). L'IPS-3 et l'IPS-4 jouent aussi un rôle dans la survie des salmonelles intracellulaires (167). Ces deux IPSs sont profondément étudiés chez le sérovar Typhimurium plutôt que le sérovar Enteritidis dans différentes études (35, 275).

La survie de *Salmonella* à l'intérieur du macrophage est généralement considérée essentielle pour la diffusion des bactéries du tissu lymphatique associé à l'intestin, à la rate et au foie (200).

#### 2.2.2.4 Adaptation métabolique

Au cours de l'infection, *Salmonella* rencontre une variété de facteurs qui lui sont défavorables dans l'environnement de l'hôte, tels que la privation de nutriment, le stress oxydatif et les enzymes digestifs. Afin de survivre, cette bactérie possède un groupe des gènes qui joue un rôle dans l'adaptation métabolique, appelé « Starvation-stress response genes » (241). Ces gènes codent pour certaines fonctions métaboliques qui sont nécessaires à la bactérie afin de survivre aux différentes étapes de l'infection. Donc, l'adaptation métabolique de la bactérie est considérée comme un déterminant de sa virulence. Par exemple, le gène *aroA* est responsable de synthétiser

des acides aminés aromatiques (49) et une mutation du gène *aroA* chez SE en atténue la virulence (129).

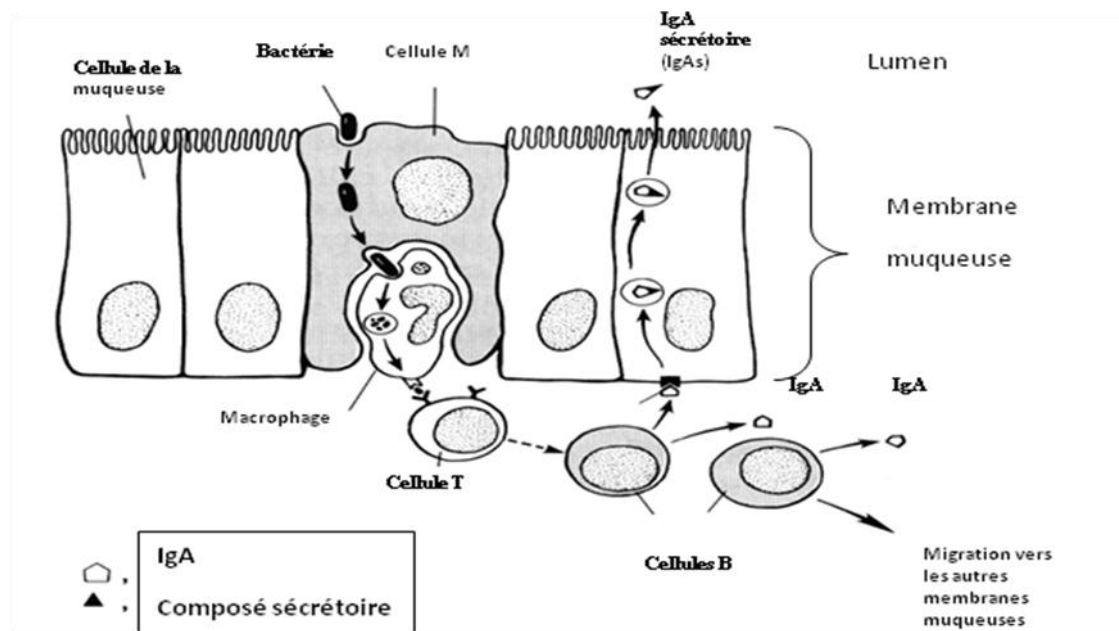
#### 2.2.2.5 Résistance aux composantes de la défense immunitaire non spécifique

La résistance aux produits de la réponse oxydative et non-oxydative a été étudiée. Au cours de la phagocytose, il existe une série de mécanismes contribuant à la mise à mort des bactéries par des produits métaboliques. Un de ces produits est dérivé des réactifs d'oxygène, tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est produit par le mécanisme de la flambée oxydative (224). Plusieurs enzymes de la bactérie peuvent prévenir ou même réparer des dommages causés par des radicaux d'oxygène (82, 244). Par exemple, la peroxidase est un enzyme capable de détruire le peroxyde d'hydrogène (24). Des radicaux d'oxygène peuvent causer des dommages au niveau de la membrane cellulaire bactérienne et aussi de son ADN. Face à cet inconvénient, il existe des systèmes de réparation d'ADN contre les intermédiaires d'oxygène réactives (82). Des gènes *recA* et *recB* de ST jouent ainsi un rôle important dans la résistance de la bactérie à la flambée oxydative des phagocytes et ceci est important dans la survie intracellulaire *in vitro* en présence de peroxyde d'hydrogène (196).

#### 2.2.3 Pathogénie de SE chez les volailles

L'infection à *Salmonella* chez les volailles est presque limitée au tractus gastro-intestinal. Les volailles excrètent irrégulièrement des salmonelles dans leurs fèces (264). L'infection typique inclut généralement par les étapes suivantes : ingestion, colonisation, invasion et dissémination (Figure 5, adapté de Salyers *et al.*, 1994 ) (235).

Figure 5. Colonisation et invasion de la muqueuse intestinale par les salmonelles



### 2.2.3.1 Colonisation intestinale

L'infection à SE débute ainsi par la colonisation intestinale. Chez l'oiseau, les conditions relatives à l'environnement intestinal, à la flore intestinale et au système immunitaire, sont toutes très différentes selon l'âge des oiseaux. C'est la raison pour laquelle l'excrétion des salmonelles dans les fèces suite à l'infection orale est plus forte chez les poussins que chez les oiseaux plus âgés (21). Le jabot des oiseaux adultes possède fréquemment des *Lactobacillus* qui abaissent le pH (4-5). Ceci permet d'empêcher la croissance des pathogènes mais aussi d'entraîner une résistance des bactéries à l'acidité (124). Les salmonelles sont bien adaptées pour lutter contre ces conditions de stress. Une étude a démontré que, suite à l'infection des souris par SE, 80% des bactéries survivent après un passage à travers l'estomac et étaient

présentes dans les matières fécales 6 à 10 heures post-infection (42). La population des bactéries anaérobies intestinales empêche la multiplication des salmonelles par la production des substances inhibitrices, tels que H<sub>2</sub>S et les acides gras volatils. On a mentionné aussi d'autres mécanismes tels que la déplétion nutritive et la compétition pour des sites de l'adhésion tissulaire (24, 267). Approximativement 15% des bactéries restent à l'intérieur du caecum et du gros intestin, alors que seulement 5% des bactéries pénètrent la paroi de petit intestin pour se retrouver au niveau des tissus lymphoïdes intestinaux (GALT) (55). Parmi les sérovars associés aux toxi-infections, certains sont excrétés pendant une période plus longue que d'autres. Des sérovars qui colonisent bien l'intestin sont plus fréquemment isolés au niveau du caecum que du jabot (21). Chez les poules pondeuses, SE peut coloniser divers organes internes (le rein, le foie, la rate) et aussi les organes reproducteurs (ovaires et oviducte) (279).

#### 2.2.3.2 Invasion et dissémination

La colonisation gastro-intestinale est souvent suivie par l'invasion des cellules épithéliales intestinales, et par la dissémination aux organes internes. Suite à l'invasion, des pathogènes se multiplient dans les organes filtres que sont le foie et la rate et se disséminent aux autres organes. On assiste alors à une infection systémique (216).

La capacité d'invasion de SE est reliée à la virulence de la souche infectante et à son lysotype (LT) (105, 217). Lors d'une infection expérimentale d'oiseaux de 5 jours d'âge avec trois souches de SE LT4, on a observé quelques différences parmi les SE LT4 en terme de la fréquence de la colonisation intestinale et de l'invasion splénique. Cependant, d'autres études n'ont pas permis de démontrer de différences entre SE



LT4 et d'autres SE LTs (105). Les souches SE LT4 sont plus invasives pour les poussins que les souches LT 7,8 et 13a, et la capacité d'invasion de SE LT4 change en fonction du temps. Des isolats récents de SE LT4 sont plus virulents que les isolats anciens de souches SE LT4 (125).

#### 2.2.4 Les facteurs principaux influençant l'infection à SE chez les volailles

La génétique de l'hôte est le premier facteur influençant la pathogénie et la résistance de l'hôte suite à l'infection à SE chez les oiseaux. L'étude de Guillot (1995) (113) a rapporté que le taux de mortalité et la colonisation systémique des SE (niveau du foie et de la rate) dépendent des différentes lignées aviaires après inoculation intramusculaire avec SE LT4. La génétique est aussi associée à la survie et à la colonisation locale (au niveau de l'intestin) chez les poulettes infectées à SE LT13 a (140). L'interaction *Salmonella* - hôte varie considérablement selon l'âge de l'hôte. En général, la résistance à l'infection augmente avec l'âge de l'oiseau. Par exemple, les poussins d'un jour d'âge sont facilement infectés à une dose de  $10^2$  CFU (264), tandis qu'une dose de  $10^6$  CFU peut causer l'infection chez 50 % à 100 % des oiseaux de 9 mois d'âge (130). Au moment de l'infection à SE, l'âge des poules influence à la colonisation intestinale. SE est plus souvent isolé de l'intestin de poules de 62 semaines d'âge que de celui de poules de 27 et 37 semaines d'âge lors d'une inoculation par voie orale à une dose de  $10^9$  CFU (97). Les hétérophiles sont importants pour contrôler la première étape de l'invasion (au niveau de la muqueuse intestinale) et subséquemment l'infection systémique chez l'oiseau (152). Au cours de la première semaine après l'éclosion, la susceptibilité à SE est liée à la fonction des hétérophiles (270), celle-ci est faible chez le poussin (120). L'âge des oiseaux est

définitivement corrélé au nombre de bactéries qui peut être détecté dans les organes viscéraux post-inoculation (216). Après l'administration d'une dose de  $10^5$  de SE par la voie intraveineuse (IV) à un groupe de poules, parallèlement avec celle de  $10^8$  de SE par la voie orale (per os) à autre groupe de poules, on a observé que la présence de SE est plus fréquente aux caecaux des oiseaux inoculés par voie orale que des oiseaux inoculés par voie parentérale, alors que l'isolement des salmonelles dans des organes est similaire entre deux groupes (18). Dans une autre étude, des poules ayant reçu une dose (par aérosols) de  $10^2$ - $10^5$  bactéries ont excrété par intermittence des salmonelles dans les fèces pendant 28 jours post-inoculation. Les salmonelles sont isolées également dans les organes tels que poumons, gésier, ovaire, oviducte, rate, reins, foie (23). Dans une autre expérience, des oiseaux de 7 semaines d'âge ont été inoculés par voie intra-trachéale à différentes doses ( $10^2$ ,  $10^5$  ou  $10^8$  CFU de SE LT4) et par voie orale à une dose  $10^5$  CFU de SE LT4. La bactériémie fut observée 6 heures post-inoculation intra-trachéale. Des salmonelles furent isolées du foie et de la rate un jour post-inoculation et furent détectées dans les tissus des oiseaux inoculés à la dose de  $10^8$  CFU jusqu'au 14<sup>e</sup> jour post-inoculation, et dans les caeca jusqu'à la fin de l'expérience soit 48 jours post-inoculation (192).

Récemment, Van Immerseel et al., (2004) (264) ont identifié que l'infection des poussins à une faible dose de SE peut induire la persistance de l'infection à SE jusqu'à l'âge de l'entrée en ponte. Lors de l'infection orale de poussins d'un jour d'âge à une faible dose ( $10^2$  CFU) ou à forte dose ( $10^9$  CFU de SE), tous les oiseaux ont excrété des SE irrégulièrement dans les fientes pendant 18 semaines post-inoculation. On a retrouvé chez le groupe infecté à forte dose plus d'oiseaux positifs que chez le groupe infecté à la faible dose et ce pendant la première semaine suivant

l'inoculation. Cependant, les oiseaux infectés à  $10^2$  CFU excrètent plus de bactéries que les oiseaux infectés à la forte dose à partir de 10 semaines post-infection. Cette expérience a aussi démontré qu'à partir de 18 semaines, la colonisation caecale est similaire entre les deux groupes. Chez des oiseaux plus âgés, une semaine après l'inoculation à une dose  $10^9$  CFU de SE, les pourcentages de SE isolé a été 91, 80 et 73 % (à 62, 37 et 27 semaines) à partir des écouvillons cloacaux des poules inoculées (97). Pendant 5 semaines après l'inoculation, la prévalence de SE dans des organes a été la suivante : foie (53%), rate (49%), ovaire (19%), oviducte (17%) (97). Le nombre de SE isolés à partir de la rate et du foie était similaire chez des poussins qui ont été oralement infectés à 1 jour d'âge et à 3 jours d'âge. Par ailleurs, l'invasion et la colonisation aux organes filtres (le foie et la rate) semblent corrélées à la dose d'infection chez des poussins de 5 jours d'âge ou de 6 jours d'âge inoculés à moins de  $10^9$  CFU soit la dose nécessaire pour causer l'invasion (57). Donc, l'infection à *Salmonella* est influencée par les facteurs suivants : la génétique de l'hôte, l'âge des oiseaux, la dose infectieuse, la route d'infection et la capacité de l'invasion des souches ou des sérovars (216).

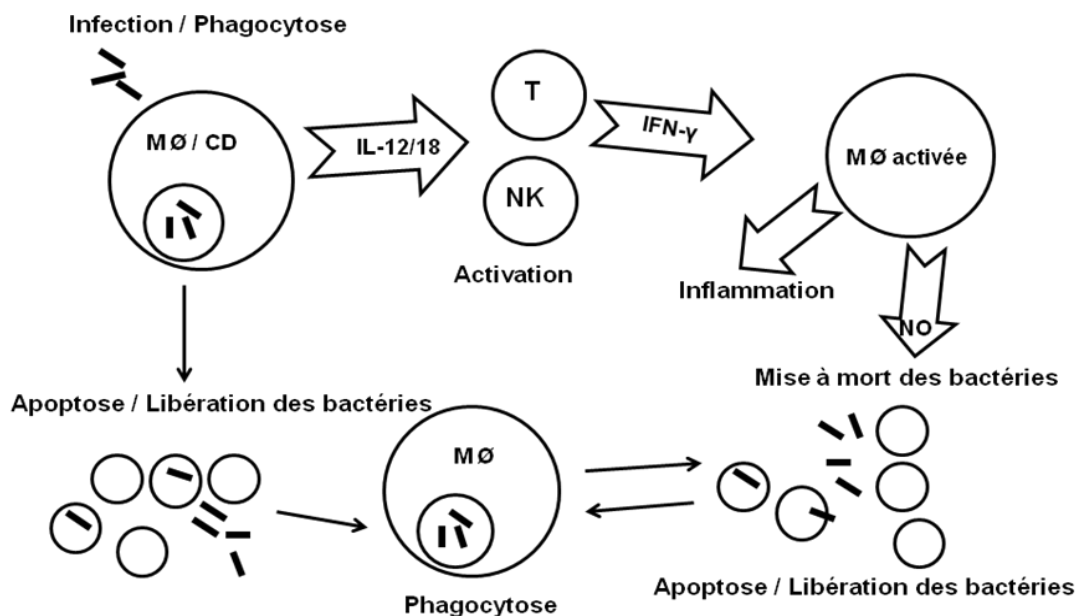
### 2.3 La réponse immunitaire suite à l'infection à SE chez les volailles

Le système immunitaire des oiseaux possède différentes stratégies de défense. L'immunité innée tels que la barrière physique et la barrière chimique prévient l'entrée des pathogènes. Parallèlement, l'immunité cellulaire et les composants solubles de l'immunité acquise, tels que les anticorps et les cytokines, sont responsables de l'élimination des pathogènes dès que ces pathogènes ré-infectent ces oiseaux. Les fonctions majeures de l'immunité innée incluent le recrutement des cellules immunitaires au site d'infection grâce à la production des facteurs chimiques,

tels que les cytokines, l'activation de la cascade de complément. L'immunité innée joue un rôle important pour activer l'immunité acquise grâce au processus de présentation antigénique. Quoique l'immunité innée soit effective, cette réponse est normalement incapable de lutter entièrement contre les agents pathogènes les plus virulents et de prévenir la maladie. Sur cet aspect, l'immunité acquise est plus efficace pour éliminer les micro-organismes et aussi protéger les oiseaux contre une re-infection par le même micro-organisme (77). L'immunité acquise ou adaptative compose les deux catégories de la réponse immunitaire : la réponse immunitaire humorale et la réponse immunitaire cellulaire (158).

### 2.3.1 Immunité innée

L'interaction de *Salmonella* avec les cellules de l'hôte active une partie de l'immunité innée. La réponse immunitaire innée est considérée comme une première ligne de défense. Cette réponse limite l'infection jusqu'à ce que la réponse immunitaire acquise soit initiée suite à l'infection (Figure 6) (158).

Figure 6. Réponse immunitaire innée contre l'infection à *Salmonella*

### 2.3.1.1 Les hétérophiles

Les hétérophiles contribuent effectivement à la résistance de l'hôte contre l'infection à *Salmonella* (52, 85). Les hétérophiles chez les volailles sont équivalents aux neutrophiles chez les mammifères et sont des médiateurs importants de la résistance naturelle contre des infections bactériennes (220). En raison de leur réponse précoce et leur capacité de mise à mort des pathogènes, les hétérophiles sont considérés comme des bio-marqueurs pour l'évaluation de la compétence de l'immunité innée chez les volailles (246). Chez les volailles, les hétérophiles s'accumulent dans la muqueuse du caecum pendant 18 heures suite à l'infection expérimentale par une souche SE sauvage (262, 263). Puisque l'expression d'IL-18 et IFN- $\gamma$  sont augmentées, les hétérophiles stimulent la production des cytokines pro-inflammatoires, soit IL-8 (150, 263). Les oiseaux peuvent supporter une déplétion des hétérophiles (granulocytopenie) mais sont plus susceptibles à l'invasion des

salmonelles dans des organes internes. L'augmentation du nombre de bactéries dans ces derniers est proportionnelle à la diminution du nombre des hétérophiles circulants (151, 152). Au cours de l'infection, les salmonelles sont rapidement tuées par les diverses fonctions des hétérophiles, soit par phagocytose, dégranulation, ou flambée oxydative (85, 119, 120, 149, 152, 153). Les cellules phagocytaires contrôlent la croissance des salmonelles en utilisant deux mécanismes de défense : la mise à mort par des dérivés réactifs de l'oxygène [ROI, générée *via* le nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate réduit (NADPH)] et par des dérivés réactifs du nitrogène [RNI, généré *via* le monoxyde d'azote NO synthétase inductible (iNOS)] (224). Le ROI est indispensable pour la résistance précoce de l'hôte (à partir du premier jour après l'infection), par contre le RNI joue un rôle crucial à l'étape tardive de l'infection (171, 224). Par ailleurs, les phagocytes circulants (monocytes, hétérophiles) contiennent les peptides anti-microbiens cationiques sous forme des granules cytoplasmiques (198). Dans le processus de phagocytose, ces granules fusionnent avec les vacuoles qui contiennent les microbes ingérés alors les peptides anti-microbiens sont libérés en concentration élevée pour tuer les microbes (93).

La colonisation est une étape essentielle lors de l'infection par les salmonelles. L'inhibition de la colonisation est le résultat d'une protection immunitaire qui induit rapidement la résistance contre l'infection (16). Après l'inoculation des oiseaux à *Salmonella*, les cellules immunitaires sont attirées très rapidement au site de l'infection (150, 263). Ces cellules sont des granulocytes, des macrophages, des lymphocytes T et des lymphocytes B (moins fréquentes) qui infiltrent la paroi caecale pour 24 heures post-inoculation. Ces cellules peuvent jouer un rôle au niveau de l'inhibition de la colonisation parce que le caecum est reconnu comme un site

favorable pour la colonisation et l'invasion des salmonelles chez les volailles (67, 68). Expérimentalement, des oiseaux auxquels du 5-fluorouracil a été administré pour réduire le nombre d'hétérophiles ne sont pas protégés contre la colonisation des bactéries dans les organes internes (152, 263). Ce résultat suggère que les hétérophiles jouent un rôle central dans la protection contre la colonisation et l'invasion.

### 2.3.1.2 La phagocytose et la survie intracellulaire

L'évaluation de la capacité des hétérophiles et des monocytes dans la phagocytose a révélé que les hétérophiles phagocytent plus de SE que les monocytes (243). En plus, la phagocytose des hétérophiles est capable de tuer des salmonelles intracellulaires, tandis que la majorité des salmonelles non-opsonisés survivent à l'intérieur des monocytes. Donc, les hétérophiles sont capable d'une mise à mort plus efficace des bactéries que les monocytes (243). Dans une expérience, les activités phagocytaire et bactéricide des hétérophiles ont été évaluées chez des poussins pendant 7 jours suite à l'infection par SE (à 1 jour d'âge). L'index de phagocytose des hétérophiles n'a pas changé entre le 1<sup>er</sup> jour et le 4<sup>e</sup> jour post-inoculation mais a doublé au 7<sup>e</sup> jour post-inoculation. Il est intéressant de noter que l'activité bactéricide a été identique dans tous les groupes d'âge des poussins. Ces résultats ont montré qu'il y a une corrélation entre l'âge de l'oiseau, la fonction des hétérophiles et la susceptibilité à l'invasion tissulaire par les salmonelles (270).

Après la phase de l'initiation de la phagocytose par l'adhérence de la bactérie sur la membrane des phagocytes, la bactérie se retrouve dans une vacuole attachée à la membrane phagocytaire (phagosome). Les phagosomes fusionnent au lysosome, par conséquent les bactéries sont digérées en 15 à 30 minutes (79). La flambée oxydative

de la phagocytose activée produit des dérivés réactifs d'oxygène (ROI) et des dérivés réactifs de nitrogène (RNI) tels que des chloramines, des radicaux de l'hydrogène, du peroxyde d'hydrogène. Le ROI est nécessaire à la défense contre *Salmonella*. Ces composés tuent des bactéries très efficacement à l'intérieur des macrophages. L'infection des macrophages aviaires par ST produit de forts niveaux de NO qui possède un effet bactéricide (223). Par contre, on n'a pas observé ce résultat dans une expérimentation semblable avec SE. Cette capacité différente dans la production du NO à l'intérieur de macrophage peut expliquer différents taux de survie observés chez les sérovars de *Salmonella* (158). Chez l'espèce aviaire l'activité de l'IFN- $\gamma$  est indirecte, face à l'infection à *Salmonella*, via l'activation des phagocytes en augmentant la flambée oxydative et la dégranulation. Ceci induit le bactéricide intracellulaire et extracellulaire et également l'élimination finale des bactéries (158). Les salmonelles ingérées par les macrophages de l'hôte peuvent échapper aux activités antibactériennes des macrophages via les mécanismes tels que : la tolérance au stress acide, la résistance aux défensines (88), et l'empêchement de la fusion des phagosomes avec des lysosomes (259), ainsi le blocage de la formation des phagolysosomes (189). Face aux composés ROI et RNI, la bactérie a développé un mécanisme de détoxification, incluant la conversion des composés RNI en forme moins toxique, des enzymes antioxydants et des systèmes de réparation (237). De plus, les bactéries intracellulaires sont capables de s'adapter à l'environnement interne des phagosomes. Puisque l'environnement intra-phagosomal est rapidement acidifié jusqu'à un pH inférieur à 5, l'environnement peut alors devenir toxique pour la réplication de la bactérie. La capacité de l'établissement des voies métaboliques face à la limitation nutritive est nécessaire de la survie des salmonelles (79). Tous ces

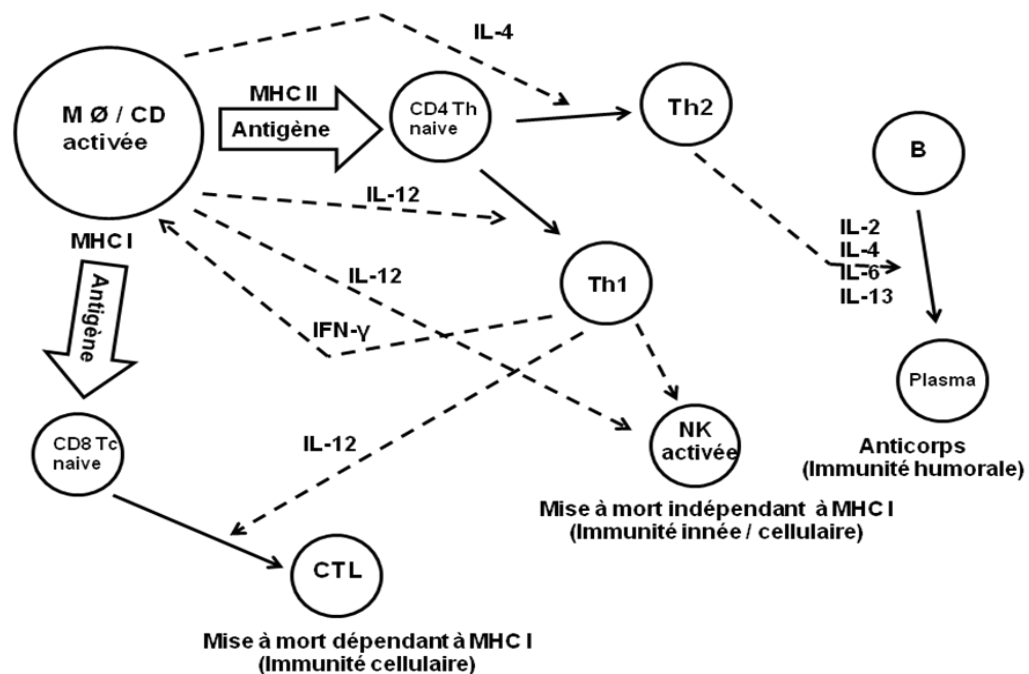


mécanismes de défense permettent la survie des salmonelles et par la suite, leur multiplication à l'intérieur des cellules de l'hôte. Au cours de ce processus, les bactéries survivantes sont libérées par apoptose et sont ensuite phagocytées par d'autres macrophages. Alors, un nouveau cycle de phagocytose sera répété. Les macrophages initient la réponse immunitaire mais contribuent ainsi à disséminer des salmonelles qui ont réussi à la survie intracellulaire (158).

### 2.3.2 Immunité acquise contre l'infection à *Salmonella*

Chez l'espèce aviaire, l'immunité spécifique initiée par *Salmonella* contribue à juguler l'infection, particulièrement lors des dernières étapes de l'infection. Ainsi l'immunité humorale et l'immunité cellulaire contribuent à l'élimination des bactéries (Figure 7) (158).

Figure 7. Réponse immunitaire acquise contre l'infection à *Salmonella*



L'immunité acquise de l'hôte comporte des réponses médiées par les cellules T et les cellules B. La réponse immunitaire humorale (anticorps) est particulièrement efficace contre les micro-organismes extracellulaires, tandis que la réponse immunitaire cellulaire est essentielle afin d'éliminer des micro-organismes intracellulaires. Suite à une infection à *Salmonella*, la protection médiée par les cellules T est probablement plus importante que la réponse humorale et ce, étant donné que *Salmonella* est une bactérie intracellulaire facultative (77, 158, 169).

Les anticorps sont plus efficaces pour l'élimination des antigènes extracellulaires, parce que leur interaction avec des antigènes va par la suite activer des mécanismes qui vont permettre la destruction des antigènes. Ces mécanismes incluent: l'agglutination ou la précipitation des antigènes; l'activation directement de la voie classique du complément; l'opsonisation de l'antigène et ce dernier peut alors être phagocyté plus efficacement par endocytose grâce à la médiation des récepteurs. Ces mécanismes facilitent aussi la destruction des antigènes par la phagocytose et neutralisent les antigènes via la fixation antigène-anticorps. Ce processus permet alors de prévenir la fixation de l'antigène aux récepteurs solubles ou aux récepteurs cellulaires qui sont généralement utilisés pour l'invasion ou pour la propagation des effets nuisible chez l'hôte (77). Cependant, lorsque les bactéries sont intracellulaires, les mécanismes de l'immunité médiées par des cellules (IMC) sont nécessaires pour détruire des antigènes intracellulaires et par conséquent, ces antigènes sont éliminés (56, 224).

Les cellules T jouent un rôle principal dans l'IMC. Ces cellules expriment un répertoire de récepteurs à la surface (T-cell receptor : TCR) qui sont collectivement

capable de reconnaître le grand nombre d'antigènes différents. Les cellules T sont distinguées en fonction de leur capacité fonctionnelle et de leurs marqueurs à la surface cellulaire. Les cellules T expriment toujours le complexe de la classe de différenciation (CD) : CD3-TCR. Alors, la présence de CD3 à la surface cellulaire indique que cette cellule est une cellule T mature (257). Les réponses immunitaires adaptatives contre *Salmonella* sont induites après la réponse innée et constituent l'immunité spécifique aux antigènes médiées par les cellules B et les cellules T. Les cellules présentant l'antigène (APC) (cellules dendritiques ou/et macrophages) présentent des antigènes aux cellules T naïves. Ce processus est initié par l'interaction des molécules de classe I, II du « Major Histocompatibility Complex » (MHC) avec des molécules à la surface des cellules T telles que CD4 et CD8 via leurs récepteurs. Les cellules T CD4 sont activées via la classe II du MHC et ensuite différenciées en deux types de cellules : Th1 et Th2 (232). Les cellules Th2 dirigent la réponse immunitaire humorale tandis que les cellules Th1 dirigent la réponse immunitaire cellulaire. L'activation de Th1/Th2 dépend non seulement de la régulation des cytokines sécrétées par les APC : IL-12 ou IL-4 mais aussi du type d'antigènes présenté par les APC. Cependant, les cellules T CD8 (T cytotoxique) qui reconnaissent les cellules ciblées, peuvent les tuer en se liant strictement à un récepteur de la classe I du MHC (158, 257, 279).

Le ratio des cellules T-CD4<sup>+</sup> versus T-CD8<sup>+</sup> peut être utilisé pour estimer la fonction des lymphocytes. L'augmentation des cellules T-CD4<sup>+</sup> indique une augmentation de l'activité des lymphocytes parce que les cellules T helper (Th) sont prédominantes. Cependant, le nombre élevé de cellules T-CD8<sup>+</sup> indique une dépression de l'activité des lymphocytes (257). Chez les volailles, les cellules T -CD4 représentent 20% des

cellules spléniques et 40-45 % des leucocytes sanguins. Les cellules T-CD8 représentent plus de 50 % des cellules spléniques mais que 15 % des leucocytes sanguins (159).

### 2.3.2.1 L'immunité médiée par les cellules B

L'immunité humorale, médiée par des anticorps produits par les cellules B activées est une indication de l'infection. Étant donné que *Salmonella* est une bactérie intracellulaire, les anticorps ne protègent probablement pas l'hôte contre l'étape intracellulaire de l'infection (158). Cependant, les anticorps peuvent contribuer efficacement à l'opsonisation médiée par les macrophages et par conséquent détruire les bactéries. Néanmoins, cette réponse est considérée moins importante que celle des cellules T parce que les titres d'anticorps ne sont pas toujours corrélés à la réduction de l'excrétion des salmonelles dans les fientes ni à une diminution de la contamination bactérienne des œufs (197).

Puisque *Salmonella* persiste chez l'hôte principalement à l'intérieur des cellules spléniques et des cellules hépatiques, il est possible qu'elle évite ainsi l'action des anticorps. L'IMC est donc nécessaire pour lyser les cellules infectées. C'est seulement lorsque les bactéries sont libérées dans l'environnement extracellulaire que les anticorps peuvent participer à l'élimination des bactéries (77).

Donc, l'IMC est plus important que la réponse humorale afin d'éliminer des souches virulentes dans les tissus. Par contre, les réponses via des IgA et les leucocytes PMNs sont aussi importants (190). Par exemple, la destruction expérimentale de la fonction de la bourse de Fabricius, a entraîné une augmentation du nombre de SE dans les ceca et les fientes lors d'infection expérimentale. Ceci souligne le rôle protecteur des IgA contre la colonisation intestinale (69). La sécrétion des anticorps IgA joue aussi

un rôle significatif de l'immunité acquise contre *Salmonella* parce que la muqueuse intestinale est le premier site de l'infection à *Salmonella*. Il est intéressant que l'infection à SE induise significativement la prolifération des cellules B IgA<sup>+</sup> et l'augmentation rapide des IgA sécrétoires dans les organes reproducteurs (ovaire et oviducte) (271, 272). Une corrélation entre l'augmentation d'anticorps spécifiques à SE et la diminution du nombre de bactéries dans l'ovaire et l'oviducte a été observée par Withanage et al. (1999) (271). Ces anticorps (IgG, IgM et IgA) sont sécrétés à partir des différentes parties de l'oviducte (271). Les titres d'anticorps de l'oviducte étaient identiques à ceux du sérum. Le niveau des IgG et IgM augmente progressivement jusqu'à un pic à 14<sup>ème</sup> jour post-inoculation. Ces recherches indiquent que l'activation de l'immunité locale est importante non seulement pour l'intestin mais aussi l'oviducte chez les poules infectées à SE. Les IgA sécrétoires intestinaux peuvent être protecteurs en empêchant la fixation d'une adhésine de la surface bactérienne à la barrière de la muqueuse limitant alors l'adhésion et la pénétration des salmonelles. Il faut noter que les niveaux d'anticorps sériques ne sont pas tout à fait corrélés à une protection contre l'infection, probablement en partie à cause de la diversité antigénique parmi les sérotypes de salmonelles.

#### 2.3.2.2 L'immunité médiée par les cellules T

L'importance des cellules T lors d'infection à *Salmonella* est démontrée dans plusieurs études (7, 10, 11, 106, 183, 204). Néanmoins, leur contribution relative à la réponse immunitaire est un point important dans les discussions scientifiques. Les cellules de type Th1 de CD4 produisent l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  et activent l'immunité cellulaire et l'inflammation (204). Les cellules Th2 produisent quant à elles les IL-4, IL-5 et IL-13 et induisent l'activation des cellules B et par la suite leur différenciation

(131). Plusieurs études ont suggéré que les deux types de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, avec la contribution de TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ , sont mobilisées lors de la résistance acquise contre *Salmonella* (172, 254). Une augmentation significative des cellules TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> a aussi été observée au niveau du sang, des cécas et de la rate après l'inoculation orale d'une souche de ST virulente ou atténuée. Néanmoins, le rôle essentiel de ces cellules est encore à déterminer dans la *salmonellose* aviaire (32). Il n'est pas possible chez les oiseaux de démontrer le rôle de la réponse de Th1 par rapport à la réponse de Th2 parce qu'il y a peu d'études publiées sur les cytokines de type Th2. Néanmoins, on a observé que l'élimination des salmonelles est corrélée aux niveaux d'IFN- $\gamma$  (28), ce dernier étant associé à la forte réponse des cellules T (27). Le rôle important des cellules T CD8<sup>+</sup>, une population représentative de l'IMC, a été mentionné après l'infection primaire à *Salmonella* chez les poussins (32). Les mécanismes de l'IMC permettant d'éliminer systématiquement des SE chez les oiseaux ont récemment été décrits par plusieurs auteurs (81, 204, 273, 274). Dans l'étude de Farnell et al., (2001) (81), l'administration intra-péritonéale du recombinant d'IFN- $\gamma$  a contribué à limiter la colonisation des SE dans les organes internes. L'infection à SE des poussins d'une semaine d'âge a induit l'expression précoce d'une protéine inflammatoire de la famille des chémokines chez des macrophages (PIM) de la rate et du foie. Ce processus a été suivi par l'expression de l'IFN- $\gamma$  qui accompagne l'augmentation du nombre des cellules T CD4 et CD8 (274).

L'infection primaire à *Salmonella* peut induire la production des anticorps contre le LPS et des antigènes protéiques en plus des réponses de type Th1 mémoire et de cellules T cytotoxiques (CTL) (116, 161, 247). Expérimentalement, les souris ayant une déficience des cellules T (athymic *nu/nu*) produisent l'IgM et l'IgG3, mais peu

ou pas d'anticorps contre les LPS de *Salmonella* (IgG1, IgG2a et IgG2b) suite à l'infection avec une souche de *Salmonella* atténuée. Par contre, ces souris ne produisent pas d'anticorps contre d'autres protéines antigéniques (239). On peut donc conclure que les cellules T régulent la production des anticorps contre *Salmonella*.

Dans une étude récente, il a été démontré que l'utilisation de la flagelline de SE peut augmenter la prolifération des lymphocytes des oiseaux infectés à SE (203). La flagelline, en comparaison aux autres composantes de la bactérie, a stimulé plus efficacement les cellules T (177). En plus, les cellules spléniques qui sont stimulées par la flagelline produisent fortement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 dans le sérum (203). L'infection à SE induit effectivement le changement des lymphocytes dans des organes lymphoïdes secondaires (106). Ce changement est relié à la dose d'infection. La sous-population des splénocytes (CD3, CD4, CD8 et cellules B) reste stable après une infection à une faible dose ( $2 \times 10^2$  CFU) alors qu'à forte dose ( $2 \times 10^8$  CFU), les cellules T-CD4 diminuent significativement au 7<sup>e</sup> jour post-inoculation (p.i), et les cellules CD3 et CD8 diminuent à 14<sup>e</sup> jour p.i. Ainsi les changements des lymphocytes T au niveau de la rate se sont déclenchés qu'à une forte dose de SE (7).

Au niveau du système reproducteur chez les poules pondeuses, les cellules T-CD4 et CD8 augmentent au niveau des tissus ovariens des poules pondeuses pendant 24h après l'inoculation à SE (22). Ainsi, les deux types de cellules T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) sont présentes au niveau local (ovaire et oviducte) suite à l'infection à SE (272). Néanmoins, le ratio CD4 et CD8 ne change pas au cours de l'infection au niveau ovarien parce qu'elles sont positivement corrélées (22). Withanage (1998) (272) rapporte que l'infection à SE induit la réponse immunitaire locale médiée par le type MHC II, la population de cellules T et les cellules B.

### 2.3.2.3 Immunité locale

Le système immunitaire local comporte des cellules T, principalement des cellules T- CD4 mémoires/effectives et aussi un grand nombre de cellules B plasmiques. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) possèdent des structures spéciales responsables de la première ligne de défense de la surface muqueuse. Grâce au MALT, les infections par les pathogènes sont limités à l'adhérence à l'épithélium et à la colonisation intestinale. Les plaques de Peyer (PP) représentent de plus un site inductif pour les réponses d'IgA aux pathogènes et aux antigènes ingérés dans le tube gastro-intestinal (159).

L'infection à *Salmonella* se fait initialement à la surface muqueuse où une réponse immunitaire humorale se produit généralement suite à l'infection. L'immunoglobuline (Ig) locale prédominante est l'IgA, quoique les réponses des IgG et des IgM peuvent également être observées. La plupart des IgA sont sécrétés à travers les membranes muqueuses (intestin, bile, tractus respiratoire et génital) et sont présentes dans les sécrétions. Les IgA sont synthétisées localement par les plasmocytes (256). Les IgA agissent en inhibant l'adhérence des micro-organismes à la surface des cellules mucosales, empêchant de cette façon l'entrée des micro-organismes dans les tissus corporels (232). La réponse immunitaire locale intestinale semble être plus efficace que la réponse systémique pour l'élimination des salmonelles à partir du tube gastro-intestinal (69). Dans une étude de Berthelot-Hérault et al.(2003) (34), une réponse humorale systémique contre SE chez les oiseaux positifs détectés par les prélèvements caecaux survient tardivement, 9 semaines p.i, avec une forte quantité d'IgG et d'IgM mais un faible nombre d'IgA, suggérant que la plupart de la réponse humorale serait liée à la colonisation caecale



par SE. Ces auteurs mentionnent que des facteurs autre que la production d'anticorps contribueraient à la protection contre la colonisation.

L'immunité locale jouerait aussi un rôle essentiel de prévention des infections par des salmonelles au niveau des organes reproducteurs des oiseaux. Chez les poules pondeuses, la colonisation du tractus reproducteur par *Salmonella* initie des réponses immunitaires locales (128). La sécrétion des IgA au niveau de l'oviducte semble par contre être transitoire parce que le niveau d'IgA atteint un pic 7 jours après deux inoculations consécutives pour rapidement diminuer. Le niveau élevé des IgA contribue partiellement à éliminer les salmonelles au niveau de l'oviducte (271).

## 2.4 Prévention et surveillance des infections à *Salmonella* Enteritidis

### 2.4.1 Les méthodes de prévention sans vaccination

#### 2.4.1.1 Biosécurité

Les mesures de biosécurité ont pour but de minimiser le risque d'entrée et de dissémination de *Salmonella* dans les fermes, couvoirs, meuneries et autres bâtiments avicoles. Le vide sanitaire est un des principes fondamentaux de la biosécurité afin de s'assurer que *Salmonella* ne persiste plus après un cycle de production lors de troupeaux positifs. En parallèle, la surveillance des aliments, l'application stricte de la procédure de nettoyage et de désinfection, le contrôle des rongeurs, peuvent significativement diminuer la prévalence de l'infection à *Salmonella*.

#### 2.4.1.2 Exclusion compétitive

L'utilisation de l'EC a pour but l'inhibition de la prolifération ou la réduction d'une ou de plusieurs bactéries intestinales. Les principaux mécanismes d'action de l'EC sont la création d'un environnement physiologique restrictif et la compétition pour

les sites des récepteurs bactériens. De plus, l'EC est élaborée sous forme de substances semblables à l'antibiotique ou la compétition pour les substrats essentiels pour la croissance des bactéries.

. D'autres stratégies pour le contrôle l'infection à *Salmonella* chez les poules pondeuses visent à prévenir la colonisation intestinale en utilisant des prébiotiques, probiotiques, synbiotiques et autres additifs alimentaires administrés en continu dans l'alimentation (261). Puisque l'activité inhibitrice de *Lactobacillus* contre SE a été démontrée lors d'un essai d'inhibition *in vitro* (185), l'utilisation des *Lactobacillus* comme probiotique est une mesure de contrôle encouragée contre *Salmonella*, spécifiquement pour les poules pondeuses (65).

#### 2.4.2 Vaccination et la réponse immunitaire des oiseaux

##### 2.4.2.1 Vaccins disponibles contre SE pour les volailles

Chez les volailles, la vaccination contre *Salmonella* revêt un intérêt particulier pour deux sérovars affectant la santé publique, SE et ST (38, 75, 211). L'immunisation des oiseaux par vaccination peut faire partie d'un programme de prévention contre l'infection à *Salmonella* chez les poules pondeuses et reproductrices. La vaccination vise la prévention ou la réduction de la colonisation intestinale et par conséquent, la réduction de l'excrétion des salmonelles dans les fientes. D'autre part, la vaccination vise la réduction de la colonisation des organes reproducteurs et donc, la prévention de la contamination des oeufs (75). Au Canada, les vaccins commercialement disponibles contre SE sont les bactérines de SE (Tableau 2).

Tableau 2. Les vaccins disponibles autorisés au Canada contre SE

Nom attribué	Marque de commerce	Code de produit SPBV	Fabricant	Date d'enregistrement
Bactérine de Salmonella enteritidis	AviPro 109 SE4 CONC	800BA/S5.0/M1	Lohmann Animal Health International - É.-U.	1998-05-22
Bactérine de Salmonella enteritidis	Layermune SE	800BA/S5.0/B10	Biomune Company - É.-U.	1992-09-21
Vaccin contre la maladie de Newcastle et de la bronchite Types Mass et Ark., Virus Inactivés Bactérine de Salmonella Enteritidis	AviPro 329 ND-IB2-SE4 Conc	800V2X/N20.0/L7	Lohmann Animal Health International - É.-U.	2008-10-02
Vaccin contre la maladie de Newcastle et la bronchite infectieuse aviaire, Type Massachusetts, Virus tués (inactivés), Bactérine de Salmonella enteritidis	Bron Newcavac-SE	800V2X/N5.1/I6.2	Intervet Inc. - É.-U.	2007-04-11
Vaccin contre la maladie de Newcastle et la bronchite infectieuse aviaire, Type Massachusetts, Virus tués (inactivés), Bactérine de Salmonella enteritidis	Layermune 3	800V2X/N5.0/B10	Biomune Company - É.-U.	Avant de 2000

(Agence canadienne d'inspection des aliments)(1)

#### 2.4.2.2 Les bases scientifiques de la vaccination

Jusqu'en 2000, il y a eut peu de développement de nouveaux vaccins contre *Salmonella* en raison du manque de connaissance quant aux mécanismes de la résistance naturelle et l'immunité protectrice à long terme contre la salmonellose. En fait, l'immunisation suite à la vaccination peut induire des réponses détectables, les réponses humorale et cellulaire. Néanmoins, la corrélation entre la présence des anticorps et la résistance de l'hôte contre une ré-infection ne peut pas toujours être établie (168). La plupart des connaissances actuelles ont été obtenues à partir des études chez la souris (169, 170, 178, 183, 245).

Les vaccins contre *Salmonella* doivent être capables d'induire la réponse de type Th1 qui entraîne l'élimination des bactéries suite à l'infection. La nature de la réponse

immunitaire est alors importante pour déterminer si un vaccin sera efficace. L'âge de l'oiseau sera aussi parallèlement important pour déterminer les caractéristiques de la réponse immunitaire en raison de l'activité différentielle selon l'âge des composantes de la réponse innée, telle que les hétérophiles, mais aussi la différenciation de la population des cellules T après l'infection (75).

L'efficacité des vaccins est entre autre évaluée par la protection des oiseaux contre l'infection expérimentale, soit le taux de morbidité et mortalité ; le niveau de la colonisation intestinale et systémique par les salmonelles, ainsi la protection des oiseaux après l'infection expérimentale. Toutefois, le niveau de la protection dépend aussi de la souche d'infection, la route d'administration, la dose d'infection, l'âge des oiseaux et l'espèce/lignée des oiseaux. Conséquemment, il est difficile de comparer adéquatement l'efficacité des vaccins couramment disponibles (16).

#### 2.4.2.3 La protection croisée entre les différents sérovars lors de vaccination

SE et ST sont les deux sérovars de *Salmonella* les plus importants pour la santé publique (29, 38, 75, 211). Il existe des vaccins vivants et des vaccins inactivés commercialement disponibles contre ces deux sérovars chez les volailles. Autrement, un vaccin vivant de la souche *S. Gallinarum* est aussi utilisé pour l'immunisation des poules contre SE (84). Certaines expériences indiquent une protection croisée faible entre les groupes B et D chez les volailles. L'hypothèse de la réaction immunitaire croisée des groupes B et D est basée sur LPS, mais l'effet partiel de l'immunité croisée entre les séro-groupes B et D est encore à discuter (59, 242). Récemment, Beal et coll., (2006) (29) ont étudié les niveaux de protection croisée entre ces deux sérovars et le niveau de la réaction croisée antigénique. Cette expérience a démontré

qu'un vaccin vivant élaboré avec un sérovar unique était capable de protéger des oiseaux contre les infections à SE (groupe D) et ST (groupe B).

#### 2.4.2.4 Vaccins vivants versus vaccins tués

Il est évident que les vaccins vivants sont plus efficaces que les vaccins tués pour contrer l'infection systémique et l'infection intestinale (11, 91, 197). Également, les études chez les volailles ont démontré des degrés variables de la protection pour ces deux types de vaccins (10, 11, 195, 204, 205). Ces vaccins sont commercialement disponibles. Cependant, au Canada, seuls les vaccins tués contre SE sont disponibles. Malheureusement, les informations sur les antigènes bactériens immunogènes sont encore limitées pour cibler les candidats idéaux pour le développement de nouveaux vaccins (16, 75).

Quoique les vaccins tués puissent être efficaces en protégeant contre l'infection à *Salmonella* chez les volailles, les vaccins vivants présentent des avantages par rapport aux vaccins tués. Par exemple, on observe la stimulation tant de l'immunité humorale que cellulaire, de même que l'expression de tous les antigènes associés *in vivo* (19). Les vaccins vivants sont plus efficaces en raison de l'augmentation de la prolifération lymphocytaire en réponse aux antigènes de SE chez les poules pondeuses (11). Ils ont aussi des effets protecteurs supplémentaires, surtout s'ils sont administrés par voie orale. Ces effets incluent l'inhibition de la colonisation spécifique due à l'effet du métabolisme microbien (exclusion compétitive) et la stimulation des cellules PMN au niveau intestinal (265). Les vaccins tués sont incapables d'induire ces effets. Les vaccins tués quant à eux peuvent être rapidement détruits et éliminés par l'hôte, ils sont faiblement immunogènes et sont incapables d'induire les cellules T cytotoxiques (190). Néanmoins, les vaccins vivants présentent des inconvénients quant à la

sécurité pour les oiseaux et les humains. L'utilisation de vaccins vivants demande une attention particulière pour les aspects suivants: la capacité de la dissémination des pathogènes des individus vaccinés aux individus non vaccinés (d'oiseau à oiseau ou d'oiseau à autre espèce); la présence des bactéries de la souche vaccinale dans les fientes, les œufs et les différentes sécrétions; un retour à la virulence ou le transfert de gènes résistants aux antibiotiques à d'autres microorganismes (75).

#### 2.4.2.5 Vaccination contre SE et la réponse immunitaire chez les volailles

Les vaccins tués utilisés chez les volailles pour contrer des infections causées par des salmonelles qui n'ont pas de spécificité d'hôte ont des succès très variables. Les différentes études ont rapporté les effets variables des vaccins tués sur l'excrétion fécale, la colonisation intestinale et celle des organes internes. Des observations (160, 252) ont démontré que le vaccin tué peut être utilisé pour diminuer la mortalité. Cet effet est lié à la colonisation et à l'excrétion fécale, n'est pas clair car l'infection à SE est généralement asymptomatique. Néanmoins, des résultats effectifs du vaccin ont été également observés. Ainsi l'utilisation de la bactérine (Layermune) a réduit l'incidence de la contamination des œufs (analyse faite sur des échantillons d'œufs liquides) (277).

La vaccination intra-vaginale des poules (à 38 semaines et à 42 semaines d'âge) par une bactérine de SE (émulsion dans l'huile), suivie par une infection expérimentale, a aussi démontré une moindre excrétion fécale, et une moindre colonisation des ovaires et des rates (186). Ainsi, après l'infection, 19 % des œufs des poules vaccinées étaient positifs tandis que ce taux était de 37% chez les poules non vaccinées. Cependant, lors d'une étude terrain où des bactérines autologues ont été utilisées dans dix troupeaux (dont un contrôle négatif), avec un protocole comportant une ou deux

immunisations à différents intervalles, les pourcentages des prélèvements positifs de l'environnement et ceux des organes internes ont été plus élevés chez les troupeaux vaccinés que chez le troupeau contrôle (64). De plus, la vaccination des poules à la fin du cycle de ponte (70 semaines d'âge) par un vaccin tué n'a pas significativement eu d'effet sur la réduction de l'excrétion de SE (195).

L'immunisation des oiseaux de 2 semaines d'âge avec une seule dose par voie orale ou intramusculaire, par un SE inactivé encapsulé dans des microsphères biodégradées semble une alternative intéressante aux vaccins classiques. Ces oiseaux qui sont ensuite infectés avec une dose de  $10^9$  CFU/oiseau à 6 semaines d'âge ont démontré une diminution de l'excrétion fécale et de la colonisation des organes internes (160). Récemment, les recherches ont permis de mieux comprendre la réponse immunitaire humorale et la réponse immunitaire cellulaire. L'utilisation d'un vaccin tué induit les réponses cellulaires primaires plus élevées que celles d'un vaccin sous-unitaire. Cependant, les réponses cellulaires secondaires sont similaires chez les oiseaux vaccinés par ces vaccins. La production des interleukines (IL) n'était pas différente entre le vaccin tué et le vaccin sous-unitaire. Le niveau des IL-2 et IL-6 dans le sang peut être observé à une semaine post-immunisation chez tous les groupes vaccinés par ces deux vaccins par rapport au groupe contrôle (sans vaccination). Néanmoins, la réponse IMC est limitée principalement à l'antigène du flagelle pour les deux types vaccins (203). L'effet d'un vaccin tué commercial versus un vaccin vivant a aussi été évalué par Babu et al. (2003) (11). Le vaccin vivant a été plus efficace que le vaccin tué parce que ce vaccin induit l'augmentation de la prolifération des splénocytes (les lymphocytes T et B). Les poules vaccinées par le vaccin vivant présentaient une augmentation des cellules T-CD4 mais une diminution des cellules T-CD8 et TCR-

γδ. Au cours d'une expérience évaluant l'effet de ces vaccins contre SE suite à une infection expérimentale, l'augmentation des anticorps sériques a été observée chez les oiseaux vaccinés par le vaccin tué. Par contre, les oiseaux vaccinés avec un vaccin vivant ont présenté une prolifération des lymphocytes de la rate et une excrétion moindre des salmonelles dans les fientes. Le groupe contrôle (non vacciné, non infecté) de cette expérience présentait une diminution des cellules T-CD3 et une augmentation des cellules B par rapport aux groupes infectés (avec et sans vaccination). Cette étude a donc démontré que le vaccin vivant protège des oiseaux contre l'infection à SE probablement grâce à l'IMC (10). Cependant la différence entre les deux types de vaccins pourrait aussi être due à la route d'inoculation. En effet, l'injection intramusculaire utilisée pour les vaccins tués, pourrait être moins efficace que l'immunisation par la voie orale (18). Afin de stimuler l'immunité locale au niveau intestinal ou au niveau de l'oviducte, les vaccins tués doivent avoir des effets sur ces organes. L'utilisation de liposomes (90) ou la vaccination intra-vaginale (186) semblent améliorer l'efficacité de la vaccination contre SE.

Un vaccin combiné de SE et ST, tous deux croissant en condition restrictive de fer (53) et injecté par voie intramusculaire à 1 jour d'âge et à 4 semaines d'âge, a diminué l'excrétion fécale. Ainsi, moins de 30% des oiseaux vaccinés ont excrété des salmonelles, alors que plus de 80% des oiseaux non vaccinés excrétaient des salmonelles à 10 jours post-infection.

Plusieurs nouvelles préparations de vaccins ont récemment été élaborées afin d'obtenir des troupeaux exempts à SE et indirectement d'avoir des œufs sains. La vaccination des poules par la voie orale avec des vaccins vivants des souches de TAD *Salmonella vac(R) E* et TAD *Salmonella vac(R) T* a diminué la contamination interne



des œufs à *Salmonella* (91). Un vaccin vivant préparé avec des mutants de SE atténués sans flagelle (DeltaguaBDeltafliC) a permis de protéger les organes internes contre l'invasion par une souche virulente de SE. Néanmoins, ce vaccin n'a pas eu d'effet sur la colonisation intestinale (2). Un autre vaccin couramment utilisé pour la prophylaxie contre SE, a initialement été développé pour immuniser contre *S. Gallinarum* (la souche *S. Gallinarum* 9R). Ce vaccin offre une protection croisée contre SE (17), un membre du même séro-groupe. La vaccination de 80 troupeaux commerciaux par *S. Gallinarum* 9R au Pays-Bas a révélé que le niveau de l'infection à SE était moins élevé chez les troupeaux vaccinés (2.5 %) que chez les troupeaux non vaccinés (11.5%) (84). L'utilisation du gène de fimbriae *sefA* provoque aussi une réponse immunitaire contre SE chez les volailles. Cette réponse est liée à la sécrétion d'IgA au niveau intestinal (7 jours post vaccination) et de la bile (à partir de 14<sup>ème</sup> jour à 21<sup>ème</sup> jour post vaccination) (162).

Les vaccins sous-unitaires ont aussi été utilisés chez les volailles. Les préparations de vaccins à partir de protéines de la membrane externe (OMPs) avec adjuvant sont capables de diminuer l'excrétion de SE chez les volailles (179). Khan et coll., (2003) (143) ont immunisé par voie sous-cutanée des oiseaux de 9 semaines d'âge avec deux OMPs (75,6 KDa et 82,3 KDa), suivi par deux immunisations (S.C) à intervalle de 2 semaines. Les deux OMPs sélectionnées jouent un rôle d'attachement de SE aux cellules épithéliales intestinales (80). L'immunisation avec ces protéines a entraîné une diminution de la colonisation caecale d'environ 1000 fois lorsque les oiseaux furent infectés oralement avec  $8 \times 10^8$  CFU d'une souche virulente de SE (143).

D'autres vaccins vivants atténués ont été développés par mutation des gènes ciblés. La modification génétique des souches vaccinales a pour but de réduire les risques de

dissémination ou de persistance dans l'environnement des salmonelles. Ces vaccins induisent en même temps une réponse immunitaire adaptative. Il serait possible que quelques mutations puissent avoir des conséquences sur l'inhibition de colonisation au niveau de l'intestin des jeunes oiseaux (16). Les gènes qui codent pour des fonctions métaboliques et des facteurs de virulence sont des cibles principales pour la production des souches vaccinales sécuritaires. Les vaccins élaborés ciblant les deux mutations de SPI-1 (*hilA and SipA*) et SPI-2 (*ssrA*) ont montré une réduction de la colonisation au niveau des organes internes et des caecums chez les oiseaux après l'infection expérimentale par une souche virulente de SE (36).

Selon les résultats de notre recension de littérature, l'hypothèse de cette étude est que les vaccins commerciaux actuellement disponibles ne parviennent pas à protéger ni les poules pondeuses contre l'infection à SE, ni leurs œufs destinés à la consommation. De même, ils ne préviennent pas la transmission horizontale lors d'exposition à SE à différents stades de la production. Nos objectifs sont donc les suivants :

- Étudier la réponse immunitaire suite à la vaccination contre SE avec deux bactérines commerciales chez les poules pondeuses et deux protocoles de vaccination
- Déterminer la protection conférée par ces vaccins contre l'infection à SE, tant chez l'animal (inoculé ou exposé à un oiseau infecté) que chez les œufs, au cours d'un cycle de production chez la poule pondeuse
- Étudier l'immunogénicité des protéines suite à l'infection expérimentale ou naturelle chez la poule pondeuse afin d'élaborer un vaccin à base de microsphères contre l'infection à SE

Pour réaliser ces objectifs, voici le design expérimental que nous avons utilisé :

- Modèle expérimental
  - Oiseaux

Les oiseaux utilisés dans notre étude ont été achetées d'une source négative à SE, tel que déterminé par le programme de surveillance de la FPOCQ. Parallèlement, nous avons testé ces oiseaux lors de leur entrée au Complexe avicole Donald McQueen Shaver (Université McGill) pour vérifier le statut négatif à SE par des écouvillonnages cloacaux. Ces prélèvements ont été individuellement récoltés chez tous les oiseaux expérimentaux. Une étape d'enrichissement avec un milieu sélectif pour *Salmonella* a été utilisée pour l'isolement, de même qu'un test PCR avec amorces spécifiques pour SE (268). Nous pouvons donc raisonnablement conclure que les oiseaux utilisés pour le projet étaient exempts de SE.

Afin d'imiter ce qui se passe sur le terrain, la race des oiseaux utilisée a été une race commerciale utilisée pour la production d'oeufs, soit la poule pondeuse de la compagnie Lohmann. Cette race a d'ailleurs été étudiée dans plusieurs études antérieures portant sur la réponse immunitaire (10, 11, 22), l'excrétion de SE dans les fèces (195) et lors d'infections expérimentales (98, 103). Notre étude s'est principalement centrée sur la fin du cycle de ponte, cycle qui est relativement long chez les poules pondeuses (soit jusqu'à 65 semaines d'âge). Dans plusieurs études portant sur l'effet de la vaccination, l'âge des oiseaux est souvent de moins de 45 semaines d'âge et la réponse immunitaire n'est pas évaluée sur plusieurs semaines suite à la vaccination (11, 186, 277). De plus, la protection post-vaccinale contre une infection expérimentale n'a jamais été évaluée en fin de ponte, soit au moment où la

résistance des oiseaux serait théoriquement plus faible, les oiseaux étant plus susceptibles aux pathogènes.

- Vaccins

Deux vaccins commerciaux ont été utilisés dans notre projet (Layermune® SE, Biomune Co., KS.USA et MBL SE4C, Lohmann Animal Health International, USA). Ces deux bactérines contiennent des souches inactivées de SE dans une émulsion (eau dans huile). La bactérine Layermune est utilisée aux É.U. depuis 1992 pour vacciner les troupeaux pondeurs commerciaux (64), et a été utilisée dans différentes études afin d'évaluer la contamination des œufs (277), la colonisation caecale (47, 195), celle des organes internes (186) et la réponse immunitaire humorale (IgG) (213). Néanmoins, la protection conférée face à une infection expérimentale n'est pas claire. Quant à la bactérine MBL SE4C, aucune étude scientifique n'est rapportée dans la littérature. Tel que mentionné précédemment, une forte réaction tissulaire a été observée suite à la vaccination avec la bactérine Layermune (37). D'ailleurs, un rapport a décrit les changements histologiques induits au site d'injection par la bactérine Layermune (258). Cette réaction est probablement causée par l'adjuvant incorporé dans cette bactérine. Malheureusement, nous n'avons pas l'information concernant les adjuvants utilisés chez ces bactérines commerciales, cette information étant jugée confidentielle par les compagnies.

Nous avons respecté le mode d'emploi des compagnies pharmaceutiques en ce qui concerne la dose et la voie d'administration, Deux protocoles ont été utilisés, soit selon la recommandation de la compagnie en immunisant les oiseaux avec deux injections par voie sous-cutanée (S.C), soit selon la réalité du terrain qui consiste à immuniser les oiseaux avec une seule injection (64).

La voie d'immunisation est un des facteurs principaux influençant l'immunité conférée par un vaccin tué SE. Timms et al. (1990) (253) ont rapporté qu'une seule vaccination par voie sous-cutanée avec un vaccin SE lysotype 4 inactivé ( $10^{11}$  CFU/ml et 50% huile) pouvait protéger des oiseaux contre une infection avec  $10^9$  CFU d'une bactérie SE virulente.

- Souche bactérienne pour les tests et l'infection expérimentale

Une souche de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis provenant de l'environnement de fermes de poules a été choisie pour les tests de phagocytose, de survie, pour le test ELISA ainsi que pour l'infection expérimentale. Cette souche, un *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis lysotype 4, a été identifiée par le Laboratoire d'épidémiologie animale du Québec (LEAQ). Ce lysotype n'est pas fréquemment isolé au Québec chez les poules pondeuses (163), mais au plan de la santé publique, les lysotypes 4 et 13 sont les lysotypes prédominants, représentant chacun environ 24 % de tous les isolats testés de source humaine infecté avec *Salmonella* spp. en 2006 (211).

Le lysotype 4 a été utilisé dans plusieurs études chez les volailles et ses caractéristiques, sa virulence, sa pathogénicité et sa transmission sont connues (8, 31, 100, 101, 105, 128, 148, 229, 264). Ces observations fournissent ainsi une base scientifique pour évaluer l'effet de la vaccination sur la protection contre une infection par cette souche bactérienne connue.

Un problème important lors du design d'une infection expérimentale est la détermination de la dose bactérienne d'inoculation. Nous avons utilisé une forte dose ( $2 \times 10^9$  CFU /oiseau) afin d'augmenter nos chances d'observer les signes cliniques et les lésions chez les oiseaux infectés, l'excrétion des salmonelles,

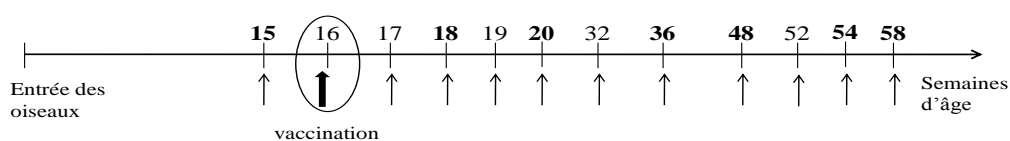
l'invasion des organes internes ainsi que la contamination des œufs et l'infection naturelle chez les oiseaux en contact.

L'utilisation d'une forte dose infectante de SE est acceptée dans la littérature lorsque les pathogènes sont inoculés par voie orale (11, 53, 264). De plus, les oiseaux âgés sont en général plus résistants à une infection que les jeunes (228). Ceci a été confirmé tant par le taux de mortalité (0%) que les signes cliniques peu sévères observés chez les oiseaux inoculés au cours de notre étude. L'utilisation d'une forte dose infectante augmente aussi les chances d'observer des changements sur les sous-populations lymphocytaires (cellules T et B) pour évaluer l'IMC (7) ainsi que l'augmentation des d'IgG sériques (118).

- La vaccination, l'infection expérimentale et l'échantillonnage

Figure 8. Détail dans le temps des manipulations pour les groupes ayant reçu une seule immunisation (incluant le groupe contrôle)

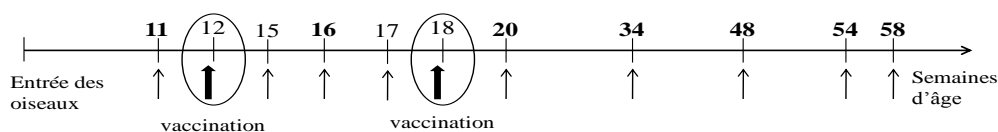
Protocole A: une seule immunisation avec Layermune/MBL SE4C



- Prise de sang (IgG) pour l'ELISA: 15, 18, 20, 36, 48, 54 et 58 semaines d'âge
- Prise de sang pour la flambée oxydative: 15, 18, 20, 36 et 52
- Prise de sang pour la survie intracellulaire: 15 et 32
- Grattage des mucus (IgA) pour l'ELISA: 15, 17 et 20
- Échantillonnage (les rates) pour la mesure des lymphocytes: 15, 17 et 19

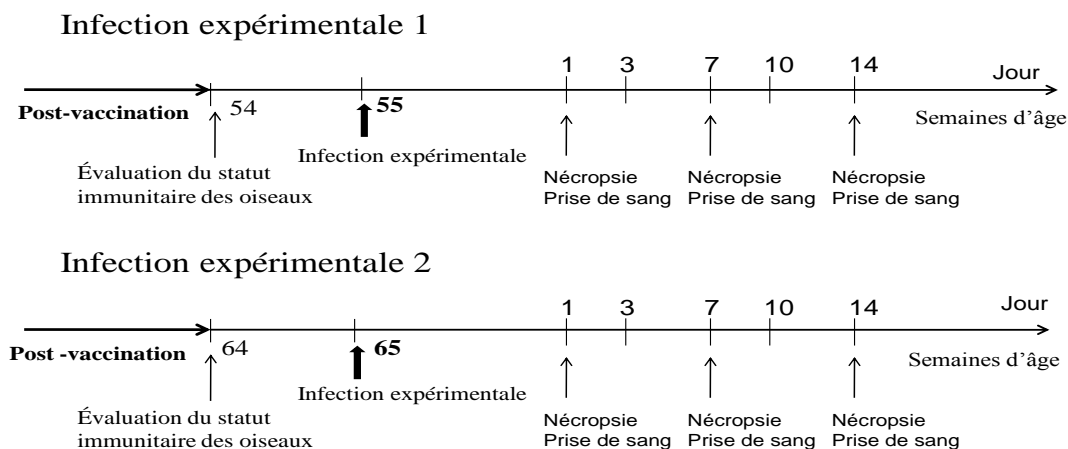
Figure 9. Détail dans le temps des manipulations pour les groupes ayant reçu deux immunisations (incluant le groupe contrôle)

Protocole B: 2 immunisations avec Layermune/MBL SE4C



- Prise de sang (IgG) pour l'ELISA: 11, 16, 20, 34, 48, 54 et 58 semaines d'âge
- Prise de sang pour la flambée oxydative: 11, 16, 18, 38 et 54
- Prise de sang pour la survie intracellulaire: 17 et 34
- Grattage des mucus (IgA) pour l'ELISA: 11, 15 et 20
- Échantillonnage (les rates) pour la mesure des lymphocytes: 11, 15 et 20

Figure 10. Detail dans le temps des manipulations lors des deux infections expérimentales pour tous les groupes



- Évaluation du statut immunitaire des oiseaux: ELISA (IgG et IgA), phagocytose et survie intracellulaire, flambée oxydative
- Signes cliniques / lésions : observation post inoculation (J1 - J10)
- Écouvillons cloacaux: J1, J3, J7, J10, J14
- Nécropsie : ELISA( IgA/iléon et oviducte), PCR (foie, rate, ovaires, oviducte, œufs)
- Prise de sang: ELISA (IgG)

**Chapitre 3. ARTICLE 1**

**Immune response following *Salmonella* Enteritidis vaccination with two  
commercial bacterins in laying hens**

**Manuscrit accepté pour publication dans la revue**

**Canadian Journal of Veterinary Research**



### **Responsabilités des coauteurs dans cet article**

Dans ce premier article, j'ai participé à la mise au point des protocoles pour la phagocytose, la survie intracellulaire, la flambée oxydative, la mesure des sous-populations des lymphocytes B et T avec l'aide technique d'Annie Desrosiers. De plus, nous avons réalisé les manipulations et l'analyse des résultats à la cytométrie ensemble. J'ai mis au point le protocole pour l'extraction des protéines bactériennes avec l'aide d'Annie Desrosiers. J'ai mis au point le protocole pour l'ELISA maison et la récolte des sécrétions mucoales (IgA) avec les conseils techniques de Dre Ann Letellier. Au niveau technique, j'ai participé à la majorité des manipulations pour la vaccination, les prises de sang, les nécropsies et les écouvillonnages avec l'aide technique de Dre Boulianne, Dr Quessy, les techniciens, et mes collègues étudiants. J'ai compilé et participé à l'analyse des données avec le statisticien. J'ai analysé et interprété l'ensemble des données et écrit en majeure partie l'article.

Les Drs Boulianne, Letellier, et Quessy ont supervisé la planification de l'étude, l'élaboration des protocoles, l'interprétation des résultats et l'écriture de l'article.

Immune response following *Salmonella* Enteritidis vaccination with two commercial bacterins in laying hens

Thi Q.L. Tran<sup>A</sup>, Sylvain Quessy<sup>B</sup>, Ann Letellier<sup>B</sup>, Annie Desrosiers<sup>B</sup> and Martine Boulianne<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Department of Clinical Sciences, <sup>B</sup>Department of Microbiology and Pathology,

Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St.Hyacinthe, Quebec, Canada

This paper is part of a PhD thesis by Thi Quynh Lan Tran.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, vaccination, bacterin, immune response, laying hens

## **Abstract**

The humoral and cell-mediated immune (CMI) response to two commercial killed *Salmonella* Enteritidis (SE) vaccines (Layermune and MBL SE4C) was evaluated in laying hens. Layers were distributed in two experimental groups. The first received a single immunization at 16 weeks of age while the second experimental group was immunized at 12 and again at 18 weeks of age. Serum IgG antibodies were measured with a commercial SE ELISA kit and showed persistent levels from 3 to 32 and 34 weeks post-vaccination. The vaccination protocol with two immunizations showed a higher seroconversion level than the single vaccination. However, our results for bacterial intracellular survival indicated that IgG titers were not linked with bacterial killing. Local IgA production was measured in the intestines and oviducts with an in-house SE whole cell antigen ELISA. Only the MBL SE4C vaccine elicited IgA antibody production when tested on intestine and oviduct mucosal secretions, 3-weeks post-vaccination in both immunization protocol groups. To evaluate the CMI response, the splenic T cells and B cells populations were analyzed using flow cytometry. The CD3/B cell ratio decreased 3 weeks after the second immunization in the twice vaccinated Layermune group due to an increase in B cells.

## Introduction

During the past two decades, the number of human cases of *Salmonella* Enteritidis (SE) infections in industrialized countries has increased with most of these SE foodborne infections associated with egg consumption (1). Various strategies, including vaccination, have been used in the industry to control SE infection and contamination in layers. Both live and killed *Salmonella* vaccines are commercially available. Since vaccination with live SE products is prohibited in many countries, many must rely on bacterins. Most of the studies pertaining to these bacterins have investigated post-vaccine SE shedding overtime (2-4). Only a few have looked into the immune response following vaccination, and these studies were limited to young chickens (< 4 weeks of age) (5-8).

Bacterins have been used to control host non-specific *Salmonella* infections in poultry but variation in protection has been observed (3, 9-12). For example, autologous vaccines have been used with little information available on their efficacy in face of a field challenge (13). Killed *Salmonella* vaccines can confer partial protection against intestinal colonization, fecal shedding, systemic spread and egg contamination (2, 8, 11, 14). However, clinical observations reported that flocks vaccinated with a bacterin showed similar organ and egg contamination levels compared to non vaccinated flocks (2). In another study, the post-vaccination cell-mediated immune response to SE with a bacterin or a subunit vaccine was transient and mainly limited to the SE flagella (7). Several studies have suggested that live attenuated vaccines are more effective than bacterins in protecting birds from SE infection (5, 9, 15-17). Because of the potential risks associated with the use of live

attenuated vaccines, such as reversion to virulence, this option is not acceptable for many countries, hence the need to further study the efficacy of killed vaccines.

This project was therefore conducted to evaluate the effect of two available commercial bacterins on the immune response of layer hens. In our study, SE free pullets from commercial laying farms were vaccinated with two killed vaccines (Layermune, Biomune Co., KS, USA and MBL SE4C, Lohmann Animal Health international, USA) and subjected to two different vaccination regimens. Humoral responses were evaluated by ELISA and cellular responses were assessed via flow cytometry. Results of this study may provide useful information to optimize protection of layer hens against SE and for managing future SE control programs.

### **Materials and methods**

The experimental procedures and protocols were undertaken in accordance with the standards relating to the animal care and management guidelines of the University of Montreal and McGill University with authorization from their respective Ethics Committee of Animal Experimentation.

**Laying hens and housing.** Four hundreds 11 week-old Lohmann White LSL hens were purchased from a commercial source, previously tested and approved SE-free by the Quebec Egg Board and transported to the McGill University's Donald McQueen Shaver Poultry complex. Pullets were randomly distributed in cages (three pullets per cage), wing tagged according to their treatment group and fed according to the company program and received *ad libitum* water. Room temperature was set at 20°C degrees and the lighting program was similar to that of commercial pullets of

similar age. The SE free status of the birds was verified in the week following birds' placement by cloacal swabbing.

**Vaccines and vaccination.** Two killed vaccines (bacterins) were evaluated. Both bacterins contain inactivated strains of SE in a water-in-oil emulsion (Layermune®SE, Biomune Co., KS, USA and MBL SE4C, Lohmann Animal Health international, USA). Birds were injected with the Layermune vaccine (0.5 ml/hen) and with the MBL SE4C vaccine (0.25 ml/hen) subcutaneously in the neck according to field practice for both vaccination protocols. Control hens were injected with sterile saline (0.9% NaCl). For each experiment, 200 hens were assigned to 3 groups: control (no vaccine but sterile saline), vaccination with Layermune, or MBL SE4C.

Prior to vaccination, birds were given a 7 day acclimation period to their new environment. The two vaccination regimens consisted of either vaccinating the birds once at 16 weeks of age, or twice at 12 and 18 weeks of age.

### **Sample collection and measurements.**

#### ***Local vaccine reaction.***

The local inflammatory reaction following vaccination was evaluated at the injection site by palpation with the same evaluator 5 days post vaccination. The level of local reaction was based on the following score: score 0: no palpable lesion; score 1: a palpable lesion less than 25 mm in diameter; score 2: a lesion with a diameter more than 25 mm.

***Blood samples for ELISA.*** Birds were randomly bled within their treatment group (n = 25 per group per sampling period) from the brachial vein before and 4 weeks after

the first immunization and 2, 16, 30, 40 weeks after the booster dose for groups receiving 2 vaccinations and 2, 4, 20, 32, 42 weeks post-vaccination for groups receiving 1 vaccination.

***Intestinal and oviduct secretions.*** Birds were euthanized with an intravenous injection of phenobarbital. A 10 cm portion of ileum and oviduct (magnum region) was removed aseptically at necropsy from each hen at weeks 1 and 4 post primary vaccination (PV) for groups receiving 1 vaccination and 3 weeks post primary vaccination (PPV) and 2 weeks post secondary vaccination (PSV) for groups receiving 2 vaccinations. Serosal connective tissues and fat were removed aseptically in Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) (Invitrogen, Burlington, ON, Ca.). Ileum and magnum were cut longitudinally with scissors to expose their respective lumen. Mucosal secretions (ileum/magnum length = 1cm x 10cm) were aseptically scraped with a sterile microscope slide and suspended in 5 ml of PBS (pH 7.4) (Invitrogen, Burlington, ON, Ca.). This preparation was vortexed for 10 seconds and centrifuged (3000 g, 20 minutes at 4°C). The supernatant was then filtered through a 0.45 µm filter and conserved at -20°C.

**Detection of sera antibodies (IgG).** Sera were separated by centrifugation at 5000g, for 10 minutes. The immunoglobulin in sera were measured with the *Salmonella* Enteritidis antibody test kit using flagelline antigen (Flockchek SE, Idexx laboratories, Westbrook, Maine 04092, USA) according to the Idexx protocol.

**Detection of mucosal antibodies (IgA).**

***Antigen preparation for ELISA assays.*** Whole cells of SE strain STF-04-4689 supplied by LEAQ (Laboratoire d'épidémiologie-surveillance animale du Québec) were

used as antigen for the ELISA. Briefly, a colony isolated on blood agar was incubated in 100 ml LB Broth Miller (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA) overnight at 37°C with shaking at 150 rpm. The suspension was centrifuged at 2400 g for 20 minutes at room temperature and the pellet was suspended in 5 ml of PBS (pH 7.4). The suspension of bacterial cells was sonicated 15 times for 10 seconds each on ice. Five µl (750 U) of DNase (Invitrogen, Burlington, ON, Ca) was added. This bacterial suspension was then shaken at 150 rpm at 37°C. Cells were disrupted by high pressure in an internal cell pressure in PSI # A-030 (French 40,000 PSI Pressure Cell), the suspension was centrifuged (11 000 rpm for 10 min at 4°C) and the supernatant was stored at -20°C.

***ELISA procedure*** was assessed as described previously by Letellier et al. (2001)(18) with some modifications. Briefly, flat-bottomed 96 polysorp well ELISA plates (Nunc-immuno plate, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) were coated with 100 µl of diluted *Salmonella* whole antigen 1:10 (100 µg/ml) overnight at 4°C. Non-specific binding was blocked by incubating the plate with 2% skimmed milk powder for 1 hour at 37°C. Plates were washed three times for 5 minutes in sodium chloride (0,1M) containing 0.05 % (v/v) Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA).

Intestinal and oviduct mucosal secretion samples were diluted 1:2 in PBS-Tween and were tested in duplicate (100 µl /well) for 1hr at room temperature on each plate. The plates were washed again (3 x 5 min) and conjugate (goat anti-chicken IgA coupled with horseradish peroxidase) (US Biological, Massachusetts, USA) (diluted 1: 5000 in PBS Tween) was added to each well (100 µl /well).



The plates were incubated for 1hr at room temperature, washed, and the bound horseradish peroxidase activities revealed by adding to each well 100 µl substrate solution (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) (ABTS, Sigma – Aldrich, St. Louis, Mo, USA). The plates were incubated for 30 min at room temperature and the absorbance was read at 5, 15, and 30 min (405 nm). Data were collected and the samples were considered positive if their ELISA absorbance values exceeded the mean absorbance value for the negative control samples by more than two standard deviations.

#### **Oxidative burst assay for heterophils.**

The reactive oxygen species (ROS) production during heterophil oxidative burst was measured using 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) as a fluorescent probe. DCFH-DA is oxidized by ROS to fluorescent DCF, which has been widely used for measurement of oxidative response in heterophils by flow cytometric assay (19).

***Blood sampling for heterophil collection.*** Blood samples were taken from the brachial vein into heparin lithium coated vials at 0, 2, 4, 20 and 36 weeks post-vaccination in the single immunization groups, while birds from the two vaccination protocol were bled at 0 and 4 weeks post primary vaccination and 2, 20 and 36 weeks post secondary vaccination.

***Isolation of peripheral blood heterophils.*** Four ml of the heparin lithium-anticoagulated blood was layered over a discontinuous Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) gradient (specific gravity 1.077 over specific gravity 1.119). The gradient was then centrifuged at 700 x g for 30 min. After centrifugation, the

1.077/1.119 interface and 1.119 band containing the heterophils were collected following the manufacturer's instructions and resuspended in D-PBS-G (1g/L D-glucose, GIBCO®, Invitrogen, Burlington, ON, Ca). The suspension was then centrifuged (200g, 10 min), and after two consecutive washes in D-PBS-G the supernatant was collected. Heterophils were counted under a light microscope using a hemacytometer. The cell population was adjusted to a concentration of  $1.25 \times 10^6$  heterophils/ml in D-PBS-G to obtain  $1 \times 10^6$  cells in a 0.8 ml/sample and kept on ice until used.

Cells were loaded with 1  $\mu$ l DCFH-DA (2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate, Molecular Probes, Eugene, USA) 5mM in ethanol 100%. The loaded cells were incubated at 39°C in 5% CO<sub>2</sub> for 15 minutes. One hundred micro-litres of PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) and 100  $\mu$ l D-PBS -G were added in each tube.

***Flow cytometric oxidative burst assay.*** After the addition of PMA to the cells, kinetics was recorded using flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, Germany). Oxidative burst was measured with the geomean in the cytometric assay (The geomean final = the geomean after 60 minutes of incubation with PMA agonist – the geomean before incubation with PMA agonist). Caution was taken to gate adequately the cell population to block out lymphocytes or monocytes.

**Intracellular survival assays.** SE PT4 cells were grown overnight until the end of the exponential growth phase in LB Broth Miller (EMD) and standardized to an optical density of 0.5 at 600 nm.

Briefly, 10 µl of SE culture was added to each falcon tube (BD falcon polystyrene, BD Biosciences, Mississauga, ON, Ca) containing 100 µl of blood. Adhesion and subsequent entrance of bacteria into cells was allowed to proceed for 60 min at 39°C on a rotator. The samples were then washed twice using Dulbecco's modified phosphate buffer saline 1X (D-PBS, Invitrogen, Burlington, ON, Ca). At this point, colistin was added at a concentration of 600µg/ml to kill extracellular bacteria, viability of intracellular bacteria was not affected.

To determine the number of intracellular SE, the sample was incubated at 39°C for 18 hours. Subsequently, the cells were lysed by adding appropriate dilutions in sterile water to each sample and incubating the lysate for 5 min at room temperature to release intracellular *Salmonella*. Appropriate dilutions in sterile water were then plated onto LB agar to determine the number of viable intracellular *Salmonella* (CFU) by colony counting.

### **Lymphocytes subpopulation measurements.**

***Isolation of splenic mononuclear cells.*** The spleen was removed at necropsy. The splenic mononuclear cells (MNC) were isolated from the spleen as previously described (9). Briefly, spleens were washed and minced in Hank's balanced salt solution (HBSS, GIBCO®, Invitrogen, Burlington, ON, Ca) and residual tissues were removed using a cell strainer 40 µm Nylon (BD Falcon, BD Biosciences, Mississauga, ON, Ca). Single cell suspensions from the spleens were overlaid onto the Histopaque (density 1.077g/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) and centrifuged at 400 x g for 30 min at room temperature. MNC obtained from the interface were washed twice with HBSS. The cell concentrations were adjusted to

$1 \times 10^7$  cells /ml with staining buffer (DPBS + 2 % heat inactivated fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) + 0.09% (w/v) sodium azide, pH 7.4)

**Labelling antibodies and flow cytometric analysis.** Monoclonal antibodies against chicken CD3, CD4, CD8 T lymphocytes (CD = Cluster of differentiation) and IgM expressed on B cells were used for flow cytometry. MNC were incubated with monoclonal antibodies in a dilution of 1:125 with staining buffer. Duplicate samples of MNC were stained with R-phycoerythrin-conjugated anti-chicken CD3 and FITC-conjugated anti-chicken IgM (Southern Biotech, Birmingham, USA). Duplicate samples of MNC were stained with R-PE-anti-chicken CD8, and FITC- anti-chicken CD4 (Southern Biotech, Birmingham, USA). The cells were washed twice with PBS at 4°C. Samples were analysed with a FACScan flow cytometer (FACS Calibur, Becton, Dickinson, Germany). Data on  $3 \times 10^4$  viable cells were collected using the Cell Quest program 3.3. For gating purposes, the viable MNC population was determined by forward light scatter versus side light scatter analysis.

**Statistical analysis.** Results for antibody responses, heterophil oxidative burst, splenocyte population ratios and intracellular survival rate were analysed using a linear model with immunization protocol as a factor. Contrasts between protocol means at different time periods were done using the sequential Bonferroni procedure. Intracellular survival data were log<sub>10</sub> transformed before analysis to normalize the data. Data for local inflammatory reaction were analyzed with the exact chi-square test. The level of statistical significance was set at 0.05 throughout. Statistical analyses were carried out with SAS version 9.1 (Cary, N.C.).

## Results

**Serum antibodies responses.** The SE-specific serum IgG titers were compared by ELISA for all groups. The mean OD values of sera are shown in Fig.1 (A) for the groups vaccinated once and (B) for the groups vaccinated twice. The OD values of vaccinated hens were significantly lower than those of control hens at each sampling point after vaccination ( $p < 0.0001$ ), indicating a higher IgG titer. IgG levels remained elevated during the laying period in both vaccination protocols. There was no statistical difference in antibody levels between the two vaccinated groups at any sampling time or with either vaccination protocol. But both groups vaccinated twice showed statistically higher serum titers than groups with a single immunization, until the 32- 34 weeks post-vaccination sampling ( $p < 0.02$ ).

**Mucosal antibodies (IgA) response.** Although the intestinal IgA antibody levels (Fig.2A,B) were low throughout the experiment, there were differences between the two vaccines. The MBL SE4C bacterin group vaccinated once showed a statistically significant increase in intestinal IgA antibody values at week 4 post-vaccination compared to those in the control ( $p = 0.0007$ ) and Layermune bacterin ( $p = 0.001$ ). Similar results were observed with the two vaccination protocols ( $p = 0.004$ ) at 3 weeks post primary vaccination.

The IgA antibody levels in the oviduct (Fig.3A, B) were higher than those measured in the intestines. Similarly to the local intestinal immune response, oviduct IgA titers were significantly higher 3 – 4 weeks post-vaccination in the groups vaccinated with MBL SE4C than in the control groups ( $p = 0.0001$  with single immunization and  $p < 0.04$  with two immunizations).

There was no statistical difference in IgA response between the controls and the groups vaccinated with Layermune for either the intestinal or the oviduct local immune response.

**Heterophil oxidative burst.** The heterophil oxidative burst response of laying hens to two bacterins and immunization protocols were compared. The oxidative burst response was increased 3.2 times at 2 weeks post-vaccination in groups with a single immunization ( $p < 0.001$ ) and 1.7 times at 4 weeks post-vaccination in groups with two immunizations ( $p < 0.001$ ) in comparison with control groups. An age effect with the oxidative burst response increasing in all treatment groups and controls at 20 and 30 weeks post-vaccination was observed.

**Effects of vaccination on splenocytes population ratios.** Results on the evaluation of cellular immune response within the splenocytes population are presented in Fig.4(A) and (B) for the CD3/B cells ratio and in Fig.5(A) and (B) for the CD4/CD8 ratio. There was an increased CD3/B cells ratio at 1<sup>st</sup> week post-vaccination when compared to pre-vaccination ( $p < 0.05$ ) in the MBL SE4C group vaccinated once, but this ratio returned to pre-vaccination values at 3 weeks post-vaccination (Fig. 4A). There was a decreased CD3/B cells ratio in the Layermune group 2 weeks after administering the booster ( $p < 0.05$ ) (Fig.4B). No significant change in the CD3/B cells ratio was observed in the control groups pre-vaccination versus post-vaccination.

Vaccination of 16 week-old hens with a single immunization resulted in increased splenic CD4/CD8 ratio at 3 weeks post-vaccination in the MBL SE4C vaccinated group ( $p < 0.05$ ) (Fig.5A). In the groups receiving two immunizations, the CD4/CD8

ratio was significantly higher at 3 weeks after the first vaccination in the Layermune group when compared to pre-vaccination ( $p < 0.05$ ) (Fig.5B), but returned to its initial level 2 weeks after the booster ( $p > 0.05$ ).

**Intracellular survival assays.** The number of *Salmonella* surviving in the leucocytes at all sampling times in all groups (before vaccination, four months post-vaccination in and with either vaccination protocols) was not different (Table I).

Four months post-vaccination, the number of surviving intracellular bacteria tended to be higher compared to the number of bacteria that survived before vaccination. This increase was significant in the single immunization groups; Layermune ( $p = 0.002$ ), MBL SE4C ( $p = 0.035$ ) and controls ( $p = 0.042$ ). The double immunization protocol induced similar results with higher number of intracellular surviving SE 4 months post-vaccination for the Layermune ( $p = 0.004$ ), MBL SE4C ( $p = 0.005$ ) and control ( $p = 0.0047$ ) groups.

**Local inflammatory reaction.** All pullets vaccinated with a bacterin showed a local inflammatory reaction when compared to controls ( $p < 0.0001$ ). The score of the inflammatory reaction at vaccination site in the Layermune vaccine group (score 1: 46.59 %, score 2: 7.95 %) was greater than for those receiving the MBL SE4C vaccine (score 1: 26.14 %, score 2: 1.14 %) at 16 weeks after a single immunization ( $p < 0.0001$ ). There was an increase in severity of the inflammatory lesion after the second vaccine administration at 18 weeks of age (score 1: 58.44 %, score 2: 11.69 %) compared to the score of the lesions observed after the first immunization at 12 weeks of age (score 1: 28.21 %, score 2: 2.56 %) in Layermune vaccinated groups ( $p < 0.0001$ ).

## Discussion

Our main objective was to better characterize the humoral and cell-mediated immune responses of laying hens vaccinated with two commercially available *Salmonella* Enteritidis bacterins using two vaccination protocols. We were particularly interested in assessing the immune response following a single immunization since this is a protocol producers prefer due to the cost of the vaccine and the stress of handling.

Both vaccination protocols showed an increased seroconversion level with antibody titers being higher in the two immunization protocol until 32 weeks post-vaccination. Immunization with both bacterins induced serum IgG antibody responses which persisted to the end of our sampling period at 42 to 44 weeks post-vaccination.

With regard to systemic humoral response, there are different opinions on the protective effect of vaccination against SE. According to many, the serum antibody titers are of uncertain value as indicators of the extent of protection against *Salmonella* (5, 20). For example, even if a killed vaccine can induce a high SE-specific antibody level, it does not necessarily protect the chickens against SE infection (5).

Since mucosal surfaces are the major sites for SE invasion, the local humoral response might play an important role against *Salmonella* colonization. Initial colonization of the intestines is often followed by invasion through mucosal epithelial cells and dissemination to specific internal organs like spleen, liver, ovaries, oviduct (21). Experimental SE infection has shown that IgA antibodies predominate in the intestinal secretions, peaking one week post-SE infection and persisting during intestinal colonization (22) and for up to 9 weeks post-infection (23). In our study,



mucosal immunity was induced 3 weeks post-vaccination following MBL SE4C injection, as shown by the increased intestinal IgA levels. Such response could limit the multiplication of pathogens within the mucosal lumen, as well as their adhesion (24). It would be interesting to see how long these vaccine generated IgA titers remain or if they are able to protect birds against an infection for the whole laying period i.e., for up to 72 weeks of age.

The main goal in vaccinating layer hens against SE is to reduce or prevent egg contamination. Bacterial infection in the reproductive organs of laying hens may cause contamination of eggs either via the yolk or the albumen. The immune response therefore plays an essential role in preventing infection by *Salmonella* organisms in the reproductive organs (25). After vaccination, the oviduct IgA titers in our MBL SE4C vaccinated group increased three weeks post-vaccination, with higher oviduct IgA levels than those measured in the intestines. A study by Withanage et al. (26) suggested a relationship between the SE-specific antibodies measured in the oviduct and the bacterial clearance. Although a *Salmonella*-specific humoral response in infected laying hens cannot eliminate the bacteria from the reproductive tract, the presence of immunoglobulins in the oviduct could then be sufficient to reduce reproductive tract colonization and the subsequent egg contamination (27).

In chickens, phagocytosis is one of the mechanisms to avoid host infection by *Salmonella* (28). From our results, the number of surviving intracellular SE cells was similar in vaccinated hens to non-vaccinated hens, which indicates that vaccination did not enhance phagocytosis 4 months post-vaccination. We observed that vaccinated laying hens maintained high blood antibodies (IgG) levels during the

whole laying period. Antibodies are effective opsonins which can mediate phagocytosis through antibody receptors present on phagocytic cells (29). Our findings suggest that IgG titers are not a reliable indicator of bacterial killing because these antibodies appear to be non opsonizing antibodies for phagocytosis. Furthermore, an increased intracellular survival, as observed four months after vaccination, not only in vaccinated groups but in control groups, suggested an age-dependent effect in experiment laying hens rather than a vaccination effect. Other authors have reported that phagocytic capacity of heterophils increased over the first week of life (30). However, to our knowledge, there has been no report regarding the increase in *Salmonella* intracellular survival over time either in chickens or in other species.

In our study, the decrease of CD3/B cell ratio in the Layermune vaccine treated group (two immunizations) probably suggests that this bacterin induced B cells maturation since CD3+ cells were not statistically different over time. For the detection of B cells, an anti-chicken IgM antibody was used. Since the majority of circulating B cells expresses IgM on their surface, the membrane bound IgM molecule appears to be an excellent antigen for B cells detection (31). This result is in accordance with the study of Sasai et al. (1997) in which elevated percentage of IgM + lymphocytes were reported (32). Since mature B cells produce three types of immunoglobulins IgG, IgM and IgA (25), an increase in B cells likely correlates with an increasing post-vaccination serum antibody IgG titer. However the same trend was not observed with the single immunization protocol. This might suggest: a) a possible age effect since this group was first vaccinated at 16 rather than 12 weeks of age; b) an intermediate response one week post single vaccination which could not be detected in the two

immunizations protocol due to our sampling design or c) too subtle changes at 3 weeks post single vaccination which could not be detected. Our results demonstrate that there was an increased CD4/CD8 ratio in the MBL SE4C group after the first vaccination, but a second immunization had no effect on this ratio. It is not possible with our data to explain whether there was an age or a vaccination protocol effect for the variations in the CD4/CD8 ratio. *Salmonella* infection generally induces the generation of specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and both T cell populations appear to be important for protection during primary and secondary responses (33, 34).

Poultry heterophils are the first cell type to engage in phagocytosis and killing of pathogens (35). The oxidative burst, which generates reactive radical oxygen species, is one of the main bactericidal mechanisms of heterophils. The results of this study demonstrated that administration of the bacterin induced an increased oxidative burst of heterophils two and four weeks post-vaccination. This reaction would appear to be important as a first line of defense against SE. For example, heterophil-depleted chickens showed a severe morbidity and mortality when a normally sublethal dose of SE was inoculated orally (36). Furthermore, this function appears to be age-dependent since the capability of heterophils to phagocytize increased from day 1 to day 7 in newly hatched chicks (30).

Vaccination with the two commercial SE bacterins induced palpable changes at the injection site when compared to the unvaccinated group with lesions being larger with the Layermune vaccine. Both bacterins contain inactivated strains of *Salmonella* Enteritidis with oil-based adjuvants. In a recent study, a Layermune bacterin injected group showed histological changes at injection site consisting in an epithelioid

granuloma surrounding oily cysts and necrosis with peripheral fibroplasia (37). These lesions are likely the result of the adjuvants which activate the complement via the alternate pathway and induce an inflammatory reaction at the injection site (38). The potential severity of the vaccine reaction at the injection site should therefore be considered when choosing the age, the vaccination site and the vaccine.

In conclusion, our results demonstrated that vaccination with double immunizations was more effective than a single immunization to stimulate the humoral systemic response. Given the limited effect observed on the CMI, it was not possible to assess the role of splenic T cells and B cells on the immune response induced by these two SE bacterins. In contrast to this lack of significant effect on the CMI, the bacterin induced SE-flagella specific antibodies, demonstrated a higher IgG titer after vaccination. It is not clear if this increased antibody response would be associated with the protection of birds against SE infection. The ability of MBL SE4C to induce a local immune response in the intestine and oviduct could be more effective against SE infection than the systemic response. Our results suggest that both bacterins were able to generate an immune response but it is not known if this response generated sufficient titers and/or opsonic antibody production after vaccination to protect birds against a SE challenge.

We are currently studying the SE clearance and immune responses in older laying hens following vaccination and experimental infection. These studies will provide further information regarding the killed vaccines efficacy to protect the laying hens and their eggs from SE challenge.

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank: Dr. Nadia Bergeron, Mrs Manon Tremblay, Karine Giguère, Valérie Normand, Louise Lessard; Mr Mathieu Bélanger, Alexandre Thibodeau, Guillaume Larivière-Gauthier, Ulysse Dandurant-Duranleau and Julien Delisle for their invaluable help in sampling birds and laboratory procedures; Mr Guy Beauchamp for statistical analysis and Mr Denis Flipo for cytometry analysis. This project would not have been possible without fundings from The Fédération des Producteurs d'Oeufs de Consommation du Québec (Québec Egg Board), The Egg Farmers of Canada and The Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec.

## References

1. Methner U DR, Reiche R, and Böhland K. Occurrence of *Salmonellae* in laying hens in different housing systems and inferences for control. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2006; 119 (11-12): 467-473.
2. Davison S, Benson CE, Henzler DJ, and Eckroade RJ. Field Observations with *Salmonella* Enteritidis Bacterins. Avian Dis 1999;43 (4): 664-669.
3. Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, and Houghton S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. Avian Pathol 2002;31 (4): 383 - 392.
4. Piao Z, Toyota-Hanatani Y, Ohta H, Sasai K, Tani H, and Baba E. Effects of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Enteritidis vaccination in layer hens subjected to *S. Enteritidis* challenge and various feed withdrawal regimens. Vet Microbiol 2007;125 (1-2): 111-119.
5. Babu U DR, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D and Heckert RA. *Salmonella* Enteritidis clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. Vet Immunol and Immunopathol 2004;101 (3-4): 251-257.

6. Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, and Heckert RA. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella* Enteritidis vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-[gamma] production. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27 (4): 255-272.
7. Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu U, and Heckert R. Antigen-specific lymphocyte proliferation and interleukin production in chickens immunized with killed *Salmonella* Enteritidis vaccine or experimental subunit vaccines. *Avian Dis* 2003;47 (4): 1331-1338.
8. Liu W, Yang Y, Chung N, and Kwang J. Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens against *Salmonella* Enteritidis after a Single Dose of Killed Bacterium-Loaded Microspheres. *Avian Dis* 2001;45 (4): 797-806.
9. Babu USM, Myers MJ, Okamura M, Gaines D, Yancy HF, Lillehoj H, Heckert RA and Raybourne RB. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91 (1): 39-44.
10. Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S, and Sato S. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis* 1994;38 (4): 717-724.

11. Nakamura M, Nagata T, Okamura S, Takehara K, and Holt PS. The effect of killed *Salmonella* Enteritidis vaccine prior to induced molting on the shedding of *S. Enteritidis* in laying hens. *Avian Dis* 2004;48 (1): 183-188.
12. Uchiya K, Nikai T, and Sugihara H. Difference in the protection against infection with different challenge strains of *Salmonella* Enteritidis by killed vaccine. *Kansenshogaku Zasshi* 1991;65 (11): 1411-1418.
13. Van immerseel FMU, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, and Barrow PA. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect* 2005;133: 959-978.
14. Timms LM, Marshall RN, and Breslin MF. Laboratory and field trial assessment of protection given by a *Salmonella* Enteritidis PT4 inactivated, adjuvant vaccine. *Br Vet J* 1994;150 (1): 93-102.
15. Curtiss R and Hassan JO. Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54 (1-4): 365-372.
16. Adriaensen C DGH, Tian JQ, De Craeye S, Gubbels E, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Ducatelle R, Kumar M, and Hernalsteens JP. A live *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vaccine allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Infect Immun* 2007;75 (5): 2461-2468.



17. Betancor L, Schelotto F, Fernandez M, Pereira M, Rial A, and Chabalgoity JA. An attenuated *Salmonella* Enteritidis strain derivative of the main genotype circulating in Uruguay is an effective vaccine for chickens. *Vet Microbiol* 2005;107 (1-2): 81-89.
18. Letellier A MS, Lessard L, Chénier S, and Quessy S. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can J Vet Res* 2001;65 (3): 168–172.
19. Brousseau P PY, Tryphonas H, Blakley B, Boermans H, Flipo D, and Fournier M. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press ed, 1999.
20. Nagaraja KV, and Rajashekara G. Vaccination against *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infection: Dilemma and Realities. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals: Epidemiology, Pathogenesis, and Control. 1999: 397-404. Last accessed Access Date.
21. Gast RK and Holt PS. Experimental Horizontal Transmission of *Salmonella* Enteritidis Strains (Phage Types 4, 8, and 13A) in Chicks. *Avian Dis* 1999;43 (4): 774-778.
22. Berthelot-Hérault F, Mompert F, Zygmunt MS, Dubray G, and Duchet-Suchaux M. Antibody responses in the serum and gut of chicken lines differing in cecal carriage of *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;96 (1-2): 43-52.
23. Zhang-Barber L, Turner AK, and Barrow PA. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine* 1999;17 (20-21): 2538-2545.

24. Fukutome K, Watarai S, Mukamoto M, and Kodama H. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis antigen. *Dev Comp Immunol* 2001;25 (5-6): 475-484.
25. Yoshimura Y. Significance of local immunity in hen reproductive organs. *Anim Sci J* 2004;75: 183-191.
26. Withanage GSK, Sasai K, Fukata T, Miyamoto T, and Baba E. Secretion of *Salmonella*-specific antibodies in the oviducts of hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;67 (2): 185-193.
27. De Buck J, Van Immerseel F, and Ducatelle HR. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol* 2004;97 (2): 233-245.
28. Kramer J, Visscher AH, Wagenaar JA, and Jeurissen SHM. Entry and survival of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines. *Vet Microbiol* 2003;91 (2-3): 147-155.
29. Tizard IR. *Veterinary Immunology, An Introduction*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 27-31
30. Wells LL, Lowry VK, Deloach JR, and Kogut MH. Age-dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil. *Dev Comp Immunol* 1998;22 (1): 103-109.

31. Berndt A and Methner U. B cell and macrophage response in chicks after oral administration of *Salmonella* Typhimurium strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27 (4): 235-246.
32. Sasai K YK, Lillehoj HS, Withanage GSK, Fukata T, Baba E, and Arakawa A. Analysis of splenic and thymic lymphocyte subpopulations in chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59 (3-4): 359-367.
33. Mittrucker HW and Kaufmann SH. Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. *J Leukoc Biol* 2000;67 (4): 457-463.
34. Berndt A and Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;78 (2): 143-161.
35. He H, Genovese KJ, Swaggerty CL, Nisbet DJ, and Kogut MH. In vivo priming heterophil innate immune functions and increasing resistance to *Salmonella* Enteritidis infection in neonatal chickens by immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;117 (3-4): 275-283.
36. Kogut MH TG, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. The effect of 5-fluorouracil treatment of chicks: a cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leukocytes and natural host defenses. *Poult Sci* 1993;72 (10): 1873-1880.

37. Toyota-Hanatani Y, Inoue M, Ekawa T, Ohta H, Igimi S, and Baba E. Importance of the major Fli C antigenic site of *Salmonella* Enteritidis as a subunit vaccine antigen. *Vaccine* 2008;26 (33): 4135-4137.
38. Vermout SDM, Losson B, and Mignon B. Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann Méd Vét* 2003;147: 393-401.

Table I. Intracellular survival of *Salmonella* Enteritidis in leucocytes following variant immunization protocols in hens, expressed in number of bacteria ( $\times 10^3$  CFU/ml)

Treatments	Single vaccination		Double vaccination	
	Pre-vaccination	4 months post vaccination	Pre-vaccination	4 months post-vaccination
<b>Saline solution</b> <sup>A</sup>	81.33 $\pm$ 103.58	1136.67 $\pm$ 1251.57 <sup>a</sup>	35.20 $\pm$ 46.80	2896.66 $\pm$ 957.09 <sup>a</sup>
<b>Layermune</b> <sup>A</sup>	14.00 $\pm$ 7.54	1770.00 $\pm$ 873.09 <sup>a</sup>	42.80 $\pm$ 27.58	3206.66 $\pm$ 1374.09 <sup>a</sup>
<b>MBL SE4C</b> <sup>A</sup>	66.00 $\pm$ 54.44	1066.67 $\pm$ 547.93 <sup>a</sup>	36.60 $\pm$ 39.81	2490.00 $\pm$ 2867.28 <sup>a</sup>

Data are presented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$  hens/group/sampling period)

<sup>A</sup> Values expressed as mean  $\pm$  standard error. <sup>a</sup> =  $P < 0.05$

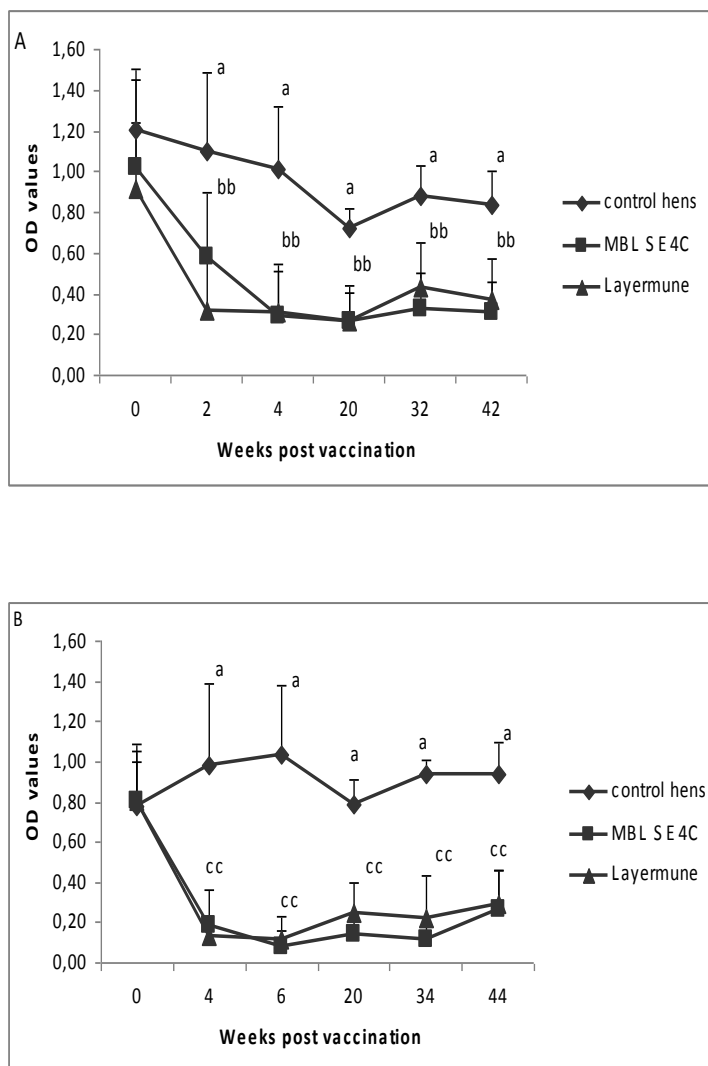


Figure 1. Detection of antibodies (IgG) in sera of laying hens vaccinated analysed by SE Antibody Test kit (Flockchek SE, Idexx)

**(A)** laying hens vaccinated once **(B)** laying hens vaccinated twice. Antibodies (IgG) analysed by SE Antibody Test kit (Flockchek SE, Idexx). Vertical bars indicated the standard errors. Significant differences in mean titers were determined by application of Bonferroni test at  $P < 0.01$ . The mean titers of MBL SE4C vaccinated group (■) and Layermune vaccinated group (▲) were compared with those of control group (◆). The titer of SE-antibodies is inversely proportional to the OD values at 650 nm. Data represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 25$  hens /group/sampling period). a,b,c =  $P < 0.0001$ .

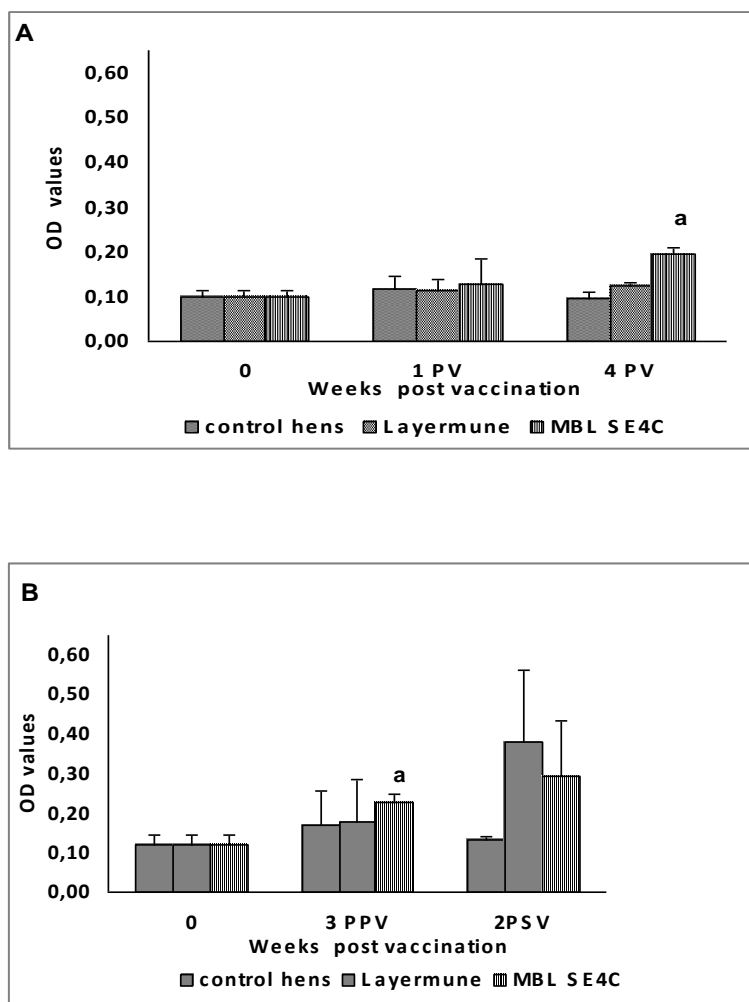


Figure 2. IgA levels in the intestinal mucus of laying hens vaccinated

(A) laying hens subcutaneous SE vaccinated once with subcutaneous SE vaccine. (B) laying hens subcutaneous SE vaccinated twice. *Salmonella* Enteritidis whole cell-specific antibodies (IgA) were detected by ELISA. PV: post vaccination, PPV: post primary vaccination, PSV: post second vaccination. Data represent mean  $\pm$  standard deviation (n = 3 hens / group /sampling period). <sup>a</sup> =  $P < 0.01$

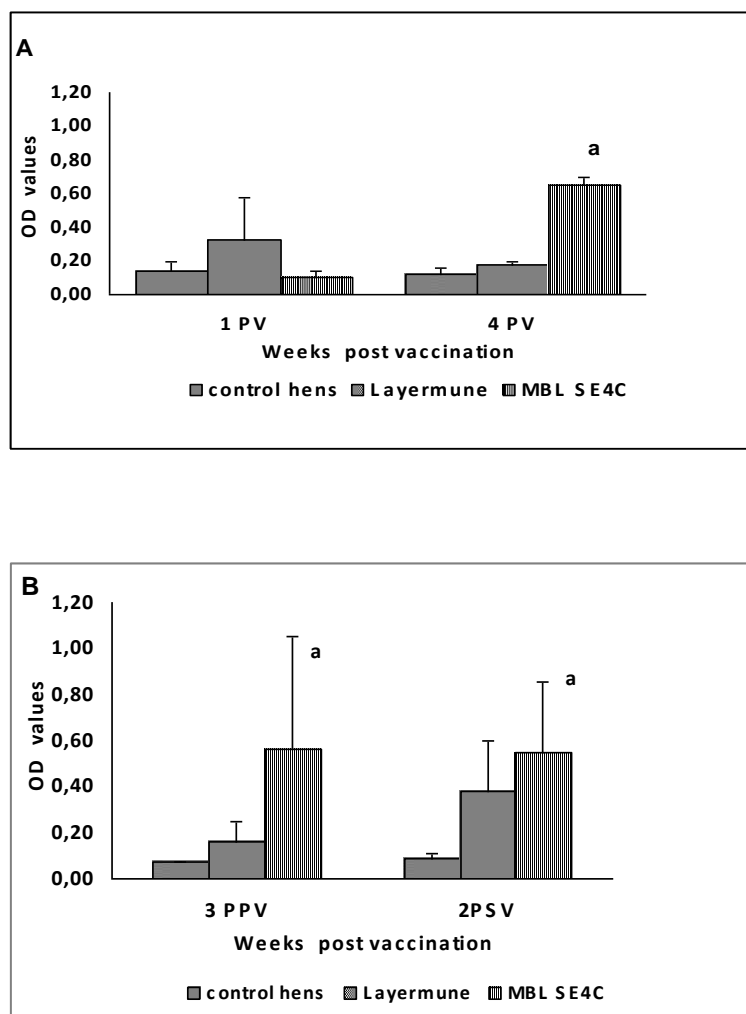


Figure 3. IgA levels in the oviductal mucus of laying hens vaccinated

(A) laying hens vaccinated once with subcutaneous SE vaccine. (B) laying hens vaccinated twice with subcutaneous SE vaccine. *Salmonella* Enteritidis whole cell-specific antibodies (IgA) were detected by ELISA. PV: post vaccination, PPV: post primary vaccination, PSV: post second vaccination. Data represent mean  $\pm$  standard deviation (n = 3 hens/group/sampling period). <sup>a</sup> =  $P < 0.01$ .



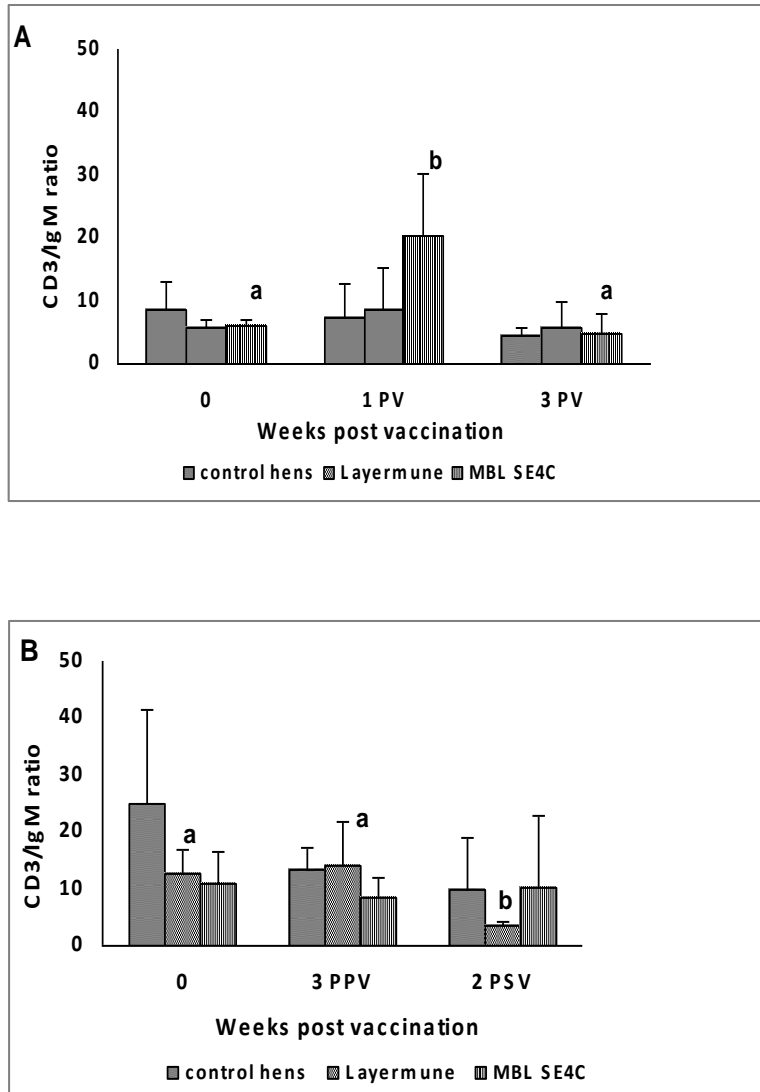


Figure 4. The CD3/IgM cells ratio after immunization with single immunization (A) and two immunizations (B)

PV: post vaccination, PPV: post primary vaccination, PSV: post second vaccination. PV: post vaccination, PPV: post primary vaccination, PSV: post second vaccination. Data represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$  hens/group/sampling period). <sup>a,b</sup> =  $P < 0.05$ .

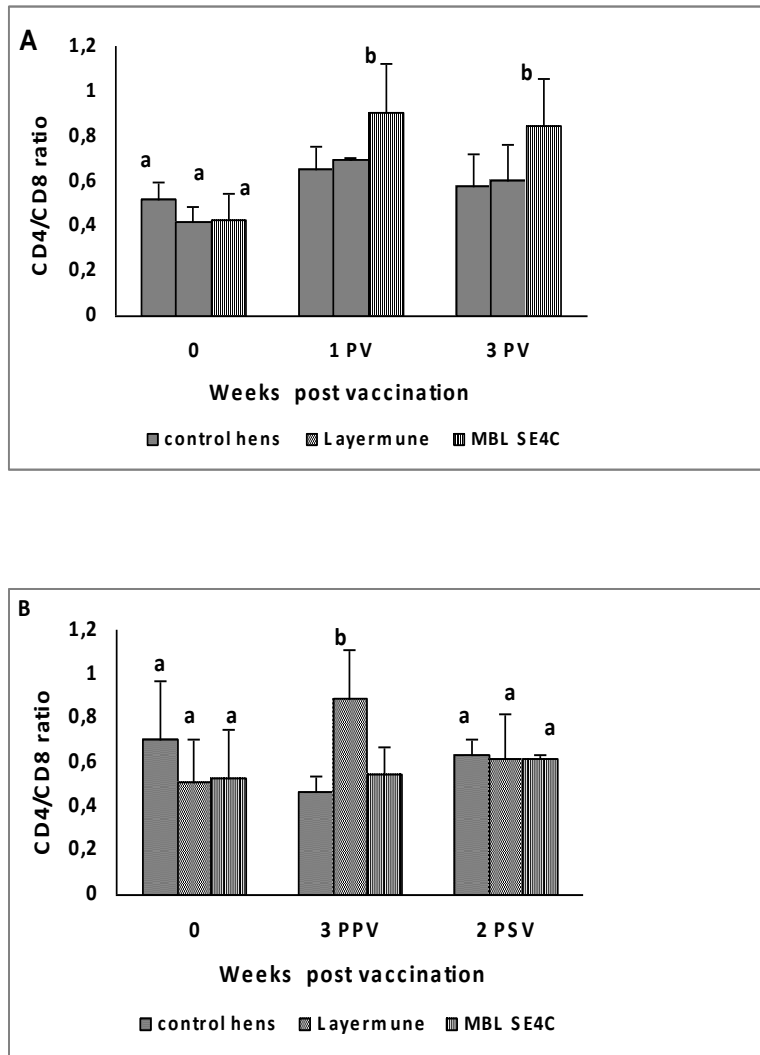


Figure 5. The CD4/CD8 ratio after immunization with single immunization (A) and two immunizations (B).

PV: post vaccination, PPV: post primary vaccination, PSV: post second vaccination. PV: post vaccination, PPV: post primary vaccination, PSV: post second vaccination. Data represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$  hens/group/sampling period). <sup>a,b</sup> =  $P < 0.05$ .

**Chapitre 4. ARTICLE 2**

**Effects of *Salmonella* Enteritidis bacterins vaccination  
on layers' protection and immune response**

**Manuscrit soumis pour publication dans la revue**

**Avian Diseases**

### **Responsabilités des coauteurs dans cet article**

Dans ce deuxième article, au niveau technique, j'ai participé à la majorité des manipulations pour la vaccination, les prise de sang, l'infection expérimentale, les nécropsie, les écouvillonnages et l'extraction ADN avec l'aide technique des Dre Boulianne, Letellier et Quessy, les techniciens, mes collègues étudiants et les stagiaires. Pour les analyses bactériologiques des écouvillons, les techniciens avaient réalisé une grande partie des manipulations. J'ai mis au point le protocole pour l'extraction des ADN à partir des écouvillons, des organes (foie, rate, ovaire, oviducte), des jaunes d'œuf ainsi le protocole pour l'analyse des échantillons par PCR avec l'aide de M. Alexandre Thibodeau. J'ai participé à la mise au point des protocoles pour la phagocytose, la survie intracellulaire, la flambée oxydative, la mesure des sous-populations des lymphocytes B et T avec l'aide technique de Mme Annie Desrosiers. De plus, nous avons réalisé les manipulations et l'analyse des résultats à la cytométrie ensemble. J'ai mis au point le protocole pour l'extraction des protéines bactériennes avec l'aide d'Annie Desrosiers, de même que le protocole pour l'ELISA maison et la récolte des sécrétions mucoales (IgA) avec les conseils de Dre Letellier. J'ai compilé et participé à l'analyse des données avec le statisticien. J'ai analysé et interprété l'ensemble des données et écrit en majeure partie l'article.

Les Drs Boulianne, Letellier, et Quessy ont supervisé la planification de l'étude, l'élaboration des protocoles, l'interprétation des résultats et l'écriture de l'article.

Effects of *Salmonella* Enteritidis bacterins vaccination on layers' protection and immune response

Thi Q.L. Tran<sup>A</sup>, Sylvain Quessy<sup>B</sup>, Ann Letellier<sup>B</sup>, Annie Desrosiers<sup>B</sup>, Alexandre Thibodeau<sup>B</sup> and Martine Boulianne<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Department of Clinical Sciences, <sup>B</sup>Department of Microbiology and Pathology,

Faculty of Veterinary Medicine, Montreal University, Quebec, Canada

## Summary

In this study, we evaluated the protection conferred by MBL SE4C and Layermune vaccines, two commercial killed *Salmonella* Enteritidis (SE) bacterins. Four groups of layer hens were vaccinated with two immunization schedules either at 12 and 18 wks or at 16 wks of age. The control group was injected with a saline solution. The layer hens were later inoculated per os with  $2 \times 10^9$  CFU of SE PT4 strain either at 55 or 65 weeks of age. Serum IgG and mucosal IgA antibodies were measured with an in-house SE whole cell antigen ELISA. The phagocytosis, oxidative burst, splenic T and B cells populations were analyzed using flow cytometry. Clinical signs, mortality, fecal shedding, egg yolks contamination and organ invasion by SE were assessed to evaluate vaccine protection. Potential horizontal transmission from inoculated laying hens to non-inoculated laying hens, housed in the same isolator unit, was also evaluated. In this experiment, only MBL SE4C bacterin administered twice reduced SE shedding rate in inoculated laying hens and their exposed cage-water. There was no relationship between high IgG level and low SE isolation rates in organs and egg yolks. Significantly higher mucosal IgA levels were observed at day 1 and 7 days post challenge in oviduct of all vaccinated groups (except the twice vaccinated Layermune group) compared to the control group. Humoral efficacy to protect from SE contamination of egg yolk was only observed in MBL SE4C vaccinated groups. These results suggest that these bacterins were able to confer only partial protection against this SE PT4 strain infection.

**Key words:** *Salmonella* Enteritidis, vaccination, bacterin, challenge, immune response, laying hens

Abbreviation: CD = Cluster of differentiation; CMI = Cellular mediation immunity; DCFHDA = 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate ; D-PBS = Dulbecco's modified phosphate buffer saline; D-PBS-G= D- Phosphate buffer saline- Glucose; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; FCS = Fetal calf serum; FITC = Fluorescein Isothiocyanate; HBSS = Hank's balanced salt solution; HRP = Horseradish peroxidase; KV = Killed vaccine; MNC = Mononuclear cells; PBS = Phosphate buffered saline; PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate; R-PE = R-phycoerythrin ; RV = Rappaport Vassiliadis ; SE PT4 = *Salmonella* Enteritidis phage type 4

## Introduction

*Salmonella* Enteritidis (SE) is one of the most frequently isolated *Salmonella* serovar associated with foodborne outbreaks (38). Illness from SE is linked to consumption of chickens, eggs, and foods that contain eggs (7). In Canada, SE was ranked 4<sup>th</sup> among all the *Salmonella* isolated from non human sources. SE was most prevalent with 23% of the *Salmonella* infections in human (35). In Québec, the percentage of SE positive hen houses was 2.26 % among all positive *Salmonella* serotypes (29). Various strategies, including vaccination, have been used in the industry to control SE infection in layers and egg contamination. There are two types of commercially available *Salmonella* vaccines: live bacteria and bacterins. Since live SE vaccination is prohibited in many countries, most must rely on bacterins. Bacterins currently used in the control of SE in Canada include AviPro 109 SE4 CONC, MBL SE4C (Lohmann Animal Health Int.) and Layermune SE (Biomune Co.). These vaccines are used in layer hens at 12 wks of age according to an immunization protocol consisting of 2 injections. The efficacy of bacterins for protecting chickens against SE infection was indicated in previous reports (3, 16, 31, 33, 44). However, those studies did not determine completely the efficacy of commercial bacterins or the impact of these vaccines on the protection against SE in the later period of a complete lay cycle. Furthermore, the capacity of these bacterins to prevent the horizontal transmission, an important problem in laying flocks, has not been yet investigated.

In the present study, SE-vaccinated and unvaccinated experimental hens were challenged with *Salmonella* Enteritidis phage type 4 (SE PT4). To evaluate the potential of the vaccines to stimulate the immune system, we evaluated the



heterophils oxidative burst, phagocytosis and intracellular survival bacteria as well as humoral immunity in layer hens before SE challenge. The induced humoral and cellular responses, SE shedding as well as SE colonization in visceral organ were then investigated during challenge to evaluate the efficacy of two commercial bacterins on their ability to protect laying hens against SE infection. This study was also conducted to determine if these vaccines can protect against SE eggs contamination (vertical transmission) and to evaluate the frequency of horizontal transmission following a contact-exposed hens with inoculated SE PT4 hens.

### **Materials and methods**

The experimental procedures and protocols were undertaken in accordance with the standards relating to the animal care and management guidelines of the University of Montreal and McGill University with authorization from their respective Animal Care Committees.

**Layer hens.** Two hundred forty 11 week old Lohmann white LSL hens were purchased from a commercial source. All hens were housed in the biosecurity level 1 Donald McQueen Shaver Poultry Complex at McGill University. All hens were vaccinated according to experimental design presented in Table I and later transported to the Poultry Research Center of the University of Montreal equipped with level 2 biosecurity at 50 weeks of age for challenge. The challenge was done at 55 weeks of age for challenge 1 or at 65 weeks of age for challenge 2. In the experiment, pullets were randomly distributed in cages, three pullets per cage, wing tagged according to their treatment group, fed according to their feeding program and provided water *ad libitum*. Room temperature was set at 20°C degrees and the

lighting program was similar to that of commercial hens of similar age. The SE free status of the birds was verified in one week following their entry by cloacal swabbing.

**Experimental design (Table I).** For each challenge, one hundred twenty birds were assigned to two groups: experimental infection and contactinfection. Each exposure group was made of 5 groups; namely the control, Layermune and MBL SE4C vaccine groups with one immunization at 16 weeks of age, Layermune and MBL SE4C vaccine groups with two immunizations at 12 weeks and 18 weeks of age. Seventy five laying hens were orally inoculated with SE PT4 at 55 or 65 weeks of age, while forty five contact – exposed hens were kept in the same cages to investigate horizontal bacterial transmission.

**Bacteria and infection.** SE phage type 4, strain SHY-04-1540 supplied by Laboratoire d'épidémiologie-surveillance animale du Québec at St-Hyacinthe and originally isolated from laying hens was used in this study. One isolated colony on blood agar was incubated in 100 ml LB Broth Miller (EMD Chemicals Inc.) overnight at 37°C with shaking at 150 rpm. The challenge inoculum was prepared from the overnight broth culture, which was diluted with physiological saline to a concentration of approximately  $2 \times 10^9$  colony-forming units (CFU) of bacteria per 1 ml. Confirmation of the inoculate doses was verified by viable counts of 10-fold serial dilutions on LB agar miller (EMD Chemicals Inc.). All hens received an oral dose by gavage of 1ml of this bacterial suspension.

**Clinical examination and mortality.** All birds were examined daily for mortality and clinical signs.

**Blood samples.** Birds (n = 15 hens /group) were bled from the brachial vein at one week before challenge and on days 1, 7 and 14 post-challenge. Blood samples were centrifuged at 5000g for 10 minutes at room temperature. Serum samples were recovered and conserved at -20°C for ELISA tests. Other blood samples (n = 5 hens / group) were collected into heparin lithilum coated vials at one week before challenge and were used for oxidative burst, phagocytosis and intracellular survival assays.

**Intestinal and oviduct secretions.** At days 1, 7 and 14 post-challenge, 40 hens were anesthetized by injection of ketamine hydrochloride (IM) (Vetalar, Bioniche) and xylazine (IM) (Anased™, Novopharm). They were then euthanased by intravenous injection of T-61® (Intervet). A 10 cm portion of ileum or oviduct (magnum area) were removed aseptically at necropsy from each hen on days 1, 7 or 14 post challenge. The intestinal and oviduct secretions were prepared as described previously (Tran et al., in Press, 2009)

**Antigen preparation for ELISA assays.** Whole cells antigens of SE strain SHY-04-1540 were used for ELISA. Briefly, a colony isolated on blood agar was incubated in 100 ml LB broth overnight at 37°C with shaking at 150 rpm. The bacterial suspension was centrifuged at 2400g for 20 minutes at room temperature and the pellet was suspended in 5 ml of PBS (pH 7.4). The suspension of bacterial cells was sonicated 15 times for 10 seconds each on ice and 750 U of DNase was added. This suspension was then incubated 3 hours at 37°C with agitation at 150 rpm. Cells were then disrupted in an internal cell pressure in PSI # FA-030 (French 40,000 PSI Pressure Cell), and the remaining suspension was centrifuged (11000g; 10 min.; 4°C). The supernatant was kept at -20°C.

**ELISA procedure.** ELISA was assessed as described previously by Letellier et al. (26) with some modifications. Briefly, flat-bottomed 96-well polystyrene ELISA plates (Nunc - Thermo Fisher Scientific) were coated with 100  $\mu$ l of diluted *Salmonella* whole - cell antigen (10  $\mu$ g/ml for IgG detection and 100  $\mu$ g/ml for IgA detection) overnight at 4°C. Non specific binding was blocked by incubating the plate with 2% skim milk powder in PBS-Tween for 1 hour at 37°C. Each well was covered with 100  $\mu$ l of serum samples at a dilution of 1:640 or with intestinal and oviduct mucosal secretions at a dilution of 1:2 and incubated for 1hr at room temperature. After washing 3 times with 0.05% PBS-Tween, the plates were incubated at room temperature for 1hr with 100  $\mu$ l of rabbit anti-chicken IgG diluted at 1: 10000 and goat anti-chicken IgA diluted at 1: 5000 coupled with peroxidase (HRP). The plates were washed and the bound horseradish peroxidase activity revealed by adding to each well 100  $\mu$ l substrate solution (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) (ABTS, Sigma). The absorbance was read at 60 min at 405 nm wavelength. The samples were considered positive if their ELISA absorbance values exceeded the mean absorbance value for the negative control samples by more than two standard deviations.

**Oxidative burst assay for heterophils.** The reactive oxygen species (ROS) production during heterophil oxidative burst was measured using 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) as a fluorescent probe. DCFH-DA is oxidized by ROS to fluorescent DCF, which has been widely used for measurement of oxidative response in heterophils by flow cytometric assay (8). Isolation of peripheral blood heterophils and flow cytometric oxidative burst assay were assessed as described by Tran et al. (In Press, 2009).

**Phagocytosis assay.**

***Labeling bacterial strains.*** SE PT4 cells were grown overnight until the end of the exponential growth phase in LB broth and standardized to an optical density of 0.65 at 600 nm. SE cells were labelled with FITC at 20 mg/ml (Sigma). Labeled bacteria were adjusted to an optical density of 0.5 at 600 nm corresponding to  $7 \times 10^8$  CFU/mL and analyzed by flow cytometry to determine uniformity of labelling, between batches.

***Infection of peripheral blood leucocytes.*** One hundred micro-liters aliquots of blood were placed in 5ml polystyrene tubes. After 10 minutes incubation, 10 $\mu$ l bacterial suspension was added and the mixture (ratio 25 bacteria: 1 leucocyte) incubated at 4°C on ice and on a rotator at 39°C. After 60 minutes incubation, the reaction was stopped with D-PBS cold 1X (14080 GIBCO®, Invitrogen). The samples were washed four times with D-PBS (250 x g, 5 min) and suspended in D-PBS 1X. The sample were labelled with 1  $\mu$ l Cell Tracker™ Orange CMTMR (5- (and-6) - (((4-chloromethyl)-benzoyl) amine) tetramethyl-rhodamine), Invitrogen) (CMTMR). Three hundred micro-liters of samples were resuspended in 2% paraformaldehyde (1:1) analysis and were analysed by FACScan flow cytometer.

***Intracellular survival assay.*** Intracellular survival of SE PT4 in leucocytes were assessed as described by Tran et al. (In Press, 2009). Briefly, SE PT4 cells were grown until the end of the exponential growth phase and standardized to an optical density of 0.5 at 600 nm. Ten  $\mu$ l of SE culture was incubated with 100  $\mu$ l of blood. After washing twice with D-PBS, gentamicin was added at a final concentration of 1000  $\mu$ g/ml to kill extracellular bacteria. To determine the number of intracellular SE,

the sample was incubated at 39°C for 18 hours. The cells were lysed by adding appropriate dilutions in sterile water to each sample and incubating the lysate to release intracellular *Salmonella*. Appropriate dilutions in sterile water were then plated onto LB agar to determine the number of viable intracellular *Salmonella* by colony counting.

### **Lymphocytes subpopulation measurements.**

***Isolation of splenic mononuclear cells.*** Spleens from 3 hens per group including the control group were collected aseptically at days 7 and 14 post-infection. Mononuclear cells (MNC) were isolated from the spleen as previously described (4). The cell concentrations were adjusted to  $1 \times 10^7$  cells/ml with staining buffer (DPBS + 2 % heat inactivated FCS + 0.09% (w/v) sodium azide, pH 7.4)

***Labelling antibodies and flow cytometric analysis.*** The procedure was carried out as previously described (3). MNC were incubated with monoclonal antibodies at a dilution of 1:125 with staining buffer. Samples of MNC were stained with R-phycoerythrin-conjugated anti-chicken CD3 and FITC-conjugated anti-chicken IgM (Southern Biotech). Duplicate samples were stained with R-PE-anti-chicken CD8, and FITC-anti-chicken CD4 (Southern Biotech). The cells were washed twice with PBS at 4°C and analysed by FACScan flow cytometer.

**Cloacal SE shedding.** Cloacal swabs were collected one week before challenge and on day 1, 3, 7, 10 and 14 post-challenge. Cloacal swab samples were incubated in a tube containing 10 ml of LB broth overnight at 37°C. One hundred µl of the enrichment were incubated in 10 ml of Rappaport Vassiliadis (RV) (OXOID) overnight at 42°C. A loopful of the suspension was spread on BG sulfa agar (Difco™,

BD) plates and incubated overnight at 37°C. The colonies were examined at 24h and 48h of incubation and were selected based on their typical form; SE-suspect colonies were confirmed by rapid slide agglutination test using *salmonella* antiserum (Difco™ *Salmonella* O, antiserum group D1, BD).

**Necropsy, evaluation of lesions and SE recovery from visceral organs.** At days 1, 7 and 14 post-challenge, 40 hens were euthanized (see the section **Intestinal and oviduct secretions**). The observations of lesions were examined visually in internal organs from each necropsied hen. Liver, spleen, ovary and oviduct were also tested for SE colonisation. The organs were collected separately, homogenized and diluted 1:10 in nutrient broth (NB). They were incubated for 24h at 37°C. One hundred µl of the the culture were then incubated in 10 ml of RV overnight at 42°C. One millilitre of the suspension was centrifuged at room temperature (12 000 rpm for 10min). The pellet containing the bacteria was washed and centrifuged once again with 1ml of PBS (pH 7.4) and was then DNA extracted using Qiagen Blood and Tissues Kit ® according to the manufacturer instructions. The purified DNA was conserved at -20°C until a real-time PCR assay (Q-PCR) was used to detect SE positive samples.

PCR primers, termed IE1L and IE1R, were used for the detection of SE DNA as previously described (42). Q-PCR reactions for 384 wells plate format were performed using 2 µl of genomic DNA samples (20-50 ng), 5 µl of SYBR FAST qPCR Master Mix (ROCHE) and 10 pmol of each primer in a final volume of 10µl. The Light Cycler 480 (ROCHE) was used to detect the amplification level of SE specific DNA using the following settings: an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 57°C and 30 seconds at

72°C. Positive DNA samples were detected usually after cycle 20 and before cycle 30 of the amplification step. Samples without fluorescence or detected after cycle 40 were considered negative. Melting curves were also performed to ensure only a single product was amplified.

**SE recovery from egg yolks.** Egg yolks were collected individually on days 1, 7 and 14 of necropsy during challenge and assessed for SE contamination. Samples were homogenized in a sterile plastic bags (Whirl pack, VWR Co.) containing nutrient broth (25g of egg yolks in 225 ml of NB) and incubated for 24h at 37°C. *Salmonella* enrichment, DNA extraction and detection of SE DNA were carried out as described above.

**Statistical analysis.** Results for antibodies responses, heterophil oxidative burst, phagocytosis assay, splenocytes population ratios and intracellular survival were analysed using a linear model with immunization and challenge protocol as factors. Contrasts between pairs of protocol means at different time periods were done using the sequential Bonferroni procedure. Prior to analysis, intracellular survival data were log<sub>10</sub> transformed and data for phagocytosis were log<sub>10</sub> + 1 transformed to normalize distributions. Results for clinical signs and lesions, fecal excretion and SE recovery were analysed with the exact chi-square test. The correlation between SE shedding rate in inoculated hens and percentage of fecal excretion in contact-exposed hens was analyzed with the Spearman rank-order correlation test. The level of statistical significance was set at 0.05 throughout. Statistical analyses were carried out with SAS version 9.1 (Cary, N.C.).



## **Results**

### **Clinical signs and lesions**

During the observation period no mortality was observed in any group. Except for diarrhea, no other clinical signs of disease were observed during post-challenge. Significantly higher rate of diarrhea was associated with challenge 2 (65 weeks of age) (32%) in comparison with challenge 1 (55 weeks of age) (16.6 %) ( $p < 0.03$ ). Gross lesions were frequently observed in challenged groups. They included petechias on liver, necrotic hepatitis and to a lesser degree splenomegaly, paintbrush hemorrhages on the liver, diphtheritic typhlitis and diphtheritic enteritis. The paintbrush hemorrhages on the liver were significantly more present ( $p = 0.03$ ) in 6.67 % of infected hens at 65 weeks of age when compared to those present in infected hens at 55 weeks of age.

### **Immune status of laying hens prior to experimental infections**

*Serum antibodies (IgG) one week prior to challenge.* Significantly higher IgG levels were measured in the groups vaccinated with MBL SE4C than in the Layerimmune groups one week prior to infection at 54 weeks of age. However, this difference disappeared at 64 weeks. As expected IgG levels were significantly lower in the control groups.

*Heterophil oxidative burst.* There was no difference in heterophils oxidative burst response between 54 and 64 weeks of age, as well as between experimental groups

*Phagocytosis assay.* The phagocytic level of heterophils observed in MBL SE4C was higher than the control group at 64 weeks only. Vaccinated MBL SE4C groups

showed a higher phagocytic level by heterophils at 64 weeks of age compared to 54 weeks of age ( $p < 0.0003$ ). The phagocytic level of monocytes was not significantly different among the various groups.

***Intracellular survival assays.*** The number of intracellular surviving bacteria increased in both vaccinated groups with two immunizations, at 64 weeks of age when compared to the same group at 54 weeks of age ( $p < 0.002$ ). An increase in intracellular survival of SE in control group was also observed ( $p < 0.001$ ). The twice vaccinated groups demonstrated intracellular survival capacity superior to the single vaccinated groups at 64 weeks as well as the control ( $p < 0.0001$ ).

#### **Evaluation of the immune response and protection against SE challenge**

***Lymphocytes subpopulation measurements.*** Significant differences in percentages of spleen cells, CD3/B ratio and CD4/CD8 ratio were not observed between experimental groups after challenge 1 and challenge 2 (Data not shown).

***IgG antibodies response.*** In challenge 1, IgG antibodies gradually increased in control group until 14d p.i. In challenge 2, the serum IgG antibodies response increased rapidly in control group from 1d p.i, peaking at 7 d p.i and then slightly decreasing at 14d p.i. In both challenges, a moderate increase of IgG antibodies was observed in vaccinated groups and was always higher than those of control group during infection ( $p < 0.0001$ ). Interestingly, MBL SE4C vaccinated group yield higher IgG response at 1d p.i but not at 7 or 14 d p.i in comparison with Layermune vaccine group ( $p < 0.002$ ).

***IgA antibody response.*** IgA intestinal antibody levels increased from 1 to 7d p.i and decreased at 14d p.i ( $p < 0.0001$ ) (Data not shown). However, no significant

difference in the IgA response was observed in the control groups versus vaccinated groups.

In contrast to the IgA intestinal response, the IgA oviductal response was significantly different between each group ( $p = 0.0002$ ) and between each day p.i ( $p = 0.04$ ) (Table II). The vaccinated hens (except the twice vaccinated Layermune group) had higher IgA antibody levels than those in control groups at 1d and 7d p.i in both challenges ( $p \leq 0.03$ ). Otherwise, no difference in IgA antibody response was observed at day 14 p.i between these groups.

***Fecal excretion of SE.*** Before inoculation, no SE was detected in the individual cloacal swabs from any of the groups. The percentage of SE positive hens from cloacal swabs are shown in Figure 1 (A, B). SE was isolated until 10d p.i. in challenge 1 and until 14d p.i. in challenge 2. In challenge 1 (55 weeks of age), SE recovery was higher in the control group on 1d p.i. in comparison with the twice vaccinated groups ( $p \leq 0.01$ ). In challenge 2 (65 weeks of age), the percentage of isolated SE was similar in all groups during the first 3d p.i. SE excretion was observed until 14d p.i. on the once vaccinated Layermune group. SE shedding was not observed in laying hens vaccinated with twice MBL SE4C from 10d p.i. on ( $p < 0.01$ ).

***SE recovery from tissues and egg yolks of infected hens.*** In challenge 1 and 2, significant differences in percentages of SE recovery from internal organs were not observed between vaccinated groups and unvaccinated group and at each time post-challenge (Table III and Table IV). Interestingly, no eggs were found to be contaminated with SE in the twice vaccinated MBL SE4C hens in challenge 1 and 2.

***Horizontal infection of contact-exposed laying hens.*** The frequencies of SE recovery from cloacal swabs of contact-exposed hens (Table V) ranged from 0 to 66.67 % during contact- exposed time. SE excretion was not significantly different at each time after exposure to SE in both challenges. Nevertheless, we observed a tendency for a higher fecal excretion at 65 weeks of age than at 55 weeks of age. Significantly higher SE fecal excretion rates were observed in the control group and twice Layermune vaccinated group (66.67 %) compared to the other vaccinated groups (0 %) at 7d p.i ( $p = 0.02$ ). Again, SE was not isolated in twice MBL SE4C vaccinated hens in challenge 1.

***SE recovery from tissues and egg yolks of contact-exposed hens.*** SE recovery from internal organs and egg yolk of contact-exposed laying hens are shown in Table VI and VII. At 7d post-challenge 1, SE recovery in internal organs and egg yolks of contact-exposed hens was significantly higher in twice vaccinated MBL SE4C hens (100 %) than in twice vaccinated Layermune hens (66.67 %). At 65 weeks of age, SE was not isolated from oviduct, ovary and egg yolks of contact-exposed hens during experimental time.

## **Discussion**

One week prior to challenge 1 or challenge 2 (for both vaccination protocols), the phagocytosis of the heterophils was only high in MBL SE4C vaccinated hens at 64 weeks of age. The heterophil oxidative burst of the control group was identical with those of vaccinated groups. This observation suggests that the vaccination has little effect on activation of heterophils function. This was consistent with the SE intracellular survival results: twice vaccinated hens with MBL SE4C also had high

*Salmonella* intracellular numbers at 64 weeks. Owing to the inefficacy of oxidative burst, an increase of phagocytosis probably conducted to a high number of bacteria survival in this group. However, there are other mechanisms of bacterial killing during phagocytosis like oxygen-dependent, oxygen-independent (nitric oxide) which are required against intracellular bacteria that were not investigated in our study. We observed that vaccinated laying hens maintained high blood antibodies (IgG) levels in comparison with those of unvaccinated groups until 64 weeks of age. IgG levels of twice vaccinated MBL SE4C hens were the highest but this response seems inefficient on the heterophil phagocytosis since a high number of intracellular bacteria survived in this group. Thus, only IgG antibody levels in serum were a distinctive immune parameter between vaccinated hens and unvaccinated hens before challenge. A consequence of the lack of complete immune response, the laying hens appear not to be protected from a SE infection at one week post-infection at 55 and 65 weeks of age, which is also supported by the SE shedding rates observed in all groups.

The data presented here demonstrates that SE PT4 infection in old laying hens cause a moderate diarrhoea which is in accordance with the observation of Kinde (24). The percentage of diarrheic hens was higher at 55 weeks than at 65 weeks. This confirms that SE infection in old birds is silent: the bacteria colonizes the intestine and is followed by dissemination in internal organs but the birds present very few clinical signs without mortality (15, 21, 37). Lesions were observed after challenge with an oral dose of  $2 \times 10^9$  CFU / bird in numerous organs, this suggesting the presence of a systemic infection rather than an enteric infection as confirmed by PCR analyses. These lesions are more frequently observed in young chickens (9, 20, 24) but ours

results are probably related to a high dose of pathogens in the challenge as well as the virulence of SE strain. In this study, a high inoculated dose ( $2 \times 10^9$  CFU) induced shedding of SE up to 80 % of laying hens in the groups. The twice vaccinated MBL SE4C group showed a statistically significant reduction of SE shedding percentage as well as a shorter duration of excretion. With regard to the humoral response, the IgG levels in sera were significantly higher in vaccinated hens than the unvaccinated control hens. This antibody response persisted until the end of the experiment (14 d p.i for both challenges) which demonstrates that the killed bacterins have the potential to maintain a systemic humoral immune response following an infection with SE PT4 strain. However, there was no relationship between high IgG levels and reduction of fecal shedding in other groups. The proportion of faecal shedding can reach up to 80 % of inoculated 65 wks old hens which was in accordance with the study of Gast (15) who showed that SE was recovered from the intestinal tracts of 91 % of the inoculate 62 wks old hens for a similar dose. Some studies have shown a positive correlation between antibody response and *Salmonella* clearance (5, 27, 36) but others have not (3, 23, 25).

Killed vaccine induces higher SE specific antibodies but it is not clear if this antibody increase is associated with an increased lymphocytes subpopulation (T and B cells) (3). The study of Sasai et al. (39) indicates that SE induces changes in lymphocyte subsets in spleen, which reflect the dynamic of the host's protective immune response at an earlier stage of infection. In the current study, it was not possible to demonstrate a significant difference in the percentage of splenic T and B cells after experimental infection in the twice vaccinated groups in comparison with unvaccinated group and this after both challenges. Nevertheless, we observed a tendency of a lower CD3+

cells population and a higher B cells population in the control group compared to twice vaccinated groups during infection. The occurrence of high levels of splenocyte proliferation seem to be observable only when using a high infecting dose ( $2 \times 10^8$  CFU/ml) of SE PT4 (2). Therefore, we used also a high dose in order to induce the changes in lymphocyte subpopulations but none of significance observed. This could be explained by too few samples which might have reduced the likelihood to find significant differences. Previous studies investigated of the changes in lymphocyte subpopulations in young chickens only (2, 13).

Whereas the elimination of SE partly depends on the systemic humoral immunity, the local response in the gut could appear more effective than the systemic response in protecting against intestinal colonization. Mucosal surfaces are the major sites for SE invasion. Initial colonization of the intestine is often followed by invasion through mucosal epithelial cells and dissemination to specific internal organs like spleen, liver, ovaries and oviduct (18). Experimental SE infection has shown that IgA antibodies predominate in the intestinal secretions, peaking 7 days post-SE infection and persisting during intestinal colonization (6) and for up to 9 weeks post-infection (45). The data presented here indicate that IgA mucosal antibodies tended to increase during the first 7d p.i in vaccinated groups but IgA levels were not significantly different between vaccinated hens and control hens after oral infection with SE PT4 strain. This suggests that intestinal IgA levels are produced following an oral inoculation rather than a prior subcutaneous immunization by the bacterins. This 7 days post infection period increasing of IgA levels would however appear to be too short to effectively prevent gut colonization by *Salmonella*. Indeed studies have pronoun SE gut colonization as late as 13d p.i (with  $10^9$  CFU of experimental dose)

(12) and 16d p.i ( $3 \times 10^8$  CFU of experimental dose) (24) or 28d p.i (with  $2 \times 10^8$  CFU of experimental dose) (1). In the present study, SE was frequently isolated from the feces of vaccinated hens up to 10 d p.i (except up to 14d p.i for once vaccinated Layermune group) and SE clearance rate of control groups was almost not different with other groups (except twice MBL SE4C vaccinated groups). However, our limited number of samples (5 birds /group/day) as well as individual immune response of hens are probably responsible for the variation in measured IgA between individual laying hens.

We also investigated the protective effect of bacterins on the colonization of *Salmonella* in the systemic organs (spleen, liver) and in fecal shedding. SE was more often isolated in spleen and liver of vaccinated groups at 7d p.i than at 1d and 14d p.i. The frequencies of SE excretion were also high, up to 7d p.i. In the same trend, humoral response (IgG antibodies in serum and IgA antibodies in mucosal secretion) peaked at this time (7d p.i). Thus, humoral responses might not be related to systemic infection or fecal shedding. Kramer et al. (2001)(25) suggested that higher humoral responses are related to a lower systemic infection and a higher caecal carrier state. However, this was observed in young chickens with a low dose of SE ( $3.6-8.5 \times 10^5$  CFU). In our experiment, a systemic SE infection in laying hen lead to the colonization of the ovary or the oviduct as seen in other studies (10, 11, 30). IgA secreted in the intestines apparently inhibits adherence of the bacteria to intestinal epithelial cells, suppressing the spread of bacterial infection in the host (14, 28), while IgA in oviduct are associated at least partially with the clearance of *Salmonella* (43). The secretion of IgA seemed to be transient since the IgA levels increased to a peak 7 days p.i and declined rapidly (43). The presence of *Salmonella* inside the eggs



is most likely a consequence of reproductive tissue colonization in infected laying hens (19), so egg yolks contamination rate was similar to those of reproductive organs (0 to 60 %) in challenge 1. The data from this study is consistent with previous findings that SE infection of hens induces secretion of a significant amount of SE - whole cell antigen antibodies (IgA) in oviductal compartment of vaccinated hens (particularly in MBL SE4C groups). The persistence of IgA levels from 1d until 7d p.i was significantly higher in vaccinated hens (except twice vaccinated Layermune group) than those of the unvaccinated group. Throughout this experiment, the vaccination with MBL SE4C (2 immunizations) gave the most effective protection against the colonization of reproductive organs and egg yolk contamination. Thus, a relationship between SE specific IgA antibodies and the declining bacterial recovery from the reproductive organs was observed in this group like in another study with 27 weeks old hens (43). For other vaccinated groups, vaccination was not correlated with SE clearance from oviduct, ovary and egg yolks.

It is difficult to make an interpretation of the systematic decreased contamination rate of reproductive organs and those of egg yolks in inoculated hens at 65 weeks of age. In both challenges, we used the same SE PT4 strain, the same inoculation method, as well as the same infection dose and laboratory techniques. Variable colonization of intestinal tracts depending on the age of hens (62 weeks old hens excreted SE more than of 37 weeks old hens) has been reported by Gast et al. (1990) (15) but none indicated the colonization of SE in reproductive tracts of hens at different ages.

The objective of the present study was also to determine the potential for horizontal transmission of SE from experimentally infected laying hens to uninoculated hens.

This was evaluated by the percentage of hens excreting SE and the percentage of recovery of SE from contact-exposed laying hens. SE PT4 strain can be early transmitted from inoculated to uninoculated hens through diverse routes (15, 17, 32, 40) and poultry are likely to become infected with *Salmonella* due to environmental contamination. There was a correlation between high SE shedding rate in inoculated hens and high percentage of fecal excretion in contact-exposed hens in challenge 1 (coefficient: 0.38,  $0.05 < p < 0.1$ ) and challenge 2 (coefficient: 0.76,  $p < 0.001$ ). Moreover, the intestinal colonization of contact-exposed hens was higher at 7d of contact in control group (66.67 %) than it was in MBL SE4C vaccinated group (0%). The potential of horizontal transmission was significantly more frequent after 7d of contact-exposure and the laying hens vaccinated with MBL SE4C appeared to be more protected against SE shedding from a natural infection than unvaccinated hens. Otherwise, the protective effect of vaccination was not observed against a systemic infection because the recovery rate of SE from internal organs and egg yolks of contact-exposed vaccinated hens (twice immunization with MBL SE4C/Layermune) was high (66.67-100%) after 7d of contact. Indeed, it is clear that excretion of *Salmonella* is intermittent (34) and with low contamination levels in the population, it would be expected that monitoring by cloacal swab analysis is not a reliable method to detect carrier birds (41). Considering that no relationship between either the contamination of egg contents or the fecal excretion, the dose administered (22) or the colonization of SE in the systemic organs (25) it suggests that the bacterins might be partially effective in reducing natural infection in flocks.

The horizontal transmission was only observed partially in experimental groups by cloacal swab samples and more frequently after 7 days of exposure time. Another

important variable that may differ from field experience was the dose of SE administered to the hens. All inoculated hens received a very large dose of *Salmonella* on the same day. Under normal field conditions, hens are exposed to a wide range of doses, and infection spreads slowly through the flock. Thus, the contact-exposed hens used in the present study provided a reasonably accurate model of natural infections.

In conclusion, vaccination of hens (12 and 18 weeks of age or 16 weeks of age) by two commercial bacterins partly protected laying hens against a late challenge at 55 or 65 weeks of age with SE PT4 strain. We observed that only MBL SE4C bacterin with two immunizations, resulted in the reduction of SE shedding rate and contamination of egg yolks in inoculated laying hens, as well as in contact - exposed hens. Owing to an ineffective protection of non specific IgG humoral immunity, the colonization of SE in systemic (spleen and liver) and reproductive (ovary and oviduct) organs were not significantly different between vaccinated hens and control hens. The present study indicated that the underlying mechanism of the protection on SE clearance and colonization of organs are most probably age-dependent of hens, dose infecting and host-related. In our experimental condition, SE PT4 could horizontally infects laying SE free hens from one day of contact and the fecal excretion was likely an important source of contamination. Overall, the commercial bacterins induced humoral immunity (IgG and IgA antibodies) in laying hens. This immune response partially protected against SE clearance, egg yolk contamination as well as horizontal transmission. MBL SE4C bacterin appeared to be more efficient in comparison to Layermune for protection of hens with a vaccination protocol with two immunizations. Our results provide additional and objective information on the

potential of these vaccines for the control of SE in laying hens. Considering the partial protection achieved by use of these bacterins, it would be usefully to look for the identification of immunogenic antigens which could help in the selection of specific proteins to elaborate a more efficient vaccine against SE in laying hens.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank: Mrs Nadia Bergeron, Manon Tremblay, Bénédicte Bouchet, Karine Giguère, Sylvette Laurent Lewandowski, Valérie Normand, Louise Lessard; Mr Mathieu Bélanger, Guillaume Larivière-Gauthier, Ulysse Dandurant Duranleau and Julien Delisle for their invaluable help in sampling birds and laboratory procedures; Mr Guy Beauchamp for statistical analysis and Mr Denis Flipo for cytometry analysis. This project would not have been possible without funding from The Fédération des Producteurs d'Oeufs de Consommation du Québec (Québec Egg Board), The Egg Farmers of Canada and The Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec.

## References

1. Asheg, A., V. Fedorová, J. Pisl, M. Levkut, V. Revajová, L. Kolodzieyski, Z. Ševčíková, and E. Pilipčinec Effect of low and high doses of *Salmonella* Enteritidis PT4 on experimentally infected chicks. *Folia Microbiol* 46:459-462. 2001.
2. Asheg, A., M. Levkut, V. Revajová, Z. Sevcíková, L. Kolodzieyski, and J. Pisl T lymphocyte subpopulations and B lymphocyte cells in caecum and spleen of chicks infected with *Salmonella* Enteritidis. *Acta Histochemica* 104:435-439. 2002.
3. Babu U, D. R., Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne R B, Gaines D and Heckert RA. *Salmonella* Enteritidis clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet Immunol and Immunopathol* 101:251-257. 2004.
4. Babu U, S. M., Myers MJ, Okamura M, Gaines D, Yancy HF, Lillehoj H, Heckert RA and Raybourne RB. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet Immunol Immunopathol* 91:39-44. 2003.
5. Beal, R. K., P. Wigley, C. Powers, P. A. Barrow, and A. L. Smith Cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis are associated with protection to heterologous re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 114:84-93. 2006.
6. Berthelot-Hérault, F., F. Mompert, M. S. Zygmunt, G. Dubray, and M. Duchet-Suchaux Antibody responses in the serum and gut of chicken lines differing in cecal carriage of *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol and Immunopathol* 96:43-52. 2003.

7. Braden, Christopher R. Food Safety: *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States. Clin Infect Dis 43:512-517. 2006.
8. Brousseau P., P. Y., Tryphonas H., Blakley B., Boermans H., Flipo D. and Fournier M. Manual of Immunological Methods, CRC Press ed. 1999.
9. Cooper, G. L., L. M. Venables, M. J. Woodward, and C. E. Hormaeche Invasiveness and persistence of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and a genetically defined *S. enteritidis* aroA strain in young chickens. Infect. Immun. 62:4739-4746. 1994.
10. De Buck, J., F. Pasmans, F. Van Immerseel, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. Poult Sci 83:352-358. 2004.
11. De Buck, J., F. van Immerseel, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. Avian Pathol 33:314 - 320. 2004.
12. Desmidt, M., R. Ducatelle, and F. Haesebrouck Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella hadar* in chickens. Vet Microbiol 60:259-269. 1998.
13. Erf, G. F., W. G. Bottje, and T. K. Bersi CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. Vet Immunol Immunopathol 62:339-348. 1998.

14. Fukutome, K., S. Watarai, M. Mukamoto, and H. Kodama. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis antigen. *Dev Comp Immunol* 25:475-484. 2001.
15. Gast, R. K., and C. W. Beard Production of *Salmonella* Enteritidis-Contaminated Eggs by Experimentally Infected Hens. *Avian Dis* 34:438-446. 1990.
16. Gast, R. K., H. D. Stone, P. S. Holt, and C. W. Beard Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 36:992-999. 1992.
17. Gast, R. K., and P. S. Holt Persistence of *Salmonella* Enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. *Poult Sci* 77:1759-1762. 1998.
18. Gast, R. K., and P. S. Holt Experimental Horizontal Transmission of *Salmonella* Enteritidis Strains (Phage Types 4, 8, and 13A) in Chicks. *Avian Dis* 43:774-778. 1999.
19. Gast, R. K., and P. S. Holt Deposition of Phage Type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis Strains in the Yolk and Albumen of Eggs Laid by Experimentally Infected Hens. *Avian Dis* 44:706-710. 2000.
20. Gorham, S. L., K. Kadavil, E. Vaughan, H. Lambert, J. Abel, and B. Pert Gross and Microscopic Lesions in Young Chickens Experimentally Infected with *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 38:816-821. 1994.
21. Guard-Petter, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ Microbiol* 3:421-430. 2001.

22. Humphrey, T. J., A. Baskerville, H. Chart, B. Rowe, and A. Whitehead *Salmonella* Enteritidis PT4 infection in specific pathogen free hens: influence of infecting dose. *Vet Rec.* 129:482-485. 1991.
23. Humphrey, T. J., A. Whitehead, A. H. L. Gawler, A. Henley, and B. Rowe Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the Contents of Naturally Contaminated Hens' Eggs. *Epidemiol Infect* 106:489-496. 1991.
24. Kinde, H., H. L. Shivaprasad, B. M. Daft, D. H. Read, A. Ardans, R. Breitmeyer, G. Rajashekara, K. V. Nagaraja, and I. A. Gardner Pathologic and Bacteriologic Findings in 27-Week-Old Commercial Laying Hens Experimentally Infected with *Salmonella* Enteritidis, Phage Type 4. *Avian Dis* 44:239-248. 2000.
25. Kramer, J., A. H. Visscher, J. A. Wagenaar, A. G. Boonstra-Blom, and S. H. M. Jeurissen Characterization of the innate and adaptive immunity to *Salmonella* Enteritidis PT1 infection in four broiler lines. *Vet Immunol Immunopathol* 79:219-233. 2001.
26. Letellier A, M. S., Lessard L, Chénier S, and Quessy S. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can J Vet Res.* 65:168–172. 2001.
27. Liu, W., Y. Yang, N. Chung, and J. Kwang Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens against *Salmonella* Enteritidis after a Single Dose of Killed Bacterium-Loaded Microspheres. *Avian Dis* 45:797-806. 2001.
28. Macpherson, A. J., L. Hunziker, K. McCoy, and A. Lamarre IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microb Infect* 3:1021-1035. 2001.



29. MAPAQ, F. a. Bilan 2004: Santé publique. Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire du MAPAQ 9:51. 2005.
30. Miyamoto, T., E. Baba, T. Tanaka, K. Sasai, T. Fukata, and A. Arakawa. *Salmonella* Enteritidis Contamination of Eggs from Hens Inoculated by Vaginal, Cloacal, and Intravenous Routes. *Avian Dis* 41:296-303. 1997.
31. Miyamoto, T., D. Kitaoka, G. S. Withanage, T. Fukata, K. Sasai, and E. Baba. Evaluation of the efficacy of *Salmonella* Enteritidis oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. *Avian Dis* 43:497-505. 1999.
32. Nakamura, M., N. Nagamine, T. Takahashi, S. Suzuki, and S. Sato Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis* 38:717-724. 1994.
33. Nakamura, M., T. Nagata, S. Okamura, K. Takehara, and P. S. Holt. The effect of killed *Salmonella* Enteritidis vaccine prior to induced molting on the shedding of *S. enteritidis* in laying hens. *Avian Dis* 48:183-188. 2004.
34. Nakamura, M., Nagamine, N., Suzuki, S., Orimatsu, M., Oishi, K., Kijima, M., Tamura, Y., and Shizuo Sato Long-Term Shedding of *Salmonella* Enteritidis in Chickens which Received a Contact Exposure within 24 Hrs of Hatching. *The J Vet Med Sci* 55:649-653. 1993.
35. Public Health Agency of Canada. Annual Summary 2006. In: Laboratory Surveillance Data For Enteric Pathogens In Canada. The Canadian Science Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, Manitoba, Canada. 2007.

36. Piao, Z., Y. Toyota-Hanatani, H. Ohta, K. Sasai, H. Tani, and E. Baba Effects of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis vaccination in layer hens subjected to *S. Enteritidis* challenge and various feed withdrawal regimens. *Vet Microbiol* 125:111-119. 2007.
37. Poppe, C. *Salmonella* infections in the domestic fowl. In: *Salmonella* in Domestic animals. Wray, C. and A. Wray, ed. CABI Publishing, New York. pp 107-132. 2000.
38. Rabsch, W., H. Tschäpe, and A. J. Bäumlner Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microb Infect* 3:237-247. 2001.
39. Sasai K, Y. K., Lillehoj HS, Withanage GSK, Fukata T, Baba E, and Arakawa A. Analysis of splenic and thymic lymphocyte subpopulations in chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol and Immunopathol* 59:359-367. 1997.
40. Steve, A. L., W. Ann, C. D. Angela, W. Jenny, D. M. Philip, and J. H. Tom Aerosol route enhances the contamination of intact eggs and muscle of experimentally infected laying hens by *Salmonella* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 171:203-207. 1999.
41. Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, L. Bohez, F. Boyen, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. *Poult Sci* 83:1911-1916. 2004.
42. Wang, S. J., and D. B. Yeh. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods and faecal samples. *Letters in Applied Microbiology* 34:422-427. 2002.

43. Withanage, G. S. K., K. Sasai, T. Fukata, T. Miyamoto, and E. Baba Secretion of *Salmonella*-specific antibodies in the oviducts of hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 67:185-193. 1999.
44. Woodward, M. J., G. Gettinby, M. F. Breslin, J. D. Corkish, and S. Houghton The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol* 31:383 - 392. 2002.
45. Zhang-Barber, L., A. K. Turner, and P. A. Barrow. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine* 17:2538-2545. 1999.

Table I. Experimental design and number of birds assigned to each group for the experimental infection

Exp. group	Vaccine	N <sup>o</sup> of immunization	Inoculated	Contact-exposed
1	MBL SE4C	2	15	9
2	Layermune	2	15	9
3	MBL SE4C	1	15	9
4	Layermune	1	15	9
5	Control	none	15	9

Table II. IgA oviductal response to SE infection in inoculated laying hens as measured with ELISA

Group	Vaccination protocol	Days post - inoculation					
		Challenge 1 (55 weeks)			Challenge 2 (65 weeks)		
		1	7	14	1	7	14
MBL SE4C	2	0.61 ± 0.53 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.40	0.48 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.25
Layermune	2	0.35 ± 0.29	0.29 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.31	0.39 ± 0.22	0.50 ± 0.33	0.70 ± 0.26
MBL SE4C	1	0.51 ± 0.51 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.36 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.66	0.67 ± 0.37 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.37 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.28
Layermune	1	0.65 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.56 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.56	0.60 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.36
Control	none	0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.49	0.17 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.44 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.33

IgA detection in the oviductal mucus of laying hens post challenge 1 (55 weeks of age) and challenge 2 (65 weeks of age). SE whole cell-specific antibodies (IgA) were detected by ELISA. Data are means of OD values at 405nm (5 birds /group) ± standard deviation, <sup>a,b</sup>:  $P \leq 0.03$

Table III. Percent laying hens with SE positive organs post-inoculation

Group	Vaccination protocol	Percent hens with SE positive organs post challenge 1 at 55 weeks (%)											
		Days post inoculation											
		Spleen			Liver			Oviduct			Ovary		
		1	7	14	1	7	14	1	7	14	1	7	14
MBL SE4C	2	40	20	0	0	80	40	0	0	20	0	0	20
Layermune	2	40	40	0	20	80	20	20	0	20	20	40	0
MBL SE4C	1	60	80	0	60	100	60	20	60	0	60	20	0
Layermune	1	40	20 <sup>a</sup>	0	40	60	20	40	0	0	20	0	0
Control	none	60	40	20	60	80	20	40	0	0	60	40	0
		Percent hens with SE positive organs post challenge 2 at 65 weeks (%)											
MBL SE4C	2	20	40	0	40	60	0	0	0	0	0	0	0
Layermune	2	0	40	0	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	20	20	0	0	0	0	0
MBL SE4C	1	20	80	40	40	60	20	40	0	0	0	0	0
Layermune	1	0 <sup>b</sup>	100 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	0	60	0	0	0	0	0	0	0
Control	none	40	0	0	40	60	60	0	0	0	0	0	0

Internal organs were sampled at day 1, 7 and 14 post - inoculation (p.i) in the individual hens. Vaccination protocol was made either 1 immunization or 2 immunizations. Data are the percentage of SE recovery from tissues positive by enrichment-PCR assay / tissues sampled (5 birds/group). <sup>a,b</sup>:  $P \leq 0.01$ . <sup>a,b</sup>:  $P = 0.048$ .

Table IV. Percent laying hens with SE positive egg yolks post-inoculation

Group	Vaccination protocol	SE recovery in egg yolks post-inoculation (%)					
		Challenge 1 (55 weeks)			Challenge 2 (65 weeks)		
		1	7	14	1	7	14
MBL SE4C	2	0	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0
Layermune	2	20	20	0	0	0	0
MBL SE4C	1	20	0 <sup>a</sup>	0	20	0	0
Layermune	1	40	40 <sup>b</sup>	0	0	0	0
Control	none	60	20	0	40	0	0

Egg yolks were sampled at day 1, 7 and 14 post - inoculation (p.i) in the individual hens. Vaccination protocol was made either 1 immunization or 2 immunizations. Data are the percentage of SE recovery from tissues positive by enrichment-PCR assay / tissues sampled (5 birds/group). <sup>a,b</sup>:  $P \leq 0.01$ . <sup>a,b</sup>:  $P = 0.048$ .

Table V. Percent contact-exposed laying hens with SE faecal shedding

Group	Vaccination protocol	Frequency of horizontal infection (%)									
		Days post SE exposition									
		Challenge 1 (55 weeks)					Challenge 2 (65 weeks)				
		1	3	7	10	14	1	3	7	10	14
MBL SE4C	2	0	0	0	0	0	11.11	0	0 <sup>a</sup>	0	0
Layermune	2	0	0	0	0	0	11.11	0	66.67 <sup>b</sup>	0	0
MBL SE4C	1	0	0	0	33.33	0	11.11	0	0 <sup>a</sup>	0	0
Layermune	1	0	0	0	0	0	11.11	0	0 <sup>a</sup>	0	33.33
Control	none	0	16.67	0	0	0	11.11	0	66.67 <sup>b</sup>	0	0

Frequency of horizontal infection was evaluated by frequency of SE excretion of contact-exposed laying hens. SE excretion was investigated by cloacal swab sampling in day (d)1,3,7,10 and 14 post – inoculation (p.i) with SE PT4 strain. Data are the percentage of SE excretion from cloacal swabs positive by enrichment /cloacal swabs sampled (1d p.i: 9 birds/group, 3 and 7d p.i: 6 birds/group, 10 and 14d p.i: 3 birds /group). <sup>a,b</sup> :  $P = 0.003$ .

Table VI. Percent contact-exposed laying hens with SE positive organs

Group	Vaccination protocol	SE recovery in internal organs in contact exposed hens at 55 weeks (%)											
		Days post inoculation											
		Spleen			Liver			Oviduct			Ovary		
		1	7	14	1	7	14	1	7	14	1	7	14
MBL SE4C	2	0 <sup>β</sup>	100 <sup>αα</sup>	0 <sup>β</sup>	0 <sup>β</sup>	100 <sup>αα</sup>	0 <sup>β</sup>	0 <sup>β</sup>	100 <sup>αα</sup>	0 <sup>β</sup>	0 <sup>β</sup>	100 <sup>αα</sup>	0 <sup>β</sup>
Layermune	2	0	66.67	0	0	66.67	0	0	66.67	0	0	66.67	0
MBL SE4C	1	0	33.33	33.33	0	0 <sup>b</sup>	0	0	100 <sup>a</sup>	0	0	0 <sup>b</sup>	0
Layermune	1	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>b</sup>	0	0	33.33	0
Control	none	0	33.33	0	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>b</sup>	0
		SE recovery in internal organs in contact exposed hens at 65 weeks (%)											
MBL SE4C	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Layermune	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MBL SE4C	1	0	0	0	0	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0
Layermune	1	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0
Control	none	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0

Internal organs of contact-exposed laying hens were sampled at day 1, 7 and 14 post - inoculation (p.i) in the individual hens. Vaccination protocol was made either 1 immunization or 2 immunizations. Data are the percentage of SE recovery from tissues positive by enrichment –PCR assay/ tissues sampled (3 birds/ group). <sup>a,b</sup> :  $P = 0.01$ ; <sup>α,β</sup> :  $P = 0.04$ .

Table VII. Percent contact-exposed laying hens with SE positive egg yolks

Group	Vaccination protocol	SE recovery in egg yolks post infection (%)					
		Challenge 1 (55 weeks)			Challenge 2 (65 weeks)		
		1	7	14	1	7	14
MBL SE4C	2	0	100 <sup>a</sup>	0	0	0	0
Layermune	2	0	66.67	0	0	0	0
MBL SE4C	1	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0	0
Layermune	1	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0	0
Control	none	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0	0

Egg yolks of contact-exposed laying hens were sampled at day 1, 7 and 14 post - inoculation (p.i) in the individual hens. Vaccination protocol was made either 1 immunization or 2 immunizations. Data are the percentage of SE recovery from tissues positive by enrichment –PCR assay/ tissues sampled (3 birds /group). <sup>a,b</sup> :  $P = 0.01$ ;  <sup>$\alpha,\beta$</sup>  :  $P = 0.04$ .

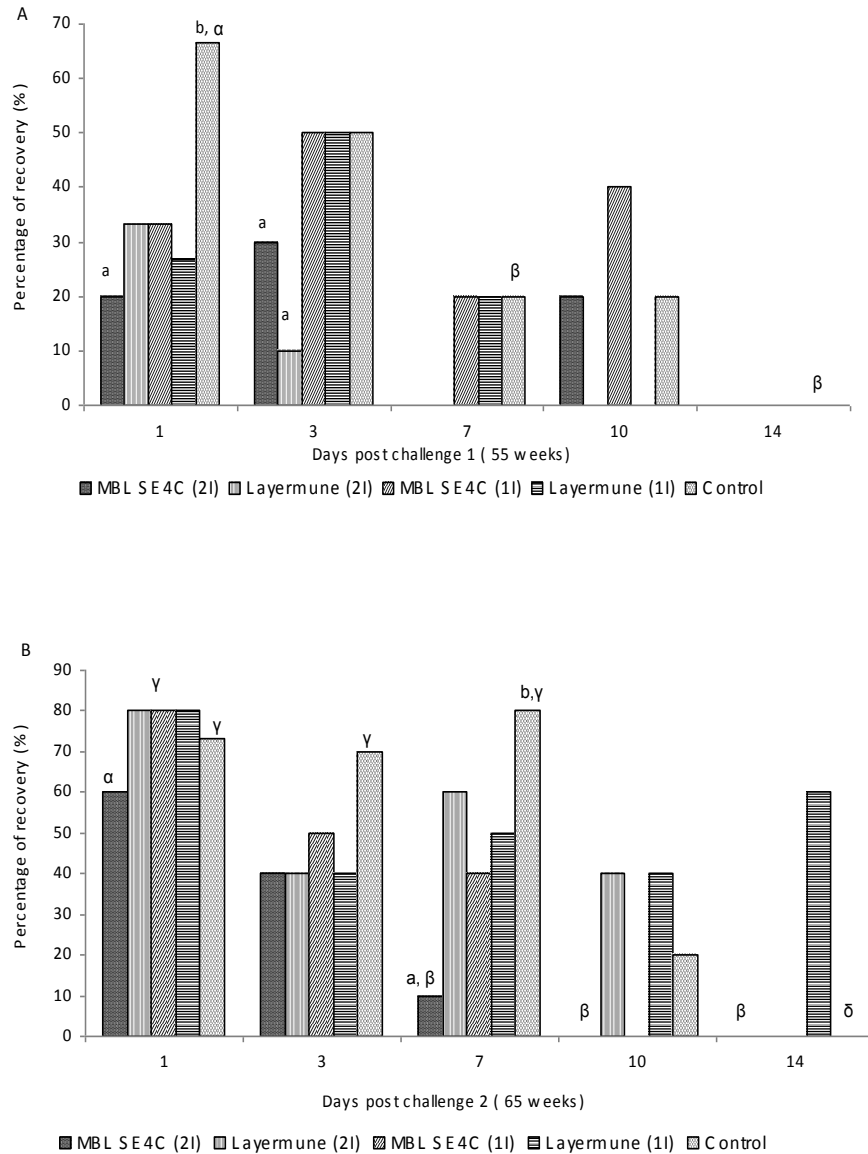


Figure 1. Percent laying hens with SE faecal shedding post-inoculation

Cloacal swabs were sampled at day (d) 1, 3, 7, 10 and 14 post - inoculation (p.i) in the individual hens of challenge 1 (Fig.2A) and 2 (Fig.2B). Vaccination protocol was made either 1 immunization (1I) or 2 immunizations (2I). Data are the percentage of SE positive hens bacteriological analysis (1d p.i: 15 birds/group, 3 and 7d p.i: 10 birds/group, 10 and 14d p.i: 5 birds/group).<sup>a,b</sup>:  $P \leq 0.01$ ,  <sup>$\gamma,\delta$</sup> :  $0.001 < P < 0.03$ ,  <sup>$\alpha,\beta$</sup> :  $P < 0.01$ .



**Chapitre 5. ARTICLE 3**

**Identification of Immunoreactive Antigens of *Salmonella* Enteritidis**

**Article en préparation**

### **Responsabilités des coauteurs dans cet article**

Dans ce troisième article, j'ai mis au point le protocole et fait les manipulations pour le SDS-PAGE et le Western blot afin d'identifier des protéines immunogènes avec l'aide d'une technicienne, et les conseils techniques et la supervision de Dre Sylvette Laurent Lewandowski. J'ai aussi mis au point la technique pour l'extraction de la protéine bactérienne et réalisé la technique pour l'extraction des protéines des différents sérovars de *Salmonella*. J'ai fait les tests ELISA pour choisir la séroconversion pour les analyses avec le SDS-PAGE et le Western blot. Dre Lewandowski a analysé les résultats pour sélectionner les protéines immunoréactives identifiées par la spectrométrie de masse et elle a écrit une partie de l'article. J'ai participé à l'interprétation des données et écrit la majeure partie de l'article.

Les Drs Boulianne, Letellier, et Quessy ont supervisé la planification de l'étude, l'élaboration des protocoles, l'interprétation des résultats et l'écriture de l'article.

Identification of Immunoreactive Antigens of *Salmonella* Enteritidis

Thi Q.L. Tran<sup>1</sup>, Sylvette Laurent Lewandowski<sup>2</sup>, Sylvain Quessy<sup>2</sup>, Ann Letellier<sup>2</sup>,  
and Martine Boulianne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Clinical Sciences,* <sup>2</sup> *Department of Microbiology and Pathology,*  
*Faculty of Veterinary Medicine, Montreal University, P.O. Box 5000, J2S 7C6,*  
*St.Hyacinthe, QC, Canada*

**Abstract**

With increasing consumer demands for safe poultry products, effective control of disease-causing pathogens, such as *Salmonella*, is becoming a major challenge to the industry. Salmonellosis from poultry origin is an important cause of foodborne intoxication. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis (SE) and *Salmonella* enterica serotype Typhimurium (ST) are two dominant serovars in many countries. To control the transmission of these bacteria, traditional control means of biosecurity and hygiene are no longer sufficient and there is an increasing need for effective vaccines. With the objective of developing an oral subunit vaccine providing an immune protection against SE infections mainly, and ST infections as well as, we identified immunogenic proteins from sera collected during infection and/or vaccination of poultry with SE. For that purpose, whole cell-associated proteins from various serovars (including SE and ST) were separated by one-dimensional electrophoresis and visualized by immunoblotting with antisera against SE. Seven immunoreactive proteins were subjected to mass spectrometry characterization and those with the best scores were further analyzed as potential vaccine candidates. A set of 5 proteins (four proteins implicated in metabolism and one in DNA-protection) were considered as putative protein candidates to be included in a subunit vaccine: Lipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4); Enolase (EC4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase); Elongation factor Tu (EF-Tu); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH; DNA protection during starvation protein.

## Introduction

Salmonellosis is one of the most important cause of foodborne intoxication throughout the world, and poultry is an important source of contamination in human, because of the consumption of undercooked poultry meat and eggs. *S. Enteritidis* (SE) and *S. Typhimurium* (ST) are the most prevalent in humans, and are also common in poultry (Ferris, 2003; Van Duijkeren *et al.*, 2002). About 20 % of European laying hen flocks (EFSA, 2007) and 7 % of American commercial laying houses (Garber *et al.*, 2003) were positive for SE or ST. Over the past years, these two serovars have been the most prevalent *Salmonella* serovars isolated from infected humans in the United States (CDC, 2008). In Canada, SE was most prevalent with 23% followed by ST 17% (Public Health Agency of Canada, 2007) of the *Salmonella* infections in human.

To control *Salmonella* in poultry production, the primary aim is to prevent *Salmonella* from entering the food chain via eggs or meat. *Salmonella* can be highly invasive in laying hens inducing a systemic infection that can potentially lead to contamination of egg internal contents via transovarian transmission following intestinal and reproductive organs colonization (Gantois, 2009; Okamura *et al.*, 2001). Birds that are asymptomatic carriers will then facilitate the spread of the bacteria within the flock (Davies *et al.*, 2003; Gast *et al.*, 1998). To reduce *Salmonella* contamination on commercial poultry farms, some strategies have been used, such as antibiotics or of chemical feed supplementation that inhibits *Salmonella* adhesion to the intestinal epithelium, competitive exclusion by non-pathogenic bacteria, genetic selection of chicken strains, and development of vaccines (Lillehoj

*et al.*, 2007). The most important aim of vaccination is both the prevention and reduction of intestinal and reproductive organs colonization, in order to prevent or markedly limit faecal shedding and egg contamination. Live attenuated vaccines are generally accepted to be more efficacious in controlling salmonellosis than killed vaccines, which are known as poor inducers of mucosal immunity and also inductive of stress in chickens, in view of endotoxin content (Babu U, 2003; Lillehoj *et al.*, 2000). Furthermore, manipulation of live attenuated vaccines is controversial due to possible residual virulence and survival in the final poultry product (Barrow *et al.*, 2001). Sub-unit vaccines that contain defined antigens have been used in poultry. Outer-membrane protein vaccines with adjuvant or incorporated into lipid-conjugated immunostimulating complexes, have been shown to offer protection against SE infection in chickens and turkeys (Charles *et al.*, 1993; Clayton *et al.*, 2008; Khan M.I, 2003; Okamura *et al.*, 2003). Similarly, immunization of laying hens with type 1 fimbriae reduced reproductive organs colonization and consequently, the number of contaminated eggs (De Buck *et al.*, 2004).

Our previous study showed that available killed vaccines partially protect laying hens against SE challenge to reduce SE faecal shedding and egg yolk contamination. In order to control the transmission of SE (and possibly ST) more effectively, the development an oral subunit vaccine is planned in our laboratory. To develop this efficacious vaccine, two parameters were taken into consideration: 1) Since *Salmonella* is an intracellular facultative bacterium, the participation of the cell-mediated immune response of the host is supposed to be very important for protective immunity. 2) *Salmonella* first establishes infection in the digestive tract. A strong mucosal immunity is therefore crucial, which favours the oral administration of

proteinaceous antigens (Kim *et al.*, 2002; Muir *et al.*, 1994). However, protection of orally delivered antigens from the hostile gastrointestinal environment is needed and can be achieved with proper encapsulation in molecular devices such as poly(DL-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) microspheres. These microspheres copolymer have a long history as safe material, with some adjuvant effects since they are readily phagocytized by macrophages and dendritic cells (Bergmann *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 1999). A crucial efficiency parameter of such a subunit vaccine is related to immunogen identification and subsequent discrimination.

In the present study, dominant immunogens which might be incorporated into such a subunit vaccine were identified as *in vivo* expressed immunogenic proteins by immunoblotting using hyperimmune sera from laying hens generated during infection/vaccination with SE. *Salmonella* whole cell proteins from various serovars (including SE and ST) were separated by one-dimensional gel electrophoresis, visualized by immunoblotting (with antisera against SE) and identified by mass spectrometry. The identification of these whole cell-associated immunoreactive proteins has provided a valuable set of seven ones that have been scrutinized as potential vaccine candidates.

## **Material and Methods**

**Bacterial strains and growth conditions.** The antigenic extracts were obtained from *Salmonella* and *E.coli* strains isolated from poultry, as presented in Table 1.

**Serum samples for identification of immunogenic proteins of various *Salmonella enterica* serovars.** (Figures 1, 2 & 4)

For immunoblot, a total of 58 individual serum samples from laying hens (55 weeks of age) were used either separately or as pools. Serum samples obtained from SE experimentally challenged hens (n=10) were pooled as *PS1*; Serum samples from hens naturally infected with SE (n = 10) were pooled as *PS2*. Serum samples collected from SE vaccinated hens at 36 and 38 weeks post-vaccination (n=14) were pooled as *PS3*. For this aim, commercially available bacterins were used to vaccinate hens (Tran et al., In Press (2009) ). Serum samples from SE vaccinated-and-challenged hens (n=24) were pooled as *PS4*. Challenge was realized as follows: hens were experimentally infected with a SE strain (see Table 1) by an oral dose of  $2 \times 10^9$  CFU /bird and serum samples were collected at 7 and 14 days post-challenge. A mix of *PS1* to *PS4* (named *PS5*) was also used in immunoblotting.

The antibody levels of individual or pool sera were determined by an “home-made” ELISA by using SE antigenic whole cell extracts (see “Extraction and characterization of the antigenic complex” section). Individual sera with the highest antibody levels were selected comparatively with negative control which was prepared by pooling (n=13) individual sera from *Salmonellae* free hens (as confirmed by cloacal swab culture).



**Serum samples for identification of putative protective immunogenic proteins**

(Figure 3).

Serum samples (n= 7) were obtained at 7 days post-challenge from SE challenged laying hens. Serum samples were individually analysed by Western blot. SE culture cloacal swabs were used as a criterion to compare the defense ability of individual hens against SE infection. In doing so, two shedding profiles were identified with the SE culture cloacal swabs: permanent SE shedders (SE shedding observed every sampling day: days 1, 7 and 14 post-challenge) (n = 3 birds) and intermittent SE shedders (SE shedding observed inconsistently during the experiment: either on day 1 or 7, 14 post-challenge) (n = 4 birds).

**Production and characterization of the antigenic complex.** The antigenic complex production was extracted from the whole bacterial cells. Briefly, a colony isolated on blood agar was incubated in 100 ml LB Broth Miller (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA) overnight at 37°C with shaking at 150 rpm. The bacterial suspension was centrifuged at 2400 g for 20 minutes at room temperature and the pellet was suspended in 5 ml of PBS (pH 7.4). The suspension of bacterial cells was sonicated 15 times x 10 seconds on ice. Five µl (750 U) of DNase (Invitrogen, Burlington, ON, Ca) was added. This bacterial suspension was then incubated at 37°C with shaking at 150 rpm and the cells were disrupted by high pressure using an internal cell pressure in PSI # FA-030 (French 40,000 PSI Pressure Cell). The suspension was centrifuged (11000g; 10 min.; 4°C) and the supernatant was aliquoted and stored at -20°C. Protein concentrations were determined by the method of

Bradford (1976), by using Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) with bovine serum albumin as standard.

**SDS-PAGE and Immunoblotting procedure.** Samples (30-75 µg of total proteins) were resolved by one-dimensional sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Amersham, Buckinghamshire, UK). Protein samples were solubilised in sample buffer (0.5M Tris, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10% glycerol, 5% mercaptoethanol) at 100°C for 5 min. Protein were loaded into 10% Bis-Acrylamide (Fisher scientific, FairLawn, New jersey, USA) separating gels. Gels were run at room temperature in running buffer (25mM Tris, 0.2M glycine, 0.1% SDS) at 40V /3h and then 50V / for sufficient time that the dye front reached the bottom of the gel casing. The apparent molecular masses of the proteins present in the antigenic extracts were determined by comparing their electrophoretic mobility with that of the following molecular mass markers (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Following SDS-PAGE, proteins were electrophoretically transferred to Hybond-P PVDF membranes (polyvinylidene fluoride papers, pore size of 0.45 µm) (GE Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK) using transfer buffer (0.125M Tris-base, 0.1M glycine) by running at 50 V for 4h. The membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma Chemical Co, St.Louis, Mo, USA) and 5% (w/v) non-fat dry milk Carnation (Smucker foods of Canada, Co., Markham, ON, Ca) overnight at 4°C and then incubated overnight with serum samples diluted 1:800 in the blocking buffer (TBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 and 2% (w/v) non-fat dry milk). After five washes for 10 minutes each in TBS (0.1% (v/v) Tween 20), the blots were incubated overnight at room temperature with the immunoconjugate: peroxidase conjugated

rabbit anti-chicken IgG (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Mo, USA) (diluted 1: 3000 in blocking buffer). The blots were washed five times more in TBS (0.1 % Tween 20) without non-fat dry milk and were developed by incubation in a solution containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher Scientific, FairLawn, New Jersey, USA) and 4-chloro, 1-naphtol (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Mo, USA) for 20 min in the dark.

**Mass spectrometry.** *Salmonella* proteins were run on a SDS-PAGE 10% acrylamide gel. The protein bands corresponding to those recognized by antisera were cut from the gel, destained with water/sodium bicarbonate buffer and acetonitrile. Proteins were reduced with DTT and alkylated with iodoacetamide prior to in-gel digestion with trypsin. The tryptic peptides were eluted from the gel with 60% acetonitrile in water containing 0.1% tri-fluoroacetic acid. The tryptic peptides were then separated on an Agilent NanoLC system using a C18 ZORBAX trap column (ZORBAX 300 SB-C18 reversed phase, 5 x 0.3 mm, 5µm particle size) and an analytical column (ZORBAX 300 SB-C18 reversed phase, 150 mm x 75 µm, 3.5µm particle size) (Agilent Technologies, Inc.).

All mass spectra were recorded on a hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometer (Q-Trap, AB Applied Biosystems, MDS Sciex Instruments, California, USA) equipped with a nano-electrospray ionization source. The accumulation of MS-MS data was performed with the Analyst Software, version 1.4 (AB Applied Biosystems / MDS SCIEX Instruments, California, USA). MASCOT (Matrix Science, London, UK) was used to create peak lists from MS and MS/MS raw data.

## Results and Discussion

There is an extensive body of literature on the pathogenicity of *Salmonella* species and the description of the factors responsible for the development of protection against the infection, however, most of it have been done in mice (Estevan *et al.*, 2006; Hamid *et al.*, 2008; Humphries *et al.*, 2005; Ochoa-Repáraz *et al.*, 2005; Strindelius *et al.*, 2002). Following experimental immunization/infection with SE in mice, the antibodies (in sera and fecal samples) against three bands 53, 56 and 60 kDa and an electrospray-mass spectroscopy analysis of these bands showed amino acid sequences coinciding with those of phase-1 flagellin and hook-associated protein 2. The flagellin plays an important role in the protection against the challenge (Strindelius *et al.*, 2002). In a recent study (Hamid *et al.*, 2008), an outer membrane protein of *S. Typhimurium*, with an apparent molecular mass of 49 kDa, was shown to be highly immunogenic. This membrane protein appeared to induce humoral and cell-mediated immune responses, and to confer 100% protection to immunized rats against a challenge at very high doses (up to 100 times the 50% lethal dose).

In poultry, *Salmonella* possess various surface structures that when in presence of the host, act as immunogens, eliciting both humoral and cellular immune responses in experimentally infected chickens (Barbour *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2002). Several reports describe the protective immunity induced by those structures, including LPS, OMPs, fimbriae and flagellin, following experimental infections (Liu *et al.*, 2001; Timms *et al.*, 1994). Ochoa-Repáraz J., (2004) reported that sera from naturally infected laying hens react strongly (higher number of hen reactants) against porins, Outer membrane protein A (OmpA), *Salmonella* Enteritidis fimbriae 21 (SEF21) and

LPS. However, little is available when it comes to list the necessary components in a poultry *Salmonella* vaccine. Indeed, most available *Salmonella* killed vaccines are based on the whole bacterial antigens.

Moreover, to control the various *Salmonella* serovars, polyvalent vaccines are nowadays used in poultry. It has been reported in a recent study (Nikoskelainen *et al.*, 2007), that multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccines may obviously result in inhibition of specific response.

In this study, performed with Western-blotting based on whole-cell proteins from SE (and ST, SH, and SK serovars) (see Table 1) and antisera pools from immunized against SE hens (experimentally challenged hens + naturally infected hens + vaccinated hens + vaccinated and challenged hens), we identified seven bands of dominant immunoreactive proteins for both SE and ST. These proteins appeared to have estimated molecular masses of 51, 46, 42, 34, 27, 16 and 12 kDa (Figure 1)

This pattern of immunogenicity seems to be the same, not only when detected during the course of vaccination, but also during an experimental as well as a natural infection (Figure 2). Consequently, the identified proteins (which do not react with negative sera) could be immunodominant antigens of SE infection and could explain the observed differences in antibody titers between infected and control animals.

We found that these seven proteins (conserved in SE and ST) induced antibodies that do not react with other *Enterobacteriaceae* such as some other *Salmonella* serovars (S Kentucky) and *Escherichia coli*. This is indicative of some specificity of these antibodies generated as a result of immune status of hens against SE.

The most important consideration in evaluating an immunization procedure is protection from infection, so the protective status of immunogens is crucial. As a first attempt to identify proteins which can potentially be implicated in a protective response, we compared the pattern of immunogenicity identified with individual sera originating from two immunised chicken groups: One group with clinical signs and lesions versus a group with no clinical signs and lesions. The bands of identified immunoreactive proteins were the same for two groups. It appears that the pattern of immunogenicity was the same, independently of the health status of the immune hens, as an indication that identified immunoreactive proteins were not related to their protective capacity (data not shown).

Moreover, since the faecal shedding is an important source in horizontal transmission and persistence of SE in environmental flock (Shivaprasad *et al.*, 1990; Van Immerseel *et al.*, 2004), the pattern of immunogenicity was evaluated using sera from hens showing permanent shedding compared to sera from hens displaying intermittent shedding. As well as for the above results, no difference was evidently seen by Western blotting (Figure 3). Nevertheless, it is noteworthy to consider that mostly IgG were predominant in the sera used to depict antigenic proteins. This result is not indicative that the same proteins could not induce a mucosal protection (through IgA production) which is the major aim of the anticipated oral vaccine.

Taken together, these results drove us to pursue with the first choice of the seven (above) immunoreactive proteins, with the final purpose of determining which ones should be included into a subunit vaccine against SE and ST strains (Figure 4). We also identified immunoreactive proteins from other serovars (SH and SK), that are

cross-reacting with SE antisera. The set of 7 immunoreactive protein bands, visualized by immunoblotting with sera from infection/vaccination hens were analysed by mass spectrometry, and examined as potential vaccine candidates (Table 3).

### **Lipoamide dehydrogenase (protein band # 1)**

Two proteins deserve some interest: Lipoamide dehydrogenase (for SE and ST serovars) and phase 1-flagellin (for SH serovar). Lipoamide dehydrogenase (or dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH, expected mass : 51 kDa ) is classically involved in the conversion of 2-oxo acids to their respective acyl-CoA derivatives, but this enzyme might have alternative functions, as it is also present in organisms that do not contain 2-oxoacid dehydrogenase complexes. For instance, in *Escherichia coli*, DLDH stimulates ATP-binding cassette transport of several carbohydrates, and ubiquinone-mediated transport of amino-acids implicated in virulence (Hakansson *et al.*, 2007; Smith W Alexander *et al.*, 2002). In *Salmonella* Typhimurium, it is reported that DLDH was induced (up to 11-fold) upon addition of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) from human neutrophils (Qi *et al.*, 1995). Moreover, a cytoplasm membrane associated DLDH has been detected in some archaeobacteria, eubacteria and also eukaryotes, suggesting that the enzyme might have a fundamental role in membrane processes, such as transport of solutes (Engels *et al.*, 1997). Also, in *Neisseria meningitidis*, DLDH constitutes an immunogenic surface antigen (Hakansson *et al.*, 2007).

The DLDH coding genes from SE str. P125109 (NCBI Reference Sequence: NC\_011294.1) and from ST LT2 (NCBI Reference Sequence: NC\_003197.1) show a 1425 bp sequence with 99% of identity.

Phase-1 flagellar antigen was found for SH strain. This antigen, easily exposed to antibodies, has variability (it belongs to *Salmonella* serotyping proteins) and a time-regulated expression (phase depending) that represent some drawbacks, considering its use as a vaccine antigen.

### **Enolase (protein band # 2)**

Enolase (EC 4.2.1.11, expected mass: 46 kDa) has been identified with the best scores for 3 of the 4 serovars. This universally conserved enzyme is found in archae, eubacteria and eukaryotes. It catalyses the interconversion of phosphoenolpyruvate and 2-phospho-D-glycerate, which proceeds through the reversible elimination of water. This enzyme of glycolytic metabolism is also sequestered (one-tenth of the total enolase in *E. coli*) in the RNA degradosome, where its function is unclear. Nevertheless, it has been observed that the association of enolase with RNase E, a component of the RNA degradosome, is required for the response to excess phosphosugar (Chandran *et al.*, 2006; Kawamoto, 2005).

It has been shown that this cytoplasmic protein is also surface exposed in *N. meningitidis* (Ferrari *et al.*, 2006), *Listeria monocytogenes* (Schaumburg *et al.*, 2004) and *S. pneumoniae* (Bergmann *et al.*, 2001). The significant quantities of Enolase on the surface of pneumococci would be involved in virulence by the activation of plasmin into plasminogen, a host collagen-degrading enzyme. Moreover, it has been observed that enolase might be immunogenic as serum antibodies against



pneumococcal alpha-enolase have been detected in children (Adrian *et al.*, 2004). In the case of *Salmonella*, a cross-reaction was identified between flagellin and enolase (among other proteins) against the same monoclonal antibody (Rementeria *et al.*, 2009).

The enolase coding genes from SE str. P125109 (NCBI Reference Sequence: NC\_011294.1) and from ST LT2 (NCBI Reference Sequence: NC\_003197.1) show a 1299 bp sequence with 99% of identity.

### **Elongation factor-Tu (protein band # 3)**

Elongation factor-Tu (EF-Tu, expected mass: 42 kDa) is one of the most abundant proteins in prokaryotes, representing about 5-10% of the total amount of proteins in *Escherichia coli* (Krab, IM. & Parmeggiani, A., 2002). This cytoplasmic protein is merely involved in polypeptide elongation during protein synthesis, but EF-Tu has recently been reported to be surface-associated in *Streptococcus pyogenes* (Severin *et al.*, 2007) and *N. meningitidis* (Kolberg *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2007). Moreover, by serological proteome analysis, EF-Tu was identified as a seroreactive protein of *Bacillus anthracis* (Chitlaru *et al.*, 2007), and IgG antibodies against EF-Tu of *Lactobacillus acidophilus* were found in sera of children with some diseases (Prangli *et al.*, 2009). Protein localization (membrane association), seroreactivity and sequence conservation of this crucial protein, are criteria for future evaluation of EF-Tu, for vaccine development. The EF-Tu coding genes from SE str. P125109 (NCBI Reference Sequence: NC\_011294.1) and from ST LT2 (NCBI Reference Sequence: NC\_003197.1) show a 1185 bp sequence with 98% of identity.

**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (protein band # 4)**

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, expected mass: 34 kDa) was identified with the best scores for the 4 serovars. GAPDH is a glycolytic enzyme catalyzing the oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3-biphosphoglycerate in the presence of cofactor nicotinamide adenine (NAD) and of an inorganic phosphate molecule. An increasing number of reports of immunogenic GAPDH from parasitic and bacterial species are published. In trematode *Schistosoma mansoni*, a GAPDH epitopic determinant coupled to ovalbumin is partly responsible for resistance to challenge in mice (Argiro *et al.*, 2000). Immunization with DNA vaccine encoding GAPDH of facultative intracellular bacteria *Brucella abortus* decreases spleen bacterial load of challenged mice (Rosinha *et al.*, 2002). Intraperitoneal administration of purified recombinant surface GAPDH of gram-negative *Edwardsiella tarda* induces humoral protective response in Japanese flounders from disease and increases their survival rate (Liu *et al.*, 2005). Our laboratory has already demonstrated the immunogenicity of ST GAPDH in experimentally and naturally infected pigs (Corriveau, 2002). For all these reasons, GAPDH would be a must to include in our vaccine.

**Rotamase (protein band # 5)**

Different proteins with almost identical scores have been found for this band. Among these proteins, the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Rotamase, expected mass: 27 kDa), was common (not with the best scores) for three *Salmonella* strains (SE, ST and SK).

As enolase (protein band 2), this enzyme is surface associated in *Streptococcus pneumoniae*. Streptococcal lipoprotein rotamase (SlrA) belongs to class of

chaperones, which are thought to be involved in the secretion and activation of cell surface molecules. SlrA is also able to induce development of antibodies (Adrian P.V *et al.* & publications included). We will not consider it as a candidate, although this rotamase shows interesting parameters, because of the uncertainty related to its identification.

« **DNA binding protein from starved cells » (protein band # 6)**

« DNA binding protein from starved cells » or Dps (expected mass: 16 kDa) was present (with the best scores) in 3 serovars (SE, ST and SH). This cytoplasmic protein, expressed abundantly by most bacteria, protects DNA under a variety of stress conditions. Dps is also produced in response to starvation. Its expression is regulated by growth phase, and in exponentially growing cultures of *E. coli*, Dps levels are near zero, but they can rise to thousands of molecules per cell in stationary phase (Talukder *et al.*, 1999). A recent study has shown that Dps protects *Salmonella* from iron-dependent killing by hydrogen peroxide, promotes *Salmonella* survival in murine macrophages and enhances *Salmonella* virulence (Halsey *et al.*, 2004). In cases in which *Salmonella* was exposed to multiple stresses, including oxidative stress, Dps was identified as one of the principal overexpressed proteins. With the use of a 2-D gel based proteomic approach, Dps has been identified as an outer membrane protein involved in *E. coli*'s response to pH change; Dps being induced in acid condition (Wu, L & Peng X.X, 2008). The dps coding genes from SE str. P125109 (NCBI Reference Sequence: NC\_011294.1) and from ST LT2 (NCBI Reference Sequence: NC\_003197.1) show a 504 bp sequence with 99% of identity.

The downfall with this Dps vaccine candidate is that it seems to be difficult to purify recombinant glycosylated form of the Dps from ST, and less than 1% was obtained by lectin (jacalin)-immobilized chromatography assay (Hanna *et al.*, 2008).

### **Ribosomal proteins (protein band # 7)**

Considering that ribosomal proteins (Expected mass: 12 kDa) are not specific enough for *Salmonella*, this 13 S ribosomal protein deserves some further investigations before using it as a vaccine candidate. Nevertheless, some results are indicative that within such ribosomal proteins, some short regions can show species-specific variability able to elicit specific antibodies (Soto, M *et al.*, 1995).

Finally, the following proteins could be considered as putative protein candidates to be included in a subunit vaccine: Lipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4); Enolase (EC4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydrolyase); Elongation factor Tu (EF-Tu); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH; and DNA protection during starvation protein.

Bibliographic investigation showed that the identified antigens are expressed at least in some extent and transiently, as surface antigens. Moreover, these proteins display a strong sequence conservation amongst SE and ST, the more prevalent serovars. Four proteins are involved in central metabolism and have already been identified as immunogens (LHDH, enolase, EF-Tu, GAPDH), the last one, Dps is a molecular chaperone and a virulence factor of *Salmonella*.

The dominant antigens that were identified belong to a class of crucial proteins of central metabolism and consequently they are evolutionarily well conserved proteins. Their abundance, their higher stability, and memory (B and/or T cells) generated by

previous exposure, might elicit a strong and rapid immune response when restimulated. Nevertheless, this strong conservation may raise the question of specificity and of auto-antibodies induction. As demonstrated by Soto *et al.*, (1995) for ribosomal proteins, specific antibodies could be induced by such antigens.

In the present study, the immunogenicity of these antigens in infected hens provided promises that they may serve as components of an effective sub-unit vaccine for poultry SE Salmonellosis.

They warrant further investigations. Their immunogenicity have to be confirmed by cloning, followed by *in-vitro* protein expression in order to demonstrate that the recombinant proteins are specifically recognized by immune serums (by immuno-dot or ELISA). Then, further evaluation will be necessary to assess *in vivo* their level of protective contribution.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr. Monique Doré (Department of Microbiology and Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Montreal University, QC, Canada) for providing SDS-PAGE and Immunoblotting procedure and the Reference laboratory for *Escherichia coli* (EcL), QC, Canada for providing *Escherichia coli* strains. The technical help provide by Mrs. Danielle Rannou is very much appreciated. This work would not have been possible without fundings from The Fédération des Producteurs d'Oeufs de Consommation du Québec (Québec Egg Board), The Egg Farmers of Canada and The Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec.

## References

Adrian, P. V., Bogaert, D., Oprins, M., Rapola, S., Lahdenkari, M., Kilpi, T., de Groot, R., Käyhty, H. & Hermans, P. W. M. (2004). Development of antibodies against pneumococcal proteins [alpha]-enolase, immunoglobulin A1 protease, streptococcal lipoprotein rotamase A, and putative proteinase maturation protein A in relation to pneumococcal carriage and Otitis Media. *Vaccine*, 22, 2737-2742.

Argiro, L., Henri, S., Dessein, H., Kouriba, B., Dessein, A. J. & Bourgois, A. (2000). Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorbition with GM-CSF on alum. *Vaccine*, 18, 2033-2038.

Babu U, S. M., Myers MJ, Okamura M, Gaines D, Yancy HF, Lillehoj H, Heckert RA and Raybourne RB. (2003). Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet Immunol Immunopathol*, 91, 39-44.

Barbour, K. E., H. El Jurdi, L., M. Faroon, O., J. Daghir, N. & Bouljihad, M. (2000). Chronological Recognition by Chicken of Antigenic Polypeptides in *Salmonella* Enteritidis with Different Plasmid Profiles: Relationship to Infection Rate. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62, 565-570.

Barrow, P. A., Page, K. & Lovell, M. A. (2001). The virulence for gnotobiotic pigs of live attenuated vaccine strains of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine*, 19, 3432-3436.

Bergmann, S., Manfred, R., Gursharan, S. C. & Sven, H. (2001). Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology*, 40, 1273-1287.

Braden, C.R. (2006). *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and Eggs: A national Epidemic in the United States. *Clinical Infec Dis* 43(4), 512-517.

Burton, D. R. & Parren, P. W. H. I. (2000). Vaccines and the induction of functional antibodies: Time to look beyond the molecules of natural infection? *Nat Med*, 6, 123-125.

CDC. (2008). *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2006. (Ed.). Proceedings of the (p. Atlanta, Georgia).

Chandran, V. & Luisi, B. F. (2006). Recognition of Enolase in the *Escherichia coli* RNA Degradosome. *Journal of Molecular Biology*, 358, 8-15.

Charles, S. D., Nagaraja, K. V. & Sivanandan, V. (1993). A Lipid-Conjugated Immunostimulating Complex Subunit Vaccine against *Salmonella* Infection in Turkeys. *Avian Diseases*, 37, 477-484.

Chitlaru, T., Gat, O., Grosfeld, H., Inbar, I., Gozlan, Y. & Shafferman, A. (2007). Identification of In Vivo-Expressed Immunogenic Proteins by Serological Proteome Analysis of the *Bacillus anthracis* Secretome. *Infect. Immun.*, 75, 2841-2852.

Clayton, D., Bowen, A., Hulme, S., Buckley, A., Deacon, V., Thomson, N., Barrow, P., Morgan, E., Jones, M., Watson, M. & Stevens, M. (2008). Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC Microbiology*, 8, 228.

Corriveau, J., Lessard, L. & Quessy, S. (2002). Étude de l'adhésion et de l'invasion de lignées cellulaires intestinales par des souches de *Salmonella* Typhimurium isolées de porcs affectés de Salmonellose. (Ed.). Proceedings of the Colloque International Francophone de Bactériologie Vétérinaire (p. 37-38).

Davies, R. & Breslin, M. (2003). Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella* Enteritidis on commercial laying chicken farms. *Vet Rec*, 153, 673-677.

De Buck, J., van Immerseel, F., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2004). Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. *Avian Pathol*, 33, 314 - 320.

EFSA. (2007). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. *EFSA journal*, 97, 1-85.

Engels, A., Kahmann, U., Ruppel, H. G. & Pistorius, E. K. (1997). Isolation, partial characterization and localization of a dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1340, 33-44.

Estevan, M., Irache, J. M., Grilló, M. J., Blasco, J. M. & Gamazo, C. (2006). Encapsulation of antigenic extracts of *Salmonella enterica* serovar: Abortusovis into polymeric systems and efficacy as vaccines in mice. *Veterinary Microbiology*, 118, 124-132.

Ferrari, G., Ignazio, G., Jeannette, A.-B., Francesco, D., Anna Rita, T., Alessia, B., Brunella, B., Marzia Monica, G., Mariagrazia, P., Nathalie, N. & Guido, G. (2006). Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* Delta gna33 mutant: Proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics*, 6, 1856-1866.

Ferris, K. E., Aalsburg, A.M., Palmer, E.A. , Et Hostetler M.M. . (2003). *Salmonella* serotypes from Animals and Related sources reported during July 2002 - June 2003 P. C. A. Richmond (Ed.). Proceedings of the 107<sup>th</sup> Annual Meeting of the United States Animal Health Association (p. 463). San Diego, California.

Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J. & Van Immerseel F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 718-738.

Garber, L., Smeltzer, M., Fedorka-Cray, P., Ladely, S. & Ferris, K. (2003). *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Table Egg Layer House Environments and in Mice in U.S. Layer Houses and Associated Risk Factors. *Avian Diseases*, 47, 134-142.



Gast, R. K. & Holt, P. S. (1998). Persistence of *Salmonella* Enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. *Poult Sci*, 77, 1759-1762.

Hakansson, A. P. & Smith, A. W. (2007). Enzymatic Characterization of Dihydrolipoamide Dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae* Harboring Its Own Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29521-29530.

Halsey, T. A., Vazquez-Torres, A., Gravidahl, D. J., Fang, F. C. & Libby, S. J. (2004). The Ferritin-Like Dps Protein Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Oxidative Stress Resistance and Virulence. *Infect. Immun.*, 72, 1155-1158.

Hamid, N. & Jain, S. K. (2008). Characterization of an Outer Membrane Protein of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium That Confers Protection against Typhoid. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15, 1461-1471.

Hanna, E. S., Roque-Barreira, M.-C., Mendes, G. M. T., Soares, S. G. & Brocchi, M. (2008). Cloning, expression and purification of a glycosylated form of the DNA-binding protein Dps from *Salmonella enterica* Typhimurium. *Protein Expression and Purification*, 59, 197-202.

Humphries, A., Deridder, S. & Baumler, A. J. (2005). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial proteins serve as antigens during infection of mice. *Infect Immun*, 73, 5329 - 5338.

Kawamoto, H., Morita, T., Shimizu, A., Inada, T., & Hiroji Aiba. (2005). Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 19, 328-338.

Khan M.I, Fadl, A. A., Venkitanarayanan, K. S. (2003). Reducing colonization of *Salmonella* Enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 142-145.

Kim, B., Bowersock, T., Griebel, P., Kidane, A., Babiuk, L. A., Sanchez, M., Attah-Poku, S., Kaushik, R. S. & Mutwiri, G. K. (2002). Mucosal immune responses following oral immunization with rotavirus antigens encapsulated in alginate microspheres. *Journal of Controlled Release*, 85, 191-202.

Kolberg, J., Sven, H., Ronald, F., Jonak, J., Hana, a. & Audun, A. (2008). The surface-associated elongation factor Tu is concealed for antibody binding on viable pneumococci and meningococci. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53, 222-230.

Lillehoj, E. P., Yun, C. H. & Lillehoj, H. S. (2000). Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Animal Health Research Reviews*, 1, 47-65.

Lillehoj, H. S., Kim, C. H., Keeler, C. L., Jr. & Zhang, S. (2007). Immunogenomic Approaches to Study Host Immunity to Enteric Pathogens. *Poult Sci*, 86, 1491-1500.

Liu, W., Yang, Y., Chung, N. & Kwang, J. (2001). Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens against *Salmonella* Enteritidis after a Single Dose of Killed Bacterium-Loaded Microspheres. *Avian Diseases*, 45, 797-806.

Liu, Y., Oshima, S.-i., Kurohara, K., Ohnishi, K. & Kawai, K. (2005). Vaccine Efficacy of Recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against Edwardsiellosis. *Microbiology and Immunology*, 49, 605-612.

Muir, W., Husband, A. J., Gipps, E. M. & Bradley, M. P. (1994). Induction of specific IgA responses in rats after oral vaccination with biodegradable microspheres containing a recombinant protein. *Immunology Letters*, 42, 203-207.

Nikoskelainen, S., Verho, S., Järvinen, S., Madetoja, J., Wiklund, T. & Lilius, E.-M. (2007). Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 206-217.

Ochoa-Repáraz, J., García, B., Solano, C., Lasa, I., Irache, J. M. & Gamazo, C. (2005). Protective ability of subcellular extracts from *Salmonella* Enteritidis and from a rough isogenic mutant against salmonellosis in mice. *Vaccine*, *23*, 1491-1501.

Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K. & Baba, E. (2001). Differences among Six *Salmonella* Serovars in Abilities to Colonize Reproductive Organs and to Contaminate Eggs in Laying Hens. *Avian Diseases*, *45*, 61-69.

Okamura, M., Lillehoj, H. S., Raybourne, R. B., Babu, U. & Heckert, R. (2003). Antigen-specific lymphocyte proliferation and interleukin production in chickens immunized with killed *Salmonella* Enteritidis vaccine or experimental subunit vaccines. *Avian Dis*, *47*, 1331-1338.

Prangli, A.-L., Meeme, U., Ija, T., Epp, S., Marika, M., Tarvo, R., Oivi, U., Vallo, T. & Raivo, U. (2009). Antigenic proteins of *Lactobacillus acidophilus* that are recognised by serum IgG antibodies in children with type 1 diabetes and coeliac disease. *Pediatric Allergy and Immunology*, *9999*,

Qi, S.-Y., Yan, L., Alexander, S., Ian, G. G., Arthur, M. & O'Connor, C. D. (1995). *Salmonella* Typhimurium responses to a bactericidal protein from human neutrophils. *Molecular Microbiology*, *17*, 523-531.

Rementería, A., Vivanco, A. B., Ramirez, A., Hernando, F. L., Bikandi, J., Herrera-Leon, S., Echeita, A. & Garaizar, J. (2009). Characterization of a Monoclonal Antibody Directed against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Serovar [4,5,12:i:-]. *Appl. Environ. Microbiol.*, *75*, 1345-1354.

Rosinha, G. M. S., Myioshi, A., Azevedo, V., Splitter, G. A. & Oliveira, S. C. (2002). Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J Med Microbiol*, *51*, 661-671.

Schaumburg, J., Oliver, D., Petra, H., Simone, B., Manfred, R., Sven, H., Lothar, J., Jürgen, W. & Uwe, K. (2004). The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics*, *4*, 2991-3006.

Seo, K.-H., Holt, P. S., Brackett, R. E., Gast, R. K. & Stone, H. D. (2002). Mucosal Humoral Immunity to Experimental *Salmonella* Enteritidis Infection in the Chicken Crop. *Avian Diseases*, *46*, 1015-1020.

Severin, A., Nickbarg, E., Wooters, J., Quazi, S. A., Matsuka, Y. V., Murphy, E., Moutsatsos, I. K., Zagursky, R. J. & Olmsted, S. B. (2007). Proteomic Analysis and Identification of *Streptococcus pyogenes* Surface-Associated Proteins. *J. Bacteriol.*, *189*, 1514-1522.

Shivaprasad, H. L., Timoney, J. F., Morales, S., Lucio, B. & Baker, R. C. (1990). Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis Infection in Laying Chickens. I. Studies on Egg Transmission, Clinical Signs, Fecal Shedding, and Serologic Responses. *Avian Diseases*, *34*, 548-557.

Singh, M. & O'Hagan, D. (1999). Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotech*, *17*, 1075-1081.

Smith W Alexander, Hazeline, R., Marie-Claude, T., David, E. B. & Anders, H. (2002). Characterization of the dihydrolipoamide dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae* and its role in pneumococcal infection. *Molecular Microbiology*, *44*, 431-448.

M Soto, J M Requena, L Quijada, S O Angel, L C Gomez, F Guzman, M E Patarroyo, and C Alonso (1995). During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin Exp Immunol.* *100*(2): 246–252.

Strindelius, L., Wikingsson, L. D. & Sjöholm, I. (2002). Extracellular Antigens from *Salmonella* Enteritidis Induce Effective Immune Response in Mice after Oral Vaccination. *Infect. Immun.*, *70*, 1434-1442.

Talukder, A. A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. & Ishihama, A. (1999). Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid. *J. Bacteriol.*, *181*, 6361-6370.

Timms, L. M., Marshall, R. N. & Breslin, M. F. (1994). Laboratory and field trial assessment of protection given by a *Salmonella* Enteritidis pt4 inactivated, adjuvant vaccine. *British Veterinary Journal*, 150, 93-102.

Van Duijkeren, E., Wannet, W. J. B., Houwers, D. J. & van Pelt, W. (2002). Serotype and Phage Type Distribution of *Salmonella* Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs, and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3980-3985.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Bohez, L., Boyen, F., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2004). Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. *Poult Sci*, 83, 1911-1916.

Williams, J. N., Skipp, P. J., Humphries, H. E., Christodoulides, M., O'Connor, C. D. & Heckels, J. E. (2007). Proteomic Analysis of Outer Membranes and Vesicles from Wild-Type Serogroup B *Neisseria meningitidis* and a Lipopolysaccharide-Deficient Mutant. *Infect. Immun.*, 75, 1364-1372.

Table 1. Bacterial strains for antigenic extracts

Bacterial strain	Group specificity	Identification	Origin of bacterial strain analysis
<i>Salmonella</i> Enteritidis	D	SHY-04-1540	LEAQ
<i>Salmonella</i> Typhimurium	B	SHY-2009-03429	LEAQ
<i>Salmonella</i> Heidelberg	B	SA99AV050024	LEAQ
<i>Salmonella</i> Kentucky	C	27a Victo2-001-1	LEAQ
<i>Escherichia coli</i>	pathogen	ECL 14668	EcL
<i>Escherichia coli</i>	no pathogen	ECL 16142	EcL

LEAQ: Laboratoire d'épidémiologie-surveillance animale du Québec, Canada; EcL: The Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Québec, Canada

Table 2. Recognition of SE proteins with sera from SE infected hens related to shedding profiles

Protein band/ Apparent mass	Intermittent SE shedding (SE culture positive cloacal swabs (n= 4))	Permanent SE shedding (SE culture positive cloacal swabs) (n=3)
# 1 - 51 kDa	4/4	3/3
# 2 - 46 kDa	4/4	3/3
# 3 - 42 kDa	4/4	3/3
# 4- 34 kDa	4/4	3/3
# 5 - 27 kDa	1/4	2/3
# 6 -16 kDa	invisible on western blot	invisible on western blot
# 7 - 12 kDa	invisible on western blot	invisible on western blot

Table 3. Mass spectrometry analysis of immunogenic candidate proteins

Protein Band/ Apparent mass	<i>Salmonella</i> strain	Protein score(*)	Protein characteristics
# 1 : 51 kDa	SE	763	1-Aspartate ammonia-lyase (EC 4.3.1.1) <i>S.</i> Typhi, (M = 52,2 kDa)
		737	2-Lipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4) <i>S.</i> Typhimurium (M = 52,2 kDa)
	ST	603	1-Lipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4) <i>S.</i> Typhimurium (M = 52,2 kDa)
	SH	833	1-Phase1 flagellin, <i>S.</i> Heidelberg (M=51,3 kDa).
	SK		No immunogenic fragment
# 2 : 46 kDa	SE	449	1-Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, survival protein <i>S. choleraesuis</i> (M= 47,3 kDa).
		445	2-Sequence from patent WO9929342- <i>S.</i> Typhimurium (M= 47,2 kDa).
		357	3-Isocitrate dehydrogenase in e14 prophage (EC1.1.1.42) <i>S.</i> Typhimurium (M = 45,7 kDa).
		355	4-Enolase (EC4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase), <i>S. paratyphi</i> , M = 45,4 kDa.
	ST	555	1-Enolase (EC4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase), M=45,4 kDa.
		484	2-Isocitrate dehydrogenase, <i>S. paratyphi-a</i> , M=45,7 kDa.
		419	3-Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, survival protein, <i>S. choleraesuis</i> , M=47,3 kDa.
		383	4-Sequence from patent WO9929342- <i>S.</i> Typhimurium, M=47,2 kDa
	SH	518	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) M =45,4 kDa
	SK	550	1-Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-

			lyase) M= 45,4 kDa.
		490	2-Isocitrate dehydrogenase – <i>S. paratyphi-a</i> , M = 45,7 kDa
		413	3-Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, survival protein, <i>S. choleraesuis</i> , M=47,3 kDa
		413	4-Sequence from patent WO9929342- <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> (score), M = 47,2 kDa.
# 3 : 42 kDa	SE	1007	1-Translation elongation factor EF-Tu. – <i>Escherichia coli</i> K-12, M= 43,3 kDa
		1007	2-Elongation factor Tu (EF-Tu) – <i>S.Typhi</i> , M=43,1 kDa
	ST	1019	1-Translation elongation factor EF-Tu <i>Escherichia coli</i> K-12, M= 43,3 kDa
		1019	2-Elongation factor Tu (EF-Tu) – <i>S.Typhi</i> . M= 43,1 kDa
	SH	1280	1-Translation elongation factor EF-Tu <i>Escherichia coli</i> K-12, M = 43,3 kDa
		1280	2-Elongation factor Tu (EF-Tu) – <i>S.Typhi</i> . M = 43,1 kDa
	SK		No immunogenic fragment
# 4 : 34 kDa	SE	419	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH – <i>S.Typhi</i> , M=35,4 kDa
	ST	468	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH – <i>Salmonella Typhi</i>
	SH	454	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH – <i>Salmonella Typhi</i>
	SK	548	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH – <i>S. choleraesuis</i> .
# 5 : 27 kDa	SE	428	1-Glutamate/aspartate periplasmic-binding protein precursor – <i>S.Typhimurium</i> , M= 33,4 kDa.
		371	2-Putative oxidoreductase- <i>Salmonella</i> <i>paratyphi</i> , M=27,8 kDa
		364	3-FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) <i>S. choleraesuis</i> ), M=28,8 kDa



# 6 : 16 kDa	SE	653	DNA protection during starvation protein (imported) – <i>Salmonella</i> Typhi, M=18,7 kDa
	ST	503	DNA protection during starvation protein (imported) – <i>Salmonella</i> Typhi . M =18,7 kDa
	SH	389	DNA protection during starvation protein (imported) – <i>Salmonella</i> Typhi.
	SK		No immunogenic fragment
# 7 : 12 kDa	SE	359	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (riboflavine synthase beta chain) imported <i>Salmonella</i> Typhi, M = 16 kDa.
	ST	248	30S ribosomal protein S13- <i>Salmonella</i> Typhi, M =13 kDa.
	SH	322	30S ribosomal protein S13- <i>Salmonella</i> Typhi, M = 13 kDa.
	SK		No immunogenic fragment

SE : *Salmonella* Enteritidis (SHY-04-1540)

ST: *Salmonella* Typhimurium (SHY-2009-03429)

SH: *Salmonella* Heidelberg (SA99AV050024)

SK : *Salmonella* Kentucky (27a Victo2-001-1)

(\*) The only results which appear in this table correspond to the best scores, and only those >200.

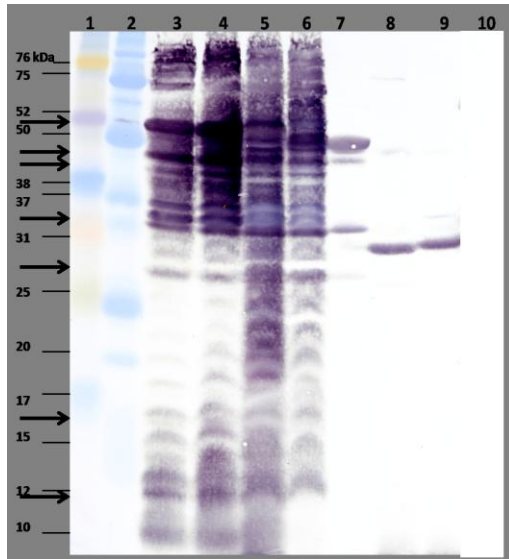


Figure 1. *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (ST), *S. Heidelberg* (SH) and *S. Kentucky* (SK) by Western blot using a pool (PS5) of individual immune sera.

*Lanes 1 & 2: Ladder, Molecular mass (kDa); lanes 3 and 4: SE antigenic extract (30 and 75  $\mu$ g total proteins respectively); lanes 5 – 7: antigenic extracts of ST, SH and SK (75  $\mu$ g total proteins); lanes 8 and 9: Escherichia coli (EC) antigenic extracts (pathogen and no pathogen, 75  $\mu$ g total proteins); lane 10: SE antigenic extract (75  $\mu$ g total proteins with negative control serum pool).*

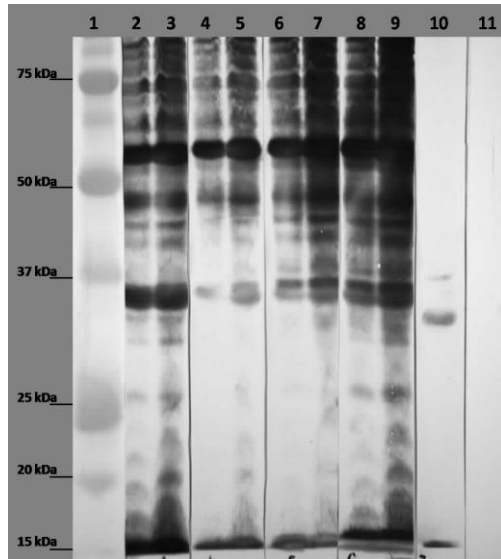


Figure 2. Comparative pattern analysis of immunoreactive proteins depending on antisera source: sera from experimentally challenged hens (PS1), sera from naturally infected hens (PS2), sera from vaccinated hens (PS3) or a mix (PS5) of sera 1 to 3.

*Western blot with SE total protein (lanes 2, 4, 6 and 8: 30  $\mu$ g; lanes 3, 5, 7, 9 and 11: 75  $\mu$ g) and EC total protein (lane 10: 75  $\mu$ g). Lane 1: MW, molecular mass (kDa), lanes 2 and 3: immune sera from experimentally challenged hens, lanes 4 and 5: immune sera from naturally infected hens, lanes 6 and 7: immune sera from vaccinated hens, lanes 8, 9 and 10: Pool sera (1 to 3), lane 11: negative control serum pool.*

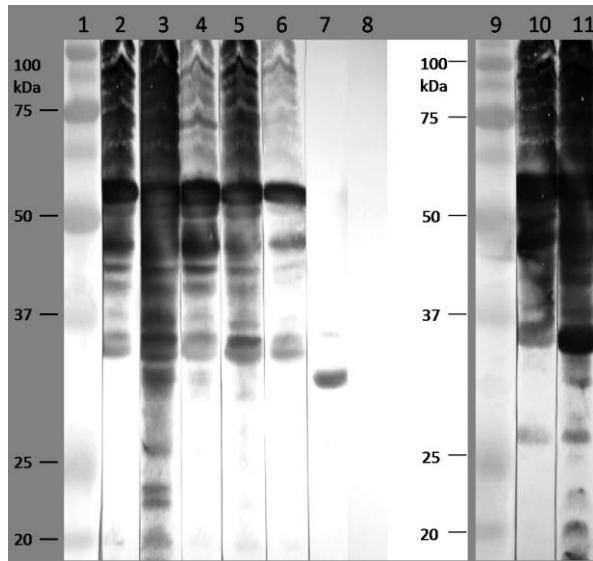


Figure 3. Comparative pattern analysis of immunoreactive proteins related to shedding profiles.

*Western blot with individual sera from hens experimentally infected and with variable shedding profiles. Total proteins (75 µg/well) from SE (lanes 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11); from E Coli (lane 7). Lanes 1 & 9: MW, molecular mass (kDa). Lanes 2, 3, 4 & 5: serum of hens with SE culture positive and intermittent shedding. Lane 6: serum of hen with SE culture positive and permanent shedding. Lane 8: negative control serum pool. Lanes 10 and 11: serum of hens with SE culture positive and permanent shedding.*

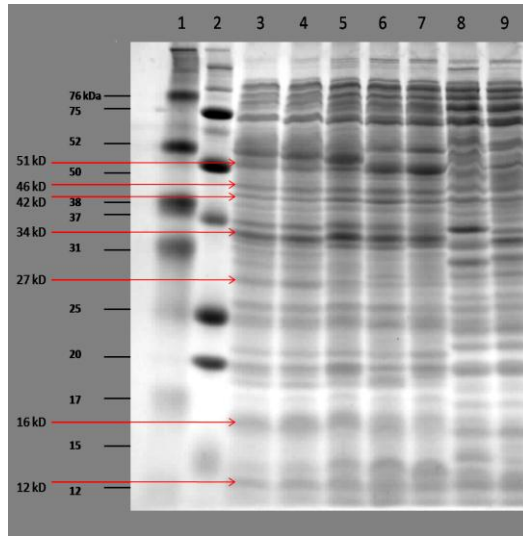


Figure 4. Extraction of immunogenic proteins for mass spectrometry identification:  
 SDS-PAGE of whole-cell bacterial proteins of various *Salmonella* serovars

*Samples were loaded onto a 10% denaturing SDS-polyacrylamide gel. The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie blue. Protein concentration: 75 µg per well. Lanes 1 and 2: Molecular mass (kDa), lanes 3 and 4: Salmonella Enteritidis (SE) antigenic extract, lane 5: Salmonella Typhimurium (ST) antigenic extract, lane 6: Salmonella Heidelberg (SH) antigenic extract, lane 7: Salmonella Kentucky (SK) antigenic extract, lanes 8 and 9: Escherichia coli (EC, pathogen and no pathogen) antigenic extract.*

## **Chapitre 6. CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE**

Cette étude est la première étude scientifique qui a évalué et comparé l'efficacité de la bactérine MBL SE4C de la compagnie Lohmann Animal Health international dans la protection contre l'infection à SE chez les poules pondeuses. L'utilisation du MBL SE4C avec le protocole à deux immunisations a démontré que la vaccination pouvait diminuer l'excrétion des salmonelles dans les fientes et la contamination des jaunes d'œuf, tout en semblant stimuler plus fortement la réponse d'IgA locaux que le vaccin Layermune de la compagnie Biomune. Ceci offre un avantage lors du choix d'un vaccin commercial dans le cadre d'un programme de prévention de SE chez la poule pondeuse au Canada.

La majorité des études portant sur la protection vaccinale sont limitées dans le temps. Notre projet est donc unique car l'évaluation de la réponse immunitaire a porté sur la fin de ponte, soit plus de 46/48 semaines après la vaccination. Par ailleurs, cette étude a rapporté que l'infection, la contamination d'œuf par SE et l'excrétion de SE chez la poule pondeuse dans la période tardive de la production ne sont pas prévenues par les bactérines administrées. Parallèlement, nous avons observé un effet âge puisque la colonisation des salmonelles dans les organes internes et les jaunes d'œuf étaient moins fréquentes chez les poules plus âgées. La raison pour cette différence dans la réponse à l'infection expérimentale entre les poules de 55 et 65 semaines d'âge est inconnue.

De plus, l'identification des protéines immunogènes communes entre *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium a permis de déterminer cinq protéines candidates qui pourront éventuellement être utilisées pour la mise au point d'un vaccin recombinant à base des microsphères polymériques. Un tel vaccin, à livraison

locale, apporterait des avantages indéniables dans la stratégie de prévention des infections à *Salmonella* chez les volailles.



## **Chapitre 7. DISCUSSION GÉNÉRALE**

*Salmonella* Enteritidis (SE) est responsable d'un grand nombre de toxi-infections alimentaires chez les humains à travers le monde. Dans la grande majorité des cas, les épisodes de SE sont majoritairement liés à la consommation des œufs et des ovo-produits, soit 68,2 % par rapport à des autres causes identifiées. Cette relation peut s'expliquer par l'affinité que possède ce sérotype pour les organes reproducteurs des poules pondeuses et donc sa capacité à coloniser l'ovaire et l'oviducte (65, 92). Il est aussi possible que SE possède les facteurs de virulence nécessaires tels que la flagelle, les fimbriaes et les adhésines l'aidant à se rendre au système reproducteur lors d'infection (202).

Les bonnes pratiques de production et d'hygiène, ainsi que les programmes de détection et d'élimination des troupeaux infectés ont participé au relatif succès du contrôle des infections causées par *Salmonella* dans les fermes. La vaccination des oiseaux est une mesure additionnelle permettant d'augmenter la résistance des oiseaux contre *Salmonella* et de diminuer l'excrétion fécale de ces pathogènes. Chez les poules pondeuses, le vaccin est aussi utilisé pour aider à prévenir ou diminuer la contamination des œufs. Étant donné les risques de transmission d'une souche vaccinale à des œufs suite à une vaccination avec un vaccin vivant, les vaccins inactivés demeurent le choix le plus sécuritaire.

Les divers programmes de surveillance, tant canadien, que de par le monde révèle que la prévalence de SE chez les humains demeure un problème (73, 76, 212). Parallèlement, la prévalence de SE chez les volailles (les poulets de chair et les poules pondeuses) semble persister (5, 76, 181), et ce malgré la présence de programmes de surveillance tel celui de la Fédération des Producteurs d'œufs de

consommation du Québec. Face à ce phénomène mondial, il est nécessaire de réévaluer le rôle de la vaccination. Des bactérines commerciales sont présentement utilisées chez les poules pondeuses, cependant leur efficacité quant à la protection conférée, particulièrement en fin de période de ponte n'est pas déterminée. Des études sont donc nécessaires afin d'évaluer la réponse immunitaire chez les poules pondeuses suite à la vaccination et ce, jusqu'à la fin du cycle de ponte. De plus, il est essentiel dans le contexte actuel de déterminer si ces bactérines parviennent non seulement à protéger les poules pondeuses contre des infections à SE mais aussi à prévenir la transmission verticale aux œufs. En parallèle la transmission horizontale, qui permet la persistance de SE dans les troupeaux pondeurs commerciaux, doit aussi être évaluée. Cependant, puisque *Salmonella* est une bactérie intracellulaire facultative, on sait que les vaccins inactivés ne déclenchent théoriquement pas une réponse immunitaire très efficace. L'élaboration d'un vaccin sous-unitaire à base des protéines recombinantes incorporées dans des microsphères, serait vraisemblablement plus efficace contre SE. Il serait donc utile d'identifier les antigènes des protéines bactériennes induits *in vivo* durant l'infection ou suite à la vaccination des poules pondeuses et qui sont communs entre des sérotypes prédominants de *Salmonella* chez les volailles : *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium.

Les résultats du projet seront discutés selon les sujets suivants :

### 6.1 Réponses immunitaires

La plupart des études précédentes a évalué l'efficacité des vaccins contre SE en ciblant la prévalence de la présence de SE dans l'environnement des troupeaux, par l'excrétion des salmonelles et/ou la colonisation des salmonelles dans les organes

internes (rate, foie, ovaire, oviducte) et/ou la contamination des œufs (64, 91, 276). Cependant, ces études n'ont pas examiné différents indicateurs de la réponse immunitaire suite à la vaccination. D'autre part, plusieurs études ont vérifié si les bactérines sont capables de protéger des oiseaux contre des infections expérimentales causées par SE (64, 104, 160, 193). Cependant, ces études n'ont été faites qu'avec de jeunes oiseaux (< 32 semaines d'âge) (10, 203, 204), et ce même si les infections à SE sont observées à tout âge. Une étude épidémiologique réalisée par le MAPAQ a confirmé une infection chez un lot de pondeuses qui avait duré de 23 à 49 semaines d'âge (164). Par conséquent, la possibilité de la contamination des œufs se produit dans les différentes étapes du cycle de ponte, soit jusqu'à 72 semaines d'âge. Dans la présente étude, la réponse immunitaire a été évaluée en fonction du temps 1) avant la vaccination (11 semaines d'âge) 2) après la vaccination (à différents âges jusqu'à 54-64 semaines d'âge) et 3) après l'infection expérimentale (55 et 65 semaines d'âge) afin d'apprécier l'efficacité de la vaccination à différentes périodes et la protection contre l'infection à SE tard dans le cycle de ponte.

#### 6.1.1 Réponse immunitaire humorale systémique (IgG)

Les IgG sont les isotypes prédominants suite à une infection systémique avec *Salmonella* (280). Dans les infections causées par des pathogènes intracellulaires facultatifs tel que *Salmonella*, les anticorps IgG pourraient contribuer à l'immunité par la neutralisation des bactéries par la fixation des anticorps à la bactérie. Cette action pourrait prévenir de fixation de bactérie extracellulaire à une molécule spécifique à la surface des cellules cibles de l'hôte et alors l'empêchement de l'infection (43, 44). SE étant une bactérie intracellulaire facultative, lorsque ces

organismes sont libérés dans le milieu extracellulaire de l'hôte, une partie des bactéries extracellulaires qui colonisent les tractus digestif et reproducteur pourrait être éliminée par le mécanisme de défense grâce aux IgG (69). Les anticorps participent aussi à l'opsonisation des bactéries afin d'établir l'opsono-phagocytose. Les bactéries sont phagocytées et détruites par réactions à l'intérieur des cellules phagocytaires (monocytes, hétérophiles) (232). Par ailleurs, les cellules infectées lysées par les cellules T cytotoxiques libèrent des bactéries. Ces dernières sont neutralisées par les anticorps dans l'environnement extracellulaire (248). Les anticorps contribuent à l'augmentation du processus de la présentation des antigènes pour l'activation plus rapide des cellules T. Dans une étude, le transfert adoptif ne peut qu'éliciter l'immunité cellulaire lorsque les antisérums ont été administrés à la fois avec les splénocytes immunitaires pour les souris naïves. Ceci suggère que les anticorps jouent un rôle supplémentaire dans l'immunité cellulaire effective (173).

Dans la cadre de cette étude, nous avons observé :

**Une persistance (34-46 semaines) des anticorps IgG à des niveaux élevés chez les poules vaccinées après la vaccination et ce, jusqu'à 54 ou 64 semaines d'âge.**

Le niveau d'IgG a été régulièrement évalué à partir de deux semaines après la dernière immunisation (18 semaines d'âge pour le protocole avec une injection et 20 semaines d'âge pour le protocole avec deux injections) et ce, jusqu'à une semaine avant l'infection expérimentale (54 ou 64 semaines d'âge). Deux semaines post-vaccination, les oiseaux vaccinés produisent des anticorps sériques spécifiques à SE. Cependant, les oiseaux contrôles sont séro-négatifs. Les IgG sériques persistent jusqu'à 54 ou 64 semaines d'âge chez les oiseaux vaccinés après la vaccination tant avec les deux bactérines qu'avec les deux protocoles de vaccination dans notre étude.

Le niveau élevé des IgG des poules vaccinées indique que les bactérines ont induit une réponse humorale systémique jusqu'à 34 à 46 semaines (selon le protocole de vaccination) post-vaccination. Ceci concorde avec la suggestion de Tizard (2002) (255), c'est-à-dire que l'utilisation des adjuvants à base de l'huile induit une persistance des réponses des anticorps contre des antigènes jusqu'à au moins 20 semaines post-vaccination. Dans autre étude, le titre élevé d'IgG sérique a persisté jusqu'à 27 semaines post-infection avec une souche SE lysotype 4 (18). Le niveau d'IgG a été évalué après la vaccination avec une trousse ELISA commerciale (Flockchek SE, Idexx laboratories). Cet ELISA permet de détecter les anticorps spécifiques contre l'antigène du flagelle (g,m) de SE. Ces anticorps atteignent rapidement un pic à 3 semaines post infection (103) et reviennent à un faible niveau après 10 semaines (9). De plus, un recombinant de la protéine flagellaire permet de détecter des oiseaux positifs en mesurant des anticorps sériques des oiseaux inoculés avec SE (278). Par contre, la flagelline (g, m) peut générer une réaction croisée entre différents sérotypes de *Salmonella* (266). Cet antigène est commercialement utilisé pour l'analyse sérologique parce que la production de cet antigène est relativement facile (174). Alors, le niveau d'IgG chez les poules vaccinées est spécifiquement pour l'antigène flagellaire, et le choix du test dans cette étude avait pour but d'optimiser nos résultats en accord avec la méthode couramment utilisée sur le terrain pour évaluer le statut immunitaire des oiseaux.

Afin de mesurer les anticorps polyclonaux produits suite à l'immunisation avec les bactérines, une trousse ELISA maison développée dans notre laboratoire a été utilisée. *Salmonella* possède différentes structures à la surface qui peuvent induire chez les oiseaux une réponse immunitaire suite à l'infection expérimentale (160, 252)

ou naturelle (201). La préparation des antigènes complets de SE a été fait à partir des cellules entières de SE par sonication et perturbation des bactéries sous haute pression (voir matériels et méthodes, article 2). Cet ELISA détecte tant les anticorps spécifiques dirigés contre un seul antigène tel que la flagelline, que des anticorps dirigés contre d'autres composantes de la surface de la bactérie. Les deux tests ELISA utilisés ont démontré la persistance des IgG à un niveau élevé chez les oiseaux vaccinés. Cependant, la présence d'IgG polyclonaux jusqu'à 54 ou 64 semaines ne constitue pas l'assurance d'une protection contre une infection dans les conditions expérimentales. Plusieurs facteurs peuvent interférer avec l'effet des anticorps sur leurs réponses efficaces. Une quantité insuffisante d'anticorps sériques peut être associée à une protection inefficace, alors qu'au contraire, une quantité élevée d'anticorps peut diminuer l'effet protecteur des anticorps à cause de manque d'anticorps spécifiquement protecteurs dans la séroconversion (44). D'autre part, les anticorps polyclonaux incluent des spécificités multiples et différents isotypes par conséquent, inclut probablement des anticorps bloquants (136).

**La réponse immunitaire suite à l'infection expérimentale par une souche de SE lysotype 4 se manifeste par la production des anticorps systémiques chez les oiseaux vaccinés et non vaccinés (55 ou 65 semaines d'âge)**

La production des anticorps est influencée par plusieurs facteurs suite à une infection entérique à *Salmonella*. La dynamique de l'infection et de la réponse de l'hôte dépendent de l'âge au moment de l'infection. Les oiseaux infectés à 6 semaines d'âge ou plus produisent des anticorps spécifiques à *Salmonella* dans le sérum vers 5 à 7 jours post-infection (28, 30, 117). Dans cette étude, le pic de la production des anticorps spécifique aux antigènes de la bactérie entière a été observé à 7<sup>e</sup> jour post-

inoculation. Le niveau d'IgG a été statistiquement plus élevé chez les oiseaux vaccinés que celui chez les oiseaux contrôles. Les titres élevés d'IgG, IgM et IgA spécifiques au LPS, à la flagelline ou aux protéines de la membrane externe dans le sérum sont détectés au 7<sup>e</sup> jour post infection. Le niveau élevé d'IgG est observé 4 semaines post-infection et les IgG persistent jusqu'à 9 mois post-infection (13, 14, 18). La production des anticorps IgG chez les groupes contrôles lors de la première infection (à 55 semaines d'âge) ou deuxième infection (à 65 semaines d'âge) démontre qu'une infection à forte dose ( $2 \times 10^9$  CFU/ml/oiseau) induit une réponse immunitaire humorale systémique.

En ce qui concerne la réponse immunitaire humorale, l'efficacité protectrice de cette réponse a été discutée dans plusieurs études précédentes. Les anticorps peuvent agir de différentes façons telles que l'interférence avec l'adhésion cellulaire, la neutralisation du LPS, la lyse des bactéries par l'activation du complément ainsi que par opsonisation. Cependant, le niveau d'IgG sérique n'offre pas de garantie liée à la protection contre une infection à *Salmonella* (10).

**La réponse humorale systémique IgG suite à la vaccination n'est pas liée à l'opsono-phagocytose des phagocytes (hétérophiles et monocytes) et la flambée oxydative des hétérophiles est indépendante des anticorps spécifiques à SE.**

La phagocytose, la flambée oxydative et la mise à mort des bactéries sont une part des mécanismes essentiels dans la défense de l'hôte contre les microorganismes, mais elles peuvent être modifiées durant l'infection par une bactérie intracellulaire telle que *Salmonella* (225). Les IgG contribuent à ces mécanismes via l'opsonisation des bactéries. Ces dernières sont phagocytées par les cellules phagocytaires telles que les hétérophiles et les monocytes par le processus opsono-phagocytose. Les bactéries



sont ensuite mises à mort par différents mécanismes intracellulaires tels que la flambée oxydative. Ce mécanisme peut entraîner la mise à mort des bactéries intracellulaires par un des dérivés réactifs d'oxygène : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Alors, la quantité de bactéries intracellulaires qui survivent, dépend à la fois de la phagocytose et des mécanismes intracellulaires de mise à mort. En rapport à la phagocytose, nous avons étudié deux types de cellules soit les monocytes et les hétérophiles. La phagocytose des monocytes n'a pas été différente entre les groupes vaccinés et les groupes contrôles, ni avec les hétérophiles. Seuls les groupes vaccinés avec la bactérine MBL SE4C ont démontré un niveau de phagocytose plus élevé que le groupe contrôle à 64 semaines d'âge. Similairement, la flambée oxydative des hétérophiles a été relativement la même entre les oiseaux expérimentaux suite à la vaccination lorsque les oiseaux sont étudiés vers la fin du cycle de ponte (54 et 64 semaines d'âge). Nos résultats suggèrent que les anticorps liés à la séroconversion n'induisent pas d'augmentation de la phagocytose et/ou de la flambée oxydative chez les oiseaux expérimentaux. Dans une étude de Stabler (1994) (243), la phagocytose optimale chez les volailles demande l'opsonisation des bactéries avec les anticorps pour les deux types cellulaires : monocytes et hétérophiles. L'opsonisation des salmonelles par les anticorps sériques induit l'augmentation de la phagocytose des hétérophiles et la régulation de la sécrétion des cytokines chez les volailles (151). Ainsi, la phagocytose et la flambée oxydative des granulocytes porcins sont augmentées par l'opsonisation de *Salmonella* Typhimurium en présence de séroconversion (226). L'opsonisation inefficace pourrait s'expliquer par la possibilité que les anticorps ne soient pas spécifiques pour l'opsonisation des salmonelles. La faible activité de la phagocytose des granulocytes a été observée chez les porcs

négatifs à *Salmonella*. Ceci peut être causé par l'opsonisation incomplète en l'absence d'anticorps spécifiques contre *Salmonella* (226). Néanmoins, la flambée oxydative et autres réponses internes des cellules phagocytaires pourraient être influencées par différents mécanismes ou encore par des souches non-invasives. En effet, une souche non-invasive est capable d'induire une forte flambée oxydative sans opsonisation chez les monocytes (227), tandis que la phagocytose et la flambée oxydative des granulocytes sont plus fortes grâce à l'opsonisation des salmonelles par les anticorps dans le sérum (226).

Après la vaccination (32 ou 34 semaines selon protocole de vaccination) avec deux bactérines, nous n'avons pas observé de différence dans la survie intracellulaire entre les groupes vaccinés et les groupes contrôles. La survie intracellulaire a aussi été évaluée à 36 et 46 semaines post-vaccination (ou 54 et 64 semaines d'âge avant chaque infection expérimentale). Le résultat a montré que la survie intracellulaire à 64 semaines d'âge des groupes vaccinés par deux injections est plus élevée que celle des groupes vaccinés par une injection et celle du groupe contrôle. Il n'y avait pas de différence entre les groupes vaccinés par deux injections et le groupe contrôle à 54 semaines d'âge. Étant donné que le niveau d'IgG est toujours plus élevé chez les oiseaux vaccinés que chez les oiseaux contrôles dans la toute période expérimentale post-vaccination, ceci suggère que les mécanismes immunitaires n'ont pas été efficaces chez les oiseaux vaccinés pour diminuer le nombre des bactéries intracellulaires. Probablement, plusieurs mécanismes de la phagocytose et la mise à mort des bactéries, soit l'opsonisation – phagocytose et aussi l'âge des oiseaux influent la survie intracellulaire des bactéries.

**La réponse immunitaire humorale systémique ne joue qu'un rôle partiel sur l'excrétion des salmonelles dans les fèces et l'invasion des organes internes (foie et rate) des organes reproducteurs (ovaire et oviducte) ainsi que sur la transmission verticale (contamination des jaunes d'œuf).**

L'excrétion des salmonelles dans les fèces est intermittente. En effet, suite à l'inoculation d'une dose de  $10^9$  CFU/oiseau, il a été observé, pendant les 18 semaines suivantes, que tous les oiseaux excrètent rapidement des salmonelles après infection de façon intermittente (264). Dans le cadre de notre expérimentation, les oiseaux de 65 semaines d'âge ont excrété des salmonelles jusqu'à 14 jours p.i. Par contre, les oiseaux de 55 semaines d'âge ont arrêté d'excréter des salmonelles à 10 jours p.i. Pendant ce temps, l'excrétion des salmonelles observée (selon 3 dates de prélèvement 1, 3 et 7 jours p.i) fut en intermittence dans tous les groupes expérimentaux. Ce type d'excrétion de même que la durée dépendent de différents facteurs biologiques et pathologiques tels que la capacité de colonisation de l'épithélium intestinal de la souche infectieuse, de la dose d'infection et le plus important, de la réponse immunitaire humorale. Cette dernière a été considérée comme participant au moins partiellement à l'élimination des SE entériques (10, 69, 153). La plupart du temps les pourcentages d'excrétion des salmonelles ne sont pas significativement différents p.i entre les groupes vaccinés et les contrôles, ce qui confirme notre hypothèse d'un effet partiel via des anticorps systémiques (IgG) pour la réduction de l'excrétion des salmonelles. L'âge des poules pondeuses a probablement influencé la durée et la fréquence de l'excrétion des salmonelles dans les fèces. Ceci a été démontré par le pourcentage élevé des écouvillons cloacaux positifs et par la durée de l'excrétion (14 jours p.i) chez les oiseaux lors de la deuxième infection expérimentale.

Kramer (2001) (153) a suggéré une relation inverse entre la colonisation caecale (colonisation locale) et la colonisation des organes internes (colonisation systémique) suite à une infection. Ceci serait expliqué par l'augmentation de la réponse humorale (IgG) et par une diminution de la phagocytose. À la lumière de nos résultats, on constate un pourcentage élevé de la colonisation des salmonelles dans la rate et le foie autour de 7 premiers jours p.i. suite à l'infection systémique. De plus, la colonisation des organes internes n'est pas significativement différente entre les oiseaux vaccinés et non-vaccinés. Nous n'avons pas dénombré les bactéries présentes dans les cécas et organes mais plutôt le pourcentage des poules pondeuses positives, avec comme résultante une forte infection systémique et une forte colonisation caecale. Il est fort probable que la dose infectieuse ait influencé ces résultats. Dans une autre étude, le pourcentage d'isolement de SE LT4 dans le foie était de 80% des poules infectées lors de l'inoculation avec une dose élevée ( $> 10^8$  CFU/oiseau) et l'élimination des salmonelles dans les organes était plus lente soit 27 jours p.i. (6). Néanmoins, la baisse du pourcentage des prélèvements positifs dans les organes à 14 jours p.i. dans notre étude suggère le rôle partiel de la réponse immunitaire humorale via les IgG.

Puisque nous n'avons pas observé une différence significative de la contamination des jaunes d'œufs (transmission verticale) entre les poules vaccinés et non-vaccinés, l'effet de la réponse humorale systémique sur la protection contre l'infection des SE aux œufs n'est pas claire. Une corrélation positive entre les anticorps spécifiques à SE et la diminution des bactéries isolées à partir des oviductes a été observée par Withanage et coll., (1999) (271). SE a été isolée significativement plus fréquemment à partir d'œufs qui provenaient des poules pondeuses avec les titres d'anticorps les plus élevés (103). Au contraire, une autre étude a conclu que le profil des anticorps

des poules individuelles n'était pas corrélé avec la fréquence de leurs œufs contaminés (132).

#### 6.1.2 Réponse immunitaire humorale locale (IgA)

L'IgA, sous la forme d'IgA sécrétoire, constitue la majorité des isotypes d'anticorps présent dans les sécrétions mucosales des mammifères et des oiseaux. Les IgA possèdent plusieurs fonctions mais entre autres, se fixent aux antigènes, à la surface des pathogènes pour empêcher leur attachement et colonisation (135). Au cours de notre étude, la réponse immunitaire locale a été observée au niveau de l'intestin et de l'oviducte. SE est capable de coloniser le tractus intestinal, et de causer un état de porteur chronique chez le poulet (34). La colonisation intestinale est accompagnée par l'invasion à travers les cellules épithéliales mucosales et par la dissémination dans les organes internes spécifiques tels que la rate, le foie, les ovaires et les oviductes (101). L'immunité humorale contribue à éliminer des salmonelles à partir de l'intestin des volailles (69). Kramer et al. (2001) (153) a reporté que les réponses immunitaires via les anticorps du sérum semblent être liées à la colonisation caecale de SE. Néanmoins, la réponse immunitaire humorale au niveau intestinal (IgA) est considérée plus efficace que la réponse immunitaire systémique afin d'éliminer des bactéries du tractus gastrointestinal (69).

La présence d'immunité locale au niveau de l'oviducte est très importante pour deux aspects; 1) L'oviducte est le site où les anticorps maternels sont transférés aux œufs et la présence des IgA et IgM (blanc d'œuf) et des IgG (jaune d'œuf) y a été rapportée (155, 233) 2) L'ovaire et l'oviducte sont responsables de la transmission verticale des pathogènes, celle qui est la plus problématique pour la santé publique. En effet, la

contamination directe des jaunes d'œuf ou de l'albumen par *Salmonella* avant la formation de la coquille suite à l'infection des organes reproducteurs (99) et la pénétration des SE à travers la coquille d'œuf fraîchement pondu (18) ont été observées. SE peut être isolée à partir de la surface mucosale de l'oviducte (128) et persiste au niveau des tissus reproducteurs des poules naturellement ou expérimentalement infectées (128, 142).

L'administration des deux bactérines commerciales aux poules pondeuses a démontré que :

**La vaccination avec MBL SE4C induit la production d'IgA au niveau intestinal et de l'oviducte 3 semaines post vaccination.**

L'évaluation de la production des IgA au niveau intestinal et de l'oviducte a été faite avec un ELISA maison en mesurant les anticorps contre les antigènes de SE entière. Le niveau d'IgA était statistiquement plus élevé à 3 – 4 semaines post vaccination chez les poules pondeuses vaccinées avec la bactérine MBL SE4C par rapport aux autres groupes. Fait intéressant, la plupart des vaccins disponibles administrés par voie parentale ne sont pas efficaces pour établir l'immunité à la surface des muqueuses (145). Néanmoins, nos connaissances de la réponse immunitaire locale suite à la vaccination avec les bactérines sont encore limitées et l'utilisation des bactérines n'a pas démontré une efficacité protectrice en stimulant les réponses immunitaires mucosales (15). Cependant, plusieurs études ont mentionné que la voie d'administration des bactéries tuées joue un rôle important afin de déclencher une réponse immunitaire locale. La vaccination par la voie intra-péritonéale avec une souche de *S. Typhimurium* incorporée dans un adjuvant à base d'huile, suivi par une

immunisation secondaire par voie orale aurait stimulé une réponse spécifique via des IgA sécrétoires au niveau intestinal (188). Ces dernières sont capables de retarder l'invasion intestinale des salmonelles expérimentalement inoculées chez les oiseaux vaccinés comparativement avec les oiseaux non-vaccinés (188). L'étude de Fukutome (2001) (90) a suggéré que l'utilisation des antigènes entiers de SE incorporés dans les liposomes peut induire la production des IgA au niveau du tractus intestinal. Ce niveau d'IgA empêche l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales intestinales.

Au niveau de l'oviducte, nous avons également observé une production des IgA à 3<sup>e</sup> semaine post-vaccination chez les groupes vaccinés avec la bactérine MBL SE4C. Quoique la réponse humorale spécifique à *Salmonella* chez les poules pondeuses infectées ne puisse pas éliminer les bactéries résidentes dans l'oviducte, la présence des immunoglobulines dans cet organe avant l'infection expérimentale pourrait être suffisante pour diminuer la colonisation bactérienne et par conséquent, réduire la contamination des œufs. De plus, une absence significative de croissance des SE a été observée dans les contenus d'œuf provenant des poules pondeuses vaccinées par rapport aux poules pondeuses non-vaccinées (127).

### **L'infection expérimentale suite à la vaccination par la voie orale avec une souche SE PT4 induit la production des IgA dans l'intestin et l'oviducte.**

L'inoculation d'une souche de SE lysotype 4 ( $2 \times 10^9$  CFU/oiseau) a induit la production des IgA dans l'intestin et l'oviducte environ une semaine p.i. Notre prise d'échantillons s'est étalée sur une période de 14 jours p.i. et le niveau d'IgA a été évalué à 1, 7 et 14 jours p.i. Berthelot-Hérault (2003) (34) a démontré que la production des IgA au niveau intestinal a été détectée à 2<sup>e</sup> semaine p.i. Le pic de la

production des IgA a été autour de 3<sup>e</sup> - 4<sup>e</sup> semaine p.i, et après ce temps, le niveau d'IgA a progressivement diminué chez des oiseaux de 14 semaines d'âge. Étant donné que les IgA intestinaux persistent expérimentalement jusqu'à 9<sup>e</sup> mois p.i (280), et que notre infection expérimentale a eu lieu à 9 mois (infection expérimentale 1) et à 12 mois d'âge (infection expérimentale 2), il est possible que la production des IgA intestinaux induits par la vaccination ait alors été très faible. Cette hypothèse semblerait conforme aux résultats obtenus car le niveau d'IgA intestinal a été statistiquement similaire dans les groupes vaccinés et les groupes contrôles. Ceci démontre que la protection contre la colonisation intestinale et l'invasion des organes internes est probablement liée à la réponse immunitaire suite à l'infection, c'est-à-dire à une réponse immunitaire secondaire qui s'installe, au lieu de la vaccination faite plusieurs mois auparavant. Cependant, la production rapide et la sécrétion des anticorps spécifiques à SE chez les poules pondeuses infectées ne peuvent pas éliminer complètement les salmonelles à partir de l'oviducte selon Withanage (1999) (271). Et ce, même si la dynamique des anticorps au niveau de l'oviducte est identique à celle au niveau sanguin. En effet, la production des IgA serait transitoire et diminuerait trop rapidement pour être efficace à réduire la présence des SE (271).

Un statut similaire pour la production des IgA lors de nos deux infections expérimentales consécutives (10 semaines de différence) révèle que l'âge des oiseaux n'a pas influencé la réponse immunitaire locale suite à l'infection par SE. Nos oiseaux ont été inoculés vers la fin de leur cycle de ponte (à 55 et 65 semaines d'âge); nos résultats se limitent qu'à cet âge et ne peuvent donc être considérés comme représentant la dynamique des IgA pour toute la période de ponte. Nos observations



démontrent que d'autres éléments du système immunitaire contribuent probablement aux résultats d'excrétion des salmonelles et de colonisation des organes.

**La bactérine MBL SE4C semble être plus efficace à stimuler la production des IgA tant au niveau intestinal que dans l'oviducte afin de prévenir l'excrétion des salmonelles dans les fèces, la colonisation des organes reproductifs et aussi la contamination des œufs.**

La réponse immunitaire humorale locale a révélé que la bactérine MBL SE4C est le seul vaccin qui a démontré une différence significative dans les niveaux d'IgA post-vaccination avec le protocole de deux injections par rapport à la bactérine Layermune. Même si nous n'avons pas observé de différence significative dans la production des anticorps IgA au niveau intestinal suite à l'infection expérimentale entre les oiseaux vaccinés par cette bactérine et les oiseaux non-vaccinés, le faible pourcentage et la courte durée de l'excrétion des salmonelles dans les fèces des oiseaux dans ce groupe sont probablement liés à l'efficacité des IgA au niveau intestinal.

La production des anticorps a été plus élevée dans les groupes vaccinés (sauf le groupe vacciné par 2 injections avec Layermune) que les groupes non vaccinés 7 jours p.i. Cette production des IgA offre des perspectives intéressantes si la réponse humorale locale peut efficacement participer à la protection contre la colonisation des salmonelles au niveau de l'oviducte et par la suite éviter la contamination du contenu d'œuf. Malheureusement, nous n'avons pas observé de différence significative dans la colonisation des salmonelles entre les groupes. Il est probable que le nombre limité de prélèvements (5 oiseaux/groupe) ait statistiquement joué en notre défaveur.

Cependant, la bactérine MBL SE4C a démontré un effet plus efficace sur la protection de la contamination des jaunes d'œuf au cours de notre étude. Au cours des deux infections expérimentales, aucun jaune d'œuf n'a testé positif chez le groupe de poules pondeuses vaccinés avec MBL SE4C et ceci est probablement directement corrélé avec les niveaux d'IgA plus élevés retrouvés chez ces oiseaux (groupe avec 2 injections). Ce résultat est important étant donné le risque que constitue la contamination du contenu de l'œuf pour les humains (111, 184).

### 6.1.3 Réponse immunitaire à médiation cellulaire (IMC)

Il est reconnu chez la volaille que l'IMC joue un rôle important dans la protection de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires (159). Les vaccins tués ont été utilisés avec des succès variables afin de réduire la mortalité, l'excrétion des salmonelles dans l'environnement, la colonisation au niveau de l'intestin et des organes internes (160, 186), mais ils sont moins efficaces que les vaccins vivants pour stimuler l'IMC (10, 168). De plus, l'élimination des bactéries est corrélée à l'IMC plus tôt qu'à l'immunité humorale (156), du moins dans les tissus car le rôle de l'IMC pour éliminer des salmonelles au niveau intestinal est moins clair (16).

Au cours de notre étude, nous avons évalué la réponse immunitaire cellulaire via les sous-populations des lymphocytes B et T au niveau de la rate (splénocytes) suite à la vaccination et l'infection expérimentale. Sasai et coll., (1997) (236) a rapporté que l'infection avec SE induit les changements des sous-populations de lymphocytes dans la rate et le thymus. Les lymphocytes expriment généralement des récepteurs antigéniques spécifiques à leur surface. En utilisant des anticorps spécifiques couplés aux fluorochromes pour ces récepteurs, les lymphocytes sont différenciés à la

cytométrie en flux. Le récepteur  $CD3^+$  est retrouvé sur toutes les cellules T alors que  $CD4^+$  n'est retrouvé que sur les cellules T reconnues via le processus de la présentation par les antigènes exogènes et que  $CD8^+$  n'est que trouvé sur les cellules T reconnues via le processus de la présentation par les antigènes endogènes, soit les bactéries intracellulaires (257). La majorité des cellules B circulantes chez les volailles expriment le récepteur  $IgM^+$  à leur surface (146), ce récepteur est donc un excellent antigène pour détecter des cellules B (33, 236). Nous avons établi des ratios entre les sous-populations des lymphocytes 1) cellules T versus cellules B ( $CD3^+/IgM^+$ ) 2) cellules  $T_{helper}$  versus cellules  $T_{cytotoxique}$  ( $CD4^+/CD8^+$ ) afin d'évaluer la tendance de la réponse immunitaire suite à la vaccination avec les bactéries.

### **La vaccination induit des changements sur la proportion des cellules T/cellules B et des cellules $CD4^+$ / les cellules $CD8^+$**

Le pourcentage des lymphocytes B par rapport aux lymphocytes T n'est pas mentionné dans les études précédentes. Cependant, le pourcentage des lymphocytes T au niveau de la rate chez les poules pondeuses ressemble à celui de poulets de chair âgé de 7 semaines (78). Normalement, le ratio des splénocytes  $CD4^+/CD8^+$  est de 0,2 à 0,5 (50, 209). Après la vaccination, nous avons observé des changements sur le ratio  $CD3^+/IgM^+$  et  $CD4^+/CD8^+$  mais ces changements n'ont pas eu lieu dans tous les groupes vaccinés. La réduction du ratio  $CD3^+/IgM^+$  a été observée chez le groupe vacciné avec 2 injections de Layermune à 2 semaines post vaccination. En regardant le pourcentage de chaque population, la population de  $CD3^+$  ne change pas post vaccination. La réduction du ratio est alors probablement due à l'augmentation de la population d' $IgM^+$ . Les cellules B sont donc prédominantes aux cellules T dans ce

groupe. Mais alors que l'effet de la vaccination sur le changement de cette population n'a pas été observé dans les autres groupes, la production des IgG a été observée dans tous les groupes vaccinés. Ceci pourrait s'expliquer par le petit nombre d'échantillons (3 poules pondeuses/groupe) qui a été utilisé pour ce test. Bien que les réponses des anticorps soient fréquemment rapportées chez les volailles infectées avec ST, les anticorps et les cellules B ne sont pas nécessaires afin d'éliminer ni l'infection primaire ni l'infection secondaire (26). L'interaction entre les cellules B et T est cependant essentielle afin de développer la résistance post-vaccinale. Les cellules B pourraient en effet être nécessaires pour activer des cellules T spécifiques à *Salmonella* (247).

Les bactéries tuées sont des antigènes exogènes reconnus par les cellules T helper ( $CD4^+$ ) par association au CHM classe II. Ce processus induit la production des IgG à partir des cellules B plasmatisques. Après la vaccination, les ratios  $CD4^+/CD8^+$  ont été plus élevés dans les deux groupes (MBL SE4C avec une vaccination et Layermune avec deux vaccinations). Ceci signifie qu'il y a probablement eu soit une augmentation des cellules T-  $CD4^+$ , soit une diminution des cellules T-  $CD8^+$ . Néanmoins, nous n'avons pas observé de changements significatifs dans chaque sous-population. On ne peut donc pas confirmer la tendance de la réponse immunitaire. Cependant, des souris *Igh-6<sup>-/-</sup>* (ne produisant pas de cellules B) immunisées avec un vaccin atténué de *Salmonella*, ont démontré une diminution de la capacité des cellules T- $CD4^+$  lors de la libération des cytokines type Th1 Il-2 et IFN- $\gamma$  (170).

## **L'infection expérimentale n'induit pas les changements sur les sous-populations des lymphocytes B et T**

Suite à l'injection des antigènes vaccinaux, il y a une redistribution des lymphocytes sanguins périphériques aux organes lymphoïdes secondaires. L'effet sur l'IMC n'a pas démontré de différences significatives aux divers temps (1, 7 et 14 jours p.i) entre les groupes vaccinés et les groupes contrôles suite à l'infection expérimentale. On peut suggérer que la vaccination avant le cycle de ponte avec des bactérines n'a pas d'effet sur le changement des sous-populations des lymphocytes B et T au niveau de la rate. Normalement, les pourcentages des cellules T ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) dépendent de la nature des antigènes administrés, soit les antigènes dépendant et les antigènes indépendants des cellules T (106). Au niveau de la rate, le pourcentage des cellules  $CD3^+$  totales augmentent significativement p.i avec tous les deux types d'antigènes (106). Cependant, on n'observe pas de changement sur ces cellules après l'inoculation par une souche SE PT4. Okamura et coll. (2004) (204) ont rapporté que les pourcentages des cellules T ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) au niveau de la rate ne changent pas après la stimulation des lymphocytes des oiseaux vaccinés avec l'antigène du flagelle de SE. Encore une fois, les résultats observés sur les sous-populations des lymphocytes B et T de cette étude pourrait être causé par le faible nombre d'échantillons, ou encore par notre dose infectieuse (voir la section portant sur le modèle d'infection expérimentale).

### 6.2 L'effet de la vaccination sur la transmission verticale

Les mesures de biosécurité et d'hygiène ont réduit les pourcentages de la contamination à SE chez les troupeaux parentaux dans les années récentes ce qui

entraîne la réduction de l'infection à SE chez leur progéniture. La transmission verticale est la contamination directe des jaunes d'œuf, de l'albumen, de la membrane de la coquille et la coquille, suite à l'infection des organes reproducteurs avec SE (184, 202). Puisque l'infection humaine avec SE est reliée à la contamination d'œuf, une diminution de cette transmission verticale est un des objectifs de la vaccination. Dans notre étude, nous avons évalué la transmission verticale via le taux de contamination des jaunes d'œuf.

### **L'utilisation de la bactérine MBL SE4C avec 2 immunisations a un effet sur la protection contre la contamination des jaunes d'œuf**

La contamination des jaunes d'œuf n'a pas été observée dans les groupes vaccinés avec MBL SE4C par deux injections au cours des deux infections expérimentales et ce, même si ce groupe présentait des isollements positifs à SE dans les organes reproducteurs post première infection. Ces résultats ont montré que cette bactérine pourrait être plus efficace pour diminuer la transmission verticale. La déposition de SE à l'intérieur des œufs semble être le résultat de la colonisation des salmonelles dans les organes reproducteurs, particulièrement les ovaires et la partie supérieure de l'oviducte lors d'une infection systémique (65, 184, 202). Cependant d'autres études ont démontré qu'une fréquence élevée de la colonisation des tissus reproducteurs ne mène pas toujours à une fréquence élevée de la contamination des œufs (18, 180).

### 6.3 L'effet de la vaccination sur la transmission horizontale

La transmission horizontale est évaluée par 1) l'excrétion fécale des salmonelles 2) la colonisation des organes internes et 3) la contamination des œufs des oiseaux sains en contact avec des oiseaux infectés

#### **Corrélation proportionnelle entre l'excrétion fécale des salmonelles des oiseaux infectés et celle des oiseaux en contact**

Chez les fermes commerciales des poules pondeuses, le problème majeur est la contamination des poulaillers. Le vide sanitaire ne prévient pas l'infection à SE entre les troupeaux (62, 84) et la persistance de SE chez les oiseaux infectés (264) et leur environnement contaminé (61, 231) pourrait amplifier la transmission horizontale. De plus, une exposition initiale légère peut affecter un large nombre des oiseaux (101).

Au cours de notre étude, nous avons observé une corrélation entre le pourcentage élevé de l'excrétion des salmonelles chez les oiseaux inoculés et le pourcentage élevé de l'excrétion des salmonelles chez les oiseaux en contact. Tel que mentionné dans la section « Modèle expérimental », notre étude a expérimentalement démontré une transmission horizontale qui est similaire à la transmission naturelle. Quoique les résultats ne relèvent pas de différences statistiques entre l'excrétion des salmonelles des groupes vaccinés et celle des groupes non vaccinés, la diminution des pourcentages de l'excrétion des salmonelles a été observée dans les groupes vaccinés après 7 jours de contact. Cette tendance indique que la vaccination avec les bactérines pourrait diminuer l'excrétion des salmonelles lors d'infections naturelles, diminuer la contamination de l'environnement des poulaillers et donc, les risques de transmission horizontale.

**La bactérine MBL SE4C est plus efficace pour la prévention de l'excrétion des salmonelles dans les fientes des oiseaux naturellement infectés.**

La transmission de SE (oiseaux infectés à oiseaux en contact) n'a pas été différente entre les oiseaux vaccinés et les oiseaux contrôles. Cependant, l'excrétion des salmonelles chez les oiseaux vaccinés avec le vaccin MBL SE4C est moins fréquente que chez les oiseaux contrôles. Le vaccin MBL SE4C a induit une réponse immunitaire humorale locale (IgA) et a ainsi diminué l'excrétion des salmonelles dans les fientes de même que la contamination des œufs chez les oiseaux expérimentalement infectés. L'excrétion des salmonelles est intermittente et la dose d'infection influence la persistance de l'infection (264). Dans le cas de l'infection naturelle par contact direct, une dose légère peut entraîner une infection persistante pendant une longue période. Ces observations indiquent qu'il serait intéressant d'utiliser le vaccin MBL SE4C pour entre autre, diminuer la contamination de l'environnement.

6.4 L'identification des protéines bactériennes immunogènes *in vivo* durant l'infection/la vaccination des poules pondeuses

L'objectif le plus important de la vaccination est la prévention et la réduction de la colonisation des intestins et des tissus reproducteurs, afin de prévenir l'excrétion des salmonelles dans les fientes et la contamination des œufs. Les vaccins vivants atténués sont généralement considérés être plus efficace pour maîtriser les salmonelloses que les vaccins tués (les bactérines). Néanmoins, l'utilisation de vaccins vivants comporte divers risques dont le retour à la virulence et la survie des salmonelles dans les produits finaux (20). Un de nos objectifs est le développement



éventuel d'un vaccin sous-unitaire qui permettrait d'induire une réponse immunitaire contre les infections causées par les deux sérotypes SE et ST.

### **Les protéines immunoréactives identifiées ne sont pas liées à leur capacité protective**

La capacité protective des protéines a été évaluée en comparant la présence de ces protéines dans les séra des différents groupes d'oiseaux dans notre modèle expérimental. Le premier critère sélectionné pour l'identification des protéines fut le statut de la santé des oiseaux p.i, donc les oiseaux présentant des signes cliniques et des lésions versus des oiseaux sains. Étant donné que l'excrétion des salmonelles est une source importante de transmission des salmonelles dans les troupeaux, le deuxième critère choisi a été celui concernant le statut d'excrétion des salmonelles dans les fientes, et donc les oiseaux excréant constamment les salmonelles versus ceux excréant en intermittence. Dans les deux comparaisons, les protéines immunoréactives identifiées ont été presque similaires entre les oiseaux malades et les oiseaux sains. La capacité de la protection n'est donc vraisemblablement pas liée aux protéines identifiées. Néanmoins, les analyses par le Western blot ont été faites avec des sérums et donc des IgG, ce qui peut expliquer partiellement ce manque de corrélation avec la protection, puisque la réponse immunitaire locale (IgA) joue aussi un rôle important dans la protection contre l'infection à *Salmonella*. Celui-ci serait naturellement stimulé avec un vaccin sous-unitaire administré par la voie orale.

**Cinq protéines candidates et communes aux sérovars SE et ST ont été identifiées:** 1-Lipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4); 2-Enolase (EC4.2.1.11) (2-phosphoglycerate déshydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase); 3- Elongation

factor Tu (EF-Tu); 4- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH; 5-DNA protection during starvation protein.

La sélection des protéines candidates a été basée sur des critères biologiques et immunologiques 1) Ces protéines sont fortement conservées au niveau génétique entre des souches SE et ST 2) Les fonctions immunologiques de ces protéines sont reconnues dans la bibliographie chez une autre espèce, idéalement chez *Salmonella* 3) les gènes codant pour ces protéines sont également trouvés dans la banque génétique avec identité élevée (98-99 %) 4) Ces protéines doivent avoir les meilleurs points lors de l'identification par la spectrométrie de masse (supérieur à 200) 5) Ces protéines sont transitoirement exprimées en une quantité au moins à la surface bactérienne, soit les antigènes de la surface.

## **Chapitre 8. CONCLUSIONS**

Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité de la vaccination à *Salmonella* Enteritidis chez la poule pondeuse et la protection contre l'infection expérimentale et naturelle.

D'une manière générale, cette étude nous a permis de mieux comprendre la réponse immunitaire suite à la vaccination avec des bactérines commerciales, de même que la protection conférée par ces vaccins contre l'infection à *Salmonella* Enteritidis chez les poules pondeuses. D'une manière spécifique, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

- 1- Il n'y a pas de différence significative entre le protocole de vaccination avec une immunisation et celui avec deux immunisations au niveau de la réponse immunitaire (sauf le niveau d'IgG du protocole de vaccination avec 2 immunisations qui est plus élevé que celui du protocole avec 1 immunisation post-vaccination)
- 2- Les bactérines induisent une réponse immunitaire humorale (IgG) pendant toute la période expérimentale (55 et 65 semaines d'âge).
- 3- La réponse immunitaire locale (IgA) est présente mais son efficacité à prévenir l'excrétion des salmonelles et de la contamination des œufs n'est pas connue.
- 4- Le rôle de la réponse immunitaire cellulaire n'est pas connu dans la protection contre l'infection à SE

- 5- La bactérine MBL SE4C est plus efficace que Layermune pour diminuer le pourcentage de la contamination des œufs et de l'excrétion des salmonelles en utilisant le protocole avec 2 immunisations.
- 6- Les bactérines protègent partiellement des poules pondeuses contre l'infection à SE en diminuant la prévalence de l'excrétion des salmonelles dans les fientes, la contamination des œufs et la transmission horizontale.
- 7- Cinq protéines candidates ont été identifiées pour le développement d'un vaccin sous-unitaire : Lipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4); Enolase (EC4.2.1.11) (2-phosphoglycerate déhydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase); Elongation factor Tu (EF-Tu); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) GAPDH; DNA protection during starvation protein.

Nous avons vérifié au cours de cette étude que la protection conférée par deux bactérines ne peut pas empêcher complètement l'excrétion des salmonelles dans les fientes, la contamination des œufs ni la transmission horizontale des oiseaux infectés aux oiseaux sains.

La reconnaissance de la limite de ces bactérines devrait impliquer des modifications dans la gestion du programme régulier de prévention contre SE tel qu'appliqué sur le terrain. D'autre part, l'efficacité relative d'un des vaccins utilisés pourrait permettre d'optimiser l'intervention lors de futures épisodes de contamination dans les œufs de consommation. En effet, notre étude a démontré que l'utilisation de la bactérine MBL SE4C avec deux immunisations consécutives peut réduire l'excrétion fécale des salmonelles et la contamination d'œuf et que cette protection est probablement liée à

la protection locale via les anticorps (IgA) muqueuses. Notre projet a donc permis de valider scientifiquement un protocole de vaccination durant tout le cycle de ponte afin d'en recommander l'inclusion dans le cadre d'un programme préventif. Il faudrait cependant vérifier plus en détail la réponse immunitaire au niveau local (intestin et organes reproducteurs) qui joue probablement un rôle central pour empêcher la colonisation bactérienne. L'évaluation de la réponse immunitaire au niveau local devrait idéalement combiner l'évaluation de la réponse IgA mucoale et celle des cellules immunitaires (hétérophiles, monocytes, macrophages, cellules B, cellules T CD4+, et CD8+) des tissus lymphatiques, au niveau de l'intestin (131). Au niveau des organes reproducteurs, la réponse immunitaire locale médiée par le MHC classe II, les cellules T et les cellules B apparaît après l'invasion des salmonelles (22, 279). L'évaluation des populations des cellules locales pourrait être vérifiée par immunohistochimie en utilisant les anticorps monoclonaux spécifiques à chaque type cellulaire. La réponse immunitaire de cette étude a démontré clairement que seulement le niveau d'IgG dans les séroconversions est le paramètre différent important entre les oiseaux vaccinés et les oiseaux contrôles. Étant donné que les anticorps (IgG) dans le sérum sont activement transférés et accumulés dans le jaune d'œuf chez la poule pondeuse (279), ces anticorps pourraient jouer un rôle intéressant afin de réduire la présence des salmonelles dans le jaune d'œuf. Ainsi, l'évaluation du niveau des anticorps dans le jaune d'œuf par l'ELISA serait aussi un paramètre à vérifier afin de voir si la présence de ces anticorps pourrait prévenir la transmission verticale qui est un point critique dans la protection de la santé publique.

Il serait également important de poursuivre les études sur l'identification des protéines immunogènes afin d'élaborer un vaccin sous-unitaire qui devrait être

théoriquement plus efficace que les vaccins actuels pour prévenir les infections chez la volaille. La nouvelle stratégie de vaccination contre les infections à *Salmonella* devrait favoriser une administration mucosale afin d'éliciter une réponse immunitaire pertinente. La suite des travaux devrait déterminer les paramètres relatifs à la mise au point d'un tel vaccin. La purification à grande échelle de la protéine immunogène identifiée sera confirmée par le clonage de sa séquence codante dans un vecteur d'expression. La protéine recombinante doit être exprimée *in vitro* afin de démontrer que cette protéine est spécifiquement reconnue par les séroconversions. Cet objectif sera vérifié par immuno-dot et/ou ELISA. La mise au point d'un véhicule de livraison membranaire, soit des microsphères à base de PLGA (acides poly D, L-lactique-co-glycolique) devrait être effectuée dans les prochaines étapes. La livraison de protéines antigéniques par ce mode augmenterait l'immunogénicité et la protection des antigènes, en permettant une libération façon contrôlée et continue de l'antigène (160). La localisation et la persistance des microsphères de même que la libération des antigènes devront cependant être vérifiées *in vivo* chez des oiseaux, possiblement grâce à la microscopie électronique et l'immunohistochimie. Une étude *in vivo* par immunisation à diverses doses et infection expérimentale subséquente chez les oiseaux vaccinés permettra d'évaluer l'efficacité du vaccin en vérifiant tant la réponse immunitaire que la protection conférée post-vaccination.

Comme vous pouvez le constater, les questions suite à un tel projet demeurent tout aussi nombreuses qu'au début, mais les réponses obtenues s'avèrent très utiles pour l'industrie des poudeuses commerciales. Les suites à donner et les travaux à venir sont par contre fort prometteurs de meilleures méthodes de contrôle de *Salmonella* Enteritidis, qui demeure encore aujourd'hui un risque pour la santé publique.

## **Chapitre 9. BIBLIOGRAPHIE**



1. ACIA. 2009. *Les vaccins disponibles autorisés au Canada*. Agence canadienne d'inspection des aliments. Retrieved Octobre 18, 2009 from [http://active.inspection.gc.ca/scripts/database/vetbio\\_submit.asp?lang=f&species=2&manufacturer=all](http://active.inspection.gc.ca/scripts/database/vetbio_submit.asp?lang=f&species=2&manufacturer=all).
2. Adriaensen, C., De Greve, H., Tian, J.Q., De Craeye, S., Gubbels, E., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Kumar, M. and Hernalsteens JP. 2007. A live *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vaccine allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Infect Immun* **75**:2461-2468.
3. Allen-Vercoe, E., A. R. Sayers, and M. J. Woodward. 1999. Virulence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. *Epidemiol Infect* **122**:395 - 402.
4. Allen-Vercoe, E., and M. J. Woodward. 1999. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *J Med Microbiol* **48**:771 - 780.
5. Altekruse, S. F., Bauer, N., Chanlongbutra, A., DeSagun R., Naugle, A., Schlosser, W., Umholtz, R. and White, P. 2006. *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens, United States, 2000-2005. *Emerg Infect Dis* **12**:1848-1852.
6. Asheg, A., V. Fedorova, J. Pistl, M. Levkut, V. Revajova, L. Kolodzieyski, Z. Sevcikova, and E. Pilipcinec. 2001. Effect of low and high doses of *Salmonella* Enteritidis PT4 on experimentally infected chicks. *Folia Microbiol* **46**:459-462.
7. Asheg, A., M. Levkut, V. Revajová, Z. Sevcíková, L. Kolodzieyski, and J. Pistl. 2002. T lymphocyte subpopulations and B lymphocyte cells in caecum

- and spleen of chicks infected with *Salmonella* Enteritidis. *Acta Histochemica* **104**:435-439.
8. Atterbury, R. J., J. J. Carrique-Mas, R. H. Davies, and V. M. Allen. 2009. *Salmonella* colonisation of laying hens following vaccination with killed and live attenuated commercial *Salmonella* vaccines. *Vet Rec* **165**:493-496.
  9. Baay, M. F. D., and J. H. J. H. i. t. Veld. 1993. Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *J Appl Microbiol* **74**:243-247.
  10. Babu, U., Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne R B, Gaines D and Heckert RA. 2004. *Salmonella* Enteritidis clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Veterinary Immunol and Immunopathol* **101**:251-257.
  11. Babu, U., Scott M, Myers MJ, Okamura M, Gaines D, Yancy HF, Lillehoj H, Heckert RA and Raybourne RB. 2003. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet Immunol Immunopathol* **91**:39-44.
  12. Baird-Parker, A. C. 1990. Foodborne salmonellosis. *The Lancet*. **336**:1231-1235.
  13. Barrow, P. A. 1993. *Salmonella* controle : past, present and future. *Avian Pathol* **22**:651 - 669.
  14. Barrow, P. A. 1992. Further Observations on the Serological Response to Experimental *Salmonella* Typhimurium in Chickens Measured by ELISA. *Epidemiol and Infect* **108**:231-241.

15. Barrow, P. A. 1992. ELISAs and the Serological Analysis of *Salmonella* Infections in Poultry: A Review. *Epidemiol and Infect* **109**:361-369.
16. Barrow, P. A. 2007. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol* **36**:1 - 13.
17. Barrow, P. A. 1991. Immunological control of *Salmonella* in poultry, p. 199-217. *In*: L. C. Blackenship (ed), *Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry*. Academic, San Diego, CA.
18. Barrow, P. A., and M. A. Lovell. 1991. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Avian Pathol* **20**:335 - 348.
19. Barrow, P. A., M. A. Lovell, and B. A. D. Stocker. 2000. Protection against experimental fowl typhoid by parenteral administration of live SL5828, an aroA-serC (aromatic dependent) mutant of a wild-type *Salmonella* Gallinarum strain made lysogenic for P22. *Avian Pathol* **29**:423 - 431.
20. Barrow, P. A., K. Page, and M. A. Lovell. 2001. The virulence for gnotobiotic pigs of live attenuated vaccine strains of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine* **19**:3432-3436.
21. Barrow, P. A., J. M. Simpson, and M. A. Lovell. 1988. Intestinal colonisation in the chicken by food poisoning *Salmonella* serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. *Avian Pathol* **17**:571 - 588.
22. Barua, A., and Y. Yoshimura. 2004. Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens (*Gallus domesticus*). *Poult Sci* **83**:997-1002.

23. Baskerville, A., T. J. Humphrey, R. B. Fitzgeorge, R. W. Cook, H. Chart, B. Rowe, and A. Whitehead. 1992. Airborne infection of laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Vet Rec* **130**:395-398.
24. Bäumlér, A. J., Tsolis, R.M. and Fred Heffron. 2000. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis, p. 57-72. *In*: Wray, C. and A.Wray (ed), *Salmonella* in Domestic Animals, CABI Publishing, New York.
25. Bäumlér, A. J., Tsolis, R.M. and Fred Heffron. 1995. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic Basis., p. 57-87. *In*: A. R. James, Carole A. B., Chris Minion F. and Michael J. Wannemuehler (ed), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
26. Beal, R. K., C. Powers, T. F. Davison, P. A. Barrow, and A. L. Smith. 2006. Clearance of Enteric *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Chickens Is Independent of B-Cell Function. *Infect Immun* **74**:1442-1444.
27. Beal, R. K., C. Powers, P. Wigley, P. A. Barrow, P. Kaiser, and A. L. Smith. 2005. A Strong Antigen-Specific T-Cell Response Is Associated with Age and Genetically Dependent Resistance to Avian Enteric *Salmonellosis*. *Infect Immun* **73**:7509-7516.
28. Beal, R. K., C. Powers, P. Wigley, P. A. Barrow, and A. L. Smith. 2004. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Avian Pathol* **33**:25 - 33.
29. Beal, R. K., P. Wigley, C. Powers, P. A. Barrow, and A. L. Smith. 2006. Cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Salmonella enterica*

- serovars Typhimurium and Enteritidis are associated with protection to heterologous re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol* **114**:84-93.
30. Beal, R. K., P. Wigley, C. Powers, S. D. Hulme, P. A. Barrow, and A. L. Smith. 2004. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol* **100**:151-164.
  31. Berchieri, A., P. Wigley, K. Page, C. K. Murphy, and P. A. Barrow. 2001. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. *Avian Pathol* **30**:297 - 310.
  32. Berndt, A., and U. Methner. 2001. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. *Vet Immunol Immunopathol* **78**:143-161.
  33. Berndt, A., and U. Methner. 2004. B cell and macrophage response in chicks after oral administration of *Salmonella* Typhimurium strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**:235-246.
  34. Berthelot-Hérault, F., F. Mompert, M. S. Zygmunt, G. Dubray, and M. Duchet-Suchaux. 2003. Antibody responses in the serum and gut of chicken lines differing in cecal carriage of *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* **96**:43-52.
  35. Blanc-Potard, A.-B., and E. A. Groisman. 1997. The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* **16**:5376-5385.

36. Bohez, L., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and F. Van Immerseel. 2007. Long-term colonisation-inhibition studies to protect broilers against colonisation with *Salmonella* Enteritidis, using *Salmonella* Pathogenicity Island 1 and 2 mutants. *Vaccine* **25**:4235-4243.
37. Boulianne, M. 2004. Communication personnelle. Saint-Hyacinthe.
38. Braden, C. R. 2006. Food Safety: *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States. *Clin Infect Dis* **43**:512-517.
39. Bryan, F. L., J. C. Ayres, and A. A. Kraft. 1968. Contributory sources of *Salmonellae* on Turkey products. *Am J Epidemiol* **87**:578-591.
40. Carrique-Mas, J. J., M. Breslin, L. Snow, I. McLaren, A. R. Sayers, and R. H. Davies. 2009. Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiol Infect* **137**:837-846.
41. Carrique-Mas, J. J., and R. H. Davies. 2008. Salmonella Enteritidis in commercial layer flocks in Europe: legislative background, on-farm sampling and main challenges. *Revista Bras Cienci Avicol* **10**:1-9.
42. Carter, P. B., and F. M. Collins. 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* **139**:1189-1203.
43. Casadevall, A. 2003. Antibody-Mediated Immunity against Intracellular Pathogens: Two-Dimensional Thinking Comes Full Circle. *Infect Immun* **71**:4225-4228.
44. Casadevall, A., and L.A. Pirofski. 2003. Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**:474-478.

45. Castellan, D. M., H. Kinde, P. H. Kass, G. Cutler, R. E. Breitmeyer, D. D. Bell, R. A. Ernst, D. C. Kerr, H. E. Little, D. Willoughby, H. P. Riemann, A. Ardans, J. A. Snowdon, and D. R. Kuney. 2004. Descriptive Study of California Egg Layer Premises and Analysis of Risk Factors for *Salmonella enterica* serotype Enteritidis as Characterized by Manure Drag Swabs. *Avian Dis* **48**:550-561.
46. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. *Salmonella* Enteritidis Update. FoodNet Report. Retrieved October 18, 2009 from <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm>.
47. Chambers, J. R., and X. Lu. 2002. Probiotics and Maternal Vaccination for *Salmonella* Control in Broiler Chickens. *J Appl Poult Res* **11**:320-327.
48. Chart, H., D. Conway, and B. Rowe. 1993. Outer Membrane Characteristics of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 Growing in Chickens. *Epidemiol Infect* **111**:449-454.
49. Chatfield, S., G. Dougan, and I. Charles. 1990. Complete nucleotide sequence of the *aroA* gene from *Salmonella typhi* encoding 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. *Nucl Acids Res* **18**:6133-.
50. Chen, C.-L. H., Pickel, J.M., Lahti, J.M., Cooper, M.D. 1991. Surface markers on avian immune cells p. 1-22. *In*: J. M. Sharma (e.). *Avian Cellular Immunology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
51. Chilcott, G. S., and K. T. Hughes. 2000. Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:694-708.

52. Christina, L., Swaggerty, P.J., Ferro, I.Y., Pevzner, M. and H. Kogut. 2005. Heterophils are associated with resistance to systemic *Salmonella* Enteritidis infections in genetically distinct chicken lines. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**:149-154.
53. Clifton-Hadley, F. A., M. Breslin, L. M. Venables, K. A. Sprigings, S. W. Cooles, S. Houghton, and M. J. Woodward. 2002. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Vet Microbiol* **89**:167-179.
54. Coburn, B., G. A. Grassl, and B. B. Finlay. 2006. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* **85**:112-118.
55. Collins, F. M. 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. *Microbiol Mol Biol Rev* **38**:371-402.
56. Collins, F. M., and S. G. Campbell. 1982. Immunity to intracellular bacteria. *Vet Immunol Immunopathol* **3**:5-66.
57. Cooper, G. L., L. M. Venables, M. J. Woodward, and C. E. Hormaeche. 1994. Invasiveness and persistence of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and a genetically defined *S. Enteritidis* aroA strain in young chickens. *Infect Immun* **62**:4739-4746.
58. Cossart, P., and Philippe J. Sansonetti. 2004. Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science* **304**:242-248.
59. Craig, T. P., David, E.L., Henzler, J. and J.,Guard-Petter. 2001. Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Environ Microbiol* **3**:332-342.



60. Davies, R., and M. Breslin. 2001. Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in laying flocks. *Vet Rec* **149**:699-704.
61. Davies, R., and M. Breslin. 2003. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella* Enteritidis on commercial laying chicken farms. *Vet Rec* **153**:673-677.
62. Davies, R., and M. Breslin. 2004. Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathol* **33**:133 - 144.
63. Davies, R. H., and C. Wray. 1996. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *Br Poult Sci* **37**:589 - 596.
64. Davison, S., C. E. Benson, D. J. Henzler, and R. J. Eckroade. 1999. Field Observations with *Salmonella* Enteritidis Bacterins. *Avian Dis* **43**:664-669.
65. De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. and R. Ducatelle. 2004. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol* **97**:233-245.
66. Deng, S. X., A. C. Cheng, M. S. Wang, and P. Cao. 2008. Serovar-specific real-time quantitative detection of *Salmonella* Enteritidis in the gastrointestinal tract of ducks after oral challenge. *Avian Dis* **52**:88-93.
67. Desmidt, M., R. Ducatelle, and F. Haesebrouck. 1998. Research notes: Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis phage type four. *Poult Sci* **77**:73-74.

68. Desmidt, M., R. Ducatelle, and F. Haesebrouck. 1997. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. *Vet Microbiol* **56**:99-109.
69. Desmidt, M., R. Ducatelle, J. Mast, B. M. Goddeeris, B. Kaspers, and F. Haesebrouck. 1998. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type four infection in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* **63**:355-367.
70. Dibb-Fuller, M. P., and M. J. Woodward. 2000. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella* Enteritidis to colonization and invasion of chicks. *Avian Pathol* **29**:295 - 304.
71. Ebel, E., and W. Schlosser. 2000. Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis in the United States. *Intert J Food Microbiol* **61**:51-62.
72. EFSA. 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal* **130**:1-352.
73. EFSA. 2008. Scientific Report. *The EFSA journal*. **198**: 1-224.
74. EFSA. 2004. The use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *The EFSA Journal*. **114**: 1-74.
75. EFSA. 2007. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. *The EFSA Journal* **97**:1-85.
76. EFSA. 2009. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA journal* **223**:1-259.

77. Erf, G. F. 2004. Cell-mediated immunity in poultry. *Poult Sci* **83**:580-590.
78. Erf, G. F., W. G. Bottje, and T. K. Bersi. 1998. CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol* **62**:339-348.
79. Ernst, R. K., T. Guina, and S. I. Miller. 1999. How Intracellular Bacteria Survive: Surface Modifications That Promote Resistance to Host Innate Immune Responses. *J Infect Dis* **179**:S326-S330.
80. Fadl, A. A., Venkitanarayanan, K. S. and M. I. Khan. 2002. Identification of *Salmonella* Enteritidis outer membrane proteins expressed during attachment to human intestinal epithelial cells. *J Appl Microbiol* **92**:180-186.
81. Farnell, M. B., M. E. Halawani, Y. Seungkwon, A. P. McElroy, B. M. Hargis, and D. J. Caldwell. 2001. In vivo Biologic Effects of Recombinant-Turkey Interferon-Gamma in Neonatal Leghorn Chicks: Protection against *Salmonella* Enteritidis Organ Invasion. *Avian Dis* **45**:473-478.
82. Farr, S. B., and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Mol Biol Rev* **55**:561-585.
83. Feberwee, A., T. S. d. Vries, A. R. W. Elbers, and W. A. d. Jong. 2000. Results of a *Salmonella* Enteritidis Vaccination Field Trial in Broiler-Breeder Flocks in The Netherlands. *Avian Dis* **44**:249-255.
84. Feberwee, A., T. S. d. Vries, E. G. Hartman, J. J. d. Wit, A. R. W. Elbers, and W. A. d. Jong. 2001. Vaccination against *Salmonella* Enteritidis in Dutch Commercial Layer Flocks with a Vaccine Based on a Live *Salmonella gallinarum* 9R Strain: Evaluation of Efficacy, Safety, and Performance of Serologic *Salmonella* Tests. *Avian Dis* **45**:83-91.

85. Fierer, J. 2001. Polymorphonuclear leukocytes and innate immunity to *Salmonella* infections in mice. *Microb Infect* **3**:1233-1237.
86. Finlay, B. B. a. A. S. 1995. Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens, p. 33-45. *In*: A. R. James, Carole A. B., Chris Minion F. and Michael J. Wannemuehler (ed), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
87. Fort, C. 2000. *Salmonella enterica serotype Enteritidis in table egg layers in the U.S.* National Animal Health Monitoring System. Retrieved Octobre 18, 2009 from <http://nahms.aphis.usda.gov/poultry/layers99/lay99se.pdf>
88. Foster, J. W., and M. P. Spector. 1995. How *Salmonella* Survive Against the Odds. *Annu Rev Microbiol* **49**:145-174.
89. FPOCQ. 2004. *Compilation des tests de dépistage de salmonelles en 2004*. In. Rapport du programme de surveillance de la Fédération des producteurs d'oeufs de consommation du Québec.
90. Fukutome, K., S. Watarai, M. Mukamoto, and H. Kodama. 2001. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis antigen. *Dev Comp Immunol* **25**:475-484.
91. Gantois, I., R. Ducatelle, L. Timbermont, F. Boyen, L. Bohez, F. Haesebrouck, F. Pasmans, and F. Van Immerseel. 2006. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella vac(R) E* and TAD *Salmonella vac(R) T* reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* **24**:6250-6255.

92. Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J. & Van Immerseel F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiol Rev **33**:718-738.
93. Ganz, T. 2003. The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. Integr Comp Biol **43**:300-304.
94. Garber, L., M. Smeltzer, P. Fedorka-Cray, S. Ladely, and K. Ferris. 2003. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Table Egg Layer House Environments and in Mice in U.S. Layer Houses and Associated Risk Factors. Avian Dis **47**:134-142.
95. Garcia-del Portillo, F., and B. B. Finlay. 1994. *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. Infect Immun **62**:4641-4645.
96. Garcia-del Portillo, F., and B. B. Finlay. 1995. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. Trends Microbiol **3**:373-380.
97. Gast, R. K., and C.W., Beard. 1990. Production of *Salmonella* enteritidis-Contaminated Eggs by Experimentally Infected Hens. Avian Dis **34**:438-446.
98. Gast, R. K., J. Guard-Bouldin, and P. S. Holt. 2005. The Relationship Between the Duration of Fecal Shedding and the Production of Contaminated Eggs by Laying Hens Infected with Strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. Avian Dis **49**:382-386.
99. Gast, R. K., J. Guard-Bouldin, and P. S. Holt. 2004. Colonization of Reproductive Organs and Internal Contamination of Eggs after Experimental

- Infection of Laying Hens with *Salmonella heidelberg* and *Salmonella* Enteritidis. Avian Dis **48**:863-869.
100. Gast, R. K., and P. S. Holt. 2001. The Relationship between the Magnitude of the Specific Antibody Response to Experimental *Salmonella* Enteritidis Infection in Laying Hens and Their Production of Contaminated Eggs. Avian Dis **45**:425-431.
  101. Gast, R. K., and P. S. Holt. 2000. Deposition of Phage Type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis Strains in the Yolk and Albumen of Eggs Laid by Experimentally Infected Hens. Avian Dis **44**:706-710.
  102. Gast, R. K., and P. S. Holt. 1999. Experimental Horizontal Transmission of *Salmonella* Enteritidis Strains (Phage Types 4, 8, and 13A) in Chicks. Avian Dis **43**:774-778.
  103. Gast, R. K., and P. S. Holt. 1998. Persistence of *Salmonella* Enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. Poultry Sci **77**:1759-1762.
  104. Gast, R. K., H. D. Stone, P. S. Holt, and C. W. Beard. 1992. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* Enteritidis. Avian Dis **36**:992-999.
  105. Gast, R. K. a. B. S. T. 1996. Intestinal colonization and organ invasion in chicks experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis phage type 4 and other phage types isolated from poultry in the United States. Avian Dis **40**:853-857.
  106. Gehad, A. E., H. S. Lillehoj, G. L. Hendricks, and M. M. Mashaly. 2002. Initiation of humoral immunity. II. The effects of T-independent and T-

- dependent antigens on the distribution of lymphocyte populations. *Dev Comp Immunol* **26**:761-771.
107. Gillespie, I. a. R. E. 2005. Successful reduction of human *Salmonella* Enteritidis infection in England and Wale. *Eurosurveillance* **10**.
  108. Gorham, S. L., Kadavil, K., E. Vaughan, H. Lambert, J. Abel, and B. Pert. 1994. Gross and Microscopic Lesions in Young Chickens Experimentally Infected with *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* **38**:816-821.
  109. Grimont, P. A. D., Grimont, F. and Philippe Bouvet. 2000. Taxonomy of the Genus *Salmonella*, p. 1-17. *In*: Wray, C. a and A.Wray (ed), *Salmonella* in Domestic animals. CABI Publishing, New York.
  110. Groisman, E. A., Blanc-Potard, A.B. and Keiichi Uchiya. 1999. Pathogenicity Islands and the Evolution of *Salmonella* virulence, p. 127-150. *In*: Kaper, J.B. and H. Jörg (ed), Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. ASM Press, Washington, D.C.
  111. Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ Microbiol* **3**:421-430.
  112. Guard-Petter, J., D. J. Henzler, M. M. Rahman, and R. W. Carlson. 1997. On-farm monitoring of mouse-invasive *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs. *App. Environ Microbiol* **63**:1588-1593.
  113. Guillot, J. F., C. Beaumont, F. Bellatif, C. Mouline, F. Lantier, P. Colin and J. Protais. 1995. Comparison of resistance of various poultry lines to infection by *Salmonella* Enteritidis. *Vet Res* **26**:81-86.

114. Hafez, M. H., and Jodas, S. 2000. *Salmonella* Infections in Turkeys, p. 133-155. In: Wray C, and A. Wray (ed), *Salmonella* in Domestic animals. CABI Publishing, New York.
115. Hafez, M. H. a. S., A. 1997. *Salmonella* Enteritidis colonization in turkey poult. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **104**:118-120.
116. Harrison, J. A., B. Villarreal-Ramos P. Mastroeni R. Demarco De Hormaeche C. E. Hormaeche. 1997. Correlates of protection induced by live Aro - *Salmonella* Typhimurium vaccines in the murine typhoid model. Immunology **90**:618-625.
117. Hassan, J. O., A. P. A. Mockett, D. Catty, and P. A. Barrow. 1991. Infection and Reinfection of Chickens with *Salmonella* Typhimurium: Bacteriology and Immune Responses. Avian Dis **35**:809-819.
118. Hassan, J. O., S. B. Porter, and R. Curtiss, III. 1993. Effect of Infective Dose on Humoral Immune Responses and Colonization in Chickens Experimentally Infected with *Salmonella* Typhimurium. Avian Dis **37**:19-26.
119. He, H., M. B. Farnell, and M. H. Kogut. 2003. Inflammatory agonist stimulation and signal pathway of oxidative burst in neonatal chicken heterophils. Part A: Molecular & Integrative Physiology. Comp Biochem Physiol **135**:177-184.
120. He, H., K. J. Genovese, C. L. Swaggerty, D. J. Nisbet, and M. H. Kogut. 2007. In vivo priming heterophil innate immune functions and increasing resistance to *Salmonella* Enteritidis infection in neonatal chickens by immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. Vet Immunol Immunopathol **117**:275-283.



121. Henderson, B., S. Poole, and M. Wilson. 1996. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* **60**:316-341.
122. Henzler, D. J., Kradel, D.C. and Sischo, W.M. 1998. Management and environmental risk factors for *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs. *Am J Vet Res* **59**:824-829.
123. Henzler, D. J., and H. M. Opitz. 1992. The Role of Mice in the Epizootiology of *Salmonella* Enteritidis Infection on Chicken Layer Farms. *Avian Dis* **36**:625-631.
124. Hersh, B. M., F. T. Farooq, D. N. Barstad, D. L. Blankenhorn, and J. L. Slonczewski. 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:3978-3981.
125. Hinton, M., E. J. Threlfall, and B. Rowe. 1990. The invasiveness of different strains of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 for young chickens. *FEMS Microbiol Lett* **70**:193-196.
126. Holt, P. S., Mitchell, B.W. and Gast, R.K. 1998. Airborne horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in molted laying chickens. *Avian Dis* **42**:45.
127. Holt, P. S., H. D. Stone, R. K. Gast, and J. R. E. Porter. 1996. Growth of *Salmonella* Enteritidis (SE) in egg contents from hens vaccinated with an SE bacterin. *Food Microbiol* **13**:417-426.
128. Hoop, R. K., and A. Pospischil. 1993. Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in laying hens with naturally acquired *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection. *Vet Rec* **133**:391-393.

129. Hormaeche, C. E., P. Mastroeni, J. A. Harrison, R. D. de Hormaeche, S. Svenson, and B. A. D. Stocker. 1996. Protection against oral challenge three months after i.v. immunization of BALB/c mice with live Aro *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis vaccines is serotype (species)-dependent and only partially determined by the main LPS O antigen. *Vaccine* **14**:251-259.
130. Hsu, H. S. 1989. Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. *Microbiol Mol Biol Rev* **53**:390-409.
131. Hughes, E. A., and J. E. Galán. 2002. Immune Response to *Salmonella*: Location, Location, Location? *Immunity* **16**:325-328.
132. Humphrey, T. J., A. Baskerville, H. Chart, B. Rowe, and A. Whitehead. 1991. *Salmonella* Enteritidis PT4 infection in specific pathogen free hens: influence of infecting dose. *Vet Rec* **129**:482-485.
133. Humphrey, T. J., A. Baskerville, H. Chart, B. Rowe, and A. Whitehead. 1992. Infection of laying hens with *Salmonella* Enteritidis PT4 by conjunctival challenge. *Vet Rec* **131**:386-388.
134. Humphrey, T. J., A. Whitehead, A. H. L. Gawler, A. Henley, and B. Rowe. 1991. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the Contents of Naturally Contaminated Hens' Eggs. *Epidemiol Infect* **106**:489-496.
135. Jenny, M. W., and A. K. Michael. 2006. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* **208**:270-282.
136. Joiner, K. A., R. Scales, K. A. Warren, M. M. Frank, and P. A. Rice. 1985. Mechanism of action of blocking immunoglobulin G for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Invest* **76**:1765-1772.

137. Jones, B. D., N. Ghori, and S. Falkow. 1994. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**:15-23.
138. Jones, B. D., C. A. Lee, and S. Falkow. 1992. Invasion by *Salmonella* typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* **60**:2475-2480.
139. Jorge, E. G. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* **20**:263-271.
140. Kaiser, M. G., and S. J. Lamont. 2001. Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure. *Poult Sci* **80**:1105-1108.
141. Kawasaki, S., P. M. Fratamico, N. Horikoshi, Y. Okada, K. Takeshita, T. Sameshima, and S. Kawamoto. 2009. Evaluation of a Multiplex PCR System for Simultaneous Detection of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing. *Foodborne Pathog Dis* **6**:81-89.
142. Keller, L. H., C. E. Benson, K. Krotec, and R. J. Eckroade. 1995. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect Immun* **63**:2443-2449.
143. Khan, M. I., Fadl, A. A. and K. S. Venkitanarayanan. 2003. Reducing colonization of *Salmonella* Enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins. *J Appl Microbiol* **95**:142-145.

144. Khoramian-Falsafi, T., S. Harayama, K. Kutsukake, and J. C. Pechère. 1990. Effect of motility and chemotaxis on the invasion of *Salmonella* Typhimurium into HeLa cells. *Microb Pathog* **9**:47-53.
145. Kim, B., T. Bowersock, P. Griebel, A. Kidane, L. A. Babiuk, M. Sanchez, S. Attah-Poku, R. S. Kaushik, and G. K. Mutwiri. 2002. Mucosal immune responses following oral immunization with rotavirus antigens encapsulated in alginate microspheres. *J Control Release* **85**:191-202.
146. Kincade, P. W., and M. D. Cooper. 1971. Development and Distribution of Immunoglobulin-Containing Cells in the Chicken: An Immunofluorescent Analysis Using Purified Antibodies to {micro}, {gamma} and Light Chains. *J Immunol* **106**:371-382.
147. Kinde, H., D. H. Read, R. P. Chin, A. A. Bickford, R. L. Walker, A. Ardans, R. E. Breitmeyer, D. Willoughby, H. E. Little, D. Kerr, and I. A. Gardner. 1996. *Salmonella* Enteritidis, Phage Type 4 Infection in a Commercial Layer Flock in Southern California: Bacteriologic and Epidemiologic Findings. *Avian Dis* **40**:665-671.
148. Kinde, H., H. L. Shivaprasad, B. M. Daft, D. H. Read, A. Ardans, R. Breitmeyer, G. Rajashekara, K. V. Nagaraja, and I. A. Gardner. 2000. Pathologic and Bacteriologic Findings in 27-Week-Old Commercial Laying Hens Experimentally Infected with *Salmonella* Enteritidis, Phage Type 4. *Avian Dis* **44**:239-248.
149. Kogut, M., K. Genovese, and V. Lowry. 2001. Differential Activation of Signal Transduction Pathways Mediating Phagocytosis, Oxidative Burst, and

- Degranulation by Chicken Heterophils in Response to Stimulation with Opsonized *Salmonella* Enteritidis. *Inflammation* **25**:7-15.
150. Kogut, M. H., L. Rothwell, and P. Kaiser. 2003. Differential Regulation of Cytokine Gene Expression by Avian Heterophils During Receptor-Mediated Phagocytosis of Opsonized and Nonopsonized *Salmonella* Enteritidis. *J Interferon Cytokine Res* **23**:319-327.
  151. Kogut, M. H., Tellez G., Hargis B.M., Corrier D.E., DeLoach J.R. 1993. The effect of 5-fluorouracil treatment of chicks: a cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leukocytes and natural host defenses. *Poult Sci* **72**:1873-1880.
  152. Kogut, M. H., Tellez, G. I., McGruder, E. D., Hargis, B. M., Williams, J. D., Corrier, D. E. and DeLoach, J. R. 1994. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella* Enteritidis infections. *Microb Pathogen* **16**:141-151.
  153. Kramer, J., A. H. Visscher, J. A. Wagenaar, A. G. Boonstra-Blom, and S. H. M. Jeurissen. 2001. Characterization of the innate and adaptive immunity to *Salmonella* Enteritidis PT1 infection in four broiler lines. *Vet Immunol Immunopathol* **79**:219-233.
  154. Le Minor, L., and Popoff, M.Y. 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bact* **37**:465-468.
  155. Lee, E. N., H. H. Sunwoo, K. Menninen, and J. S. Sim. 2002. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. *Poult Sci* **81**:632-641.

156. Lee, G. M., G. D. F. Jackson, and G. N. Cooper. 1983. Infection and Immune Responses in Chickens Exposed to *Salmonella* Typhimurium. *Avian Dis* **27**:577-583.
157. Lee, K., T. Iwata, M. Shimizu, T. Taniguchi, A. Nakadai, Y. Hirota, and H. Hayashidani. 2009. A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. *J Appl Microbiol* **107**:805-811.
158. Lillehoj, H., and Okamura, M. 2003. Host Immunity and Vaccine Development to *Coccidia* and *Salmonella* Infections in Chickens. *J Poult Sci* **40**:151-193.
159. Lillehoj, H. S., and T. J.M. 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol Rev* **9**:349-360.
160. Liu, W., Y. Yang, N. Chung, and J. Kwang. 2001. Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens against *Salmonella* Enteritidis after a Single Dose of Killed Bacterium-Loaded Microspheres. *Avian Dis* **45**:797-806.
161. Lo, W.F., H. Ong, E. S. Metcalf, and M. J. Soloski. 1999. T Cell Responses to Gram-Negative Intracellular Bacterial Pathogens: A Role for CD8+ T Cells in Immunity to *Salmonella* Infection and the Involvement of MHC Class Ib Molecules. *J Immunol* **162**:5398-5406.
162. Lopes, V. C., B. T. Velayudhan, D. A. Halvorson, and K. V. Nagaraja. 2006. Preliminary Evaluation of the Use of the *sefA* Fimbrial Gene to Elicit Immune Response against *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Chickens. *Avian Dis* **50**:185-190.

163. MAPAQ. 2005. Santé publique: Éclosion de *Salmonella* Enteritidis (SE) chez les poules pondeuses à l'automne. La Revue d'épidémiologie animale **9**:51. Retrieved September 9, 2009 from <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/NR/rdonlyres/EB1A67D6-57C8-450A-A74F-3B9F27709406/0/BilanRAIZO2004.pdf>
164. MAPAQ, 2005. Bilan 2004: Santé publique. Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire du MAPAQ **9**: 1-60. Retrieved September 9, 2009 from <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/NR/rdonlyres/EB1A67D6-57C8-450A-A74F-3B9F27709406/0/BilanRAIZO2004.pdf>
165. MAPAQ, 2006. Bilan 2005: Santé publique. In: Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire du MAPAQ. Retrieved September 9, 2009 from <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/NR/rdonlyres/28E7D9C6-51AE-4DCA-9702-2529E698AF67/0/RAIZO2005.pdf>
166. Marcus, R., J. K. Varma, C. Medus, E. J. Boothe, B. J. Anderson, T. Crume, K. E. Fullerton, M. R. Moore, P. L. White, E. Lyszkowicz, A. C. Voetsch, and F. J. Angulo. 2007. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Re-assessment of risk factors for sporadic *Salmonella* serotype Enteritidis infections: a case-control study in five FoodNet Sites, 2002-2003. *Epidemiol Infect* **35**:84 - 92.
167. Marcus, S. L., J. H. Brumell, C. G. Pfeifer, and B. B. Finlay. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb Infect* **2**:145-156.
168. Mastroeni, P., J. A. Chabalgoity, S. J. Dunstan, D. J. Maskell, and G. Dougan. 2001. *Salmonella*: Immune Responses and Vaccines. *Vet J* **161**:132-164.

169. Mastroeni, P., and N. Menager. 2003. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J Med Microbiol* **52**:453-459.
170. Mastroeni, P., C. Simmons, R. Fowler, C. E. Hormaeche, and G. Dougan. 2000. Igh-6<sup>-/-</sup> (B-Cell-Deficient) Mice Fail To Mount Solid Acquired Resistance to Oral Challenge with Virulent *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Show Impaired Th1 T-Cell Responses to *Salmonella* Antigens. *Infect Immun* **68**:46-53.
171. Mastroeni, P., A. Vazquez-Torres, F. C. Fang, Y. Xu, S. Khan, C. E. Hormaeche, and G. Dougan. 2000. Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental *Salmonellosis*. II. Effects on Microbial Proliferation and Host Survival In Vivo. *J Exp Med* **192**:237-248.
172. Mastroeni, P., Villarreal, B., Demarco de Hormaeche, R., Hormaeche C.E. 1992. Serum TNF alpha inhibitor in mouse typhoid. *Microb Pathog* **12**:343-349.
173. Mastroeni, P., Villarreal, R. B. and C. E. Hormaeche. 1993. Adoptive transfert of immunity to oral challenge with virulent *Salmonellae* in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect Immun* **61**:3981-3993.
174. McDonough, P. L., R. H. Jacobson, J. F. Timoney, A. Mutalib, D. C. Kradel, Y.-f. Chang, S. J. Shin, D. H. Lein, S. Trock, and K. Wheeler. 1998. Interpretations of Antibody Responses to *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis gm Flagellin in Poultry Flocks Are Enhanced by a Kinetics-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**:550-555.



175. McGhie, E. J., L. C. Brawn, P. J. Hume, D. Humphreys, and V. Koronakis. 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* **12**:117-124.
176. McIlroy, S. G., R. M. McCracken, S. D. Neill, and J. J. O'Brien. 1989. Control, prevention and eradication of *Salmonella* Enteritidis infection in broiler and broiler breeder flocks. *Vet Rec* **125**:545-548.
177. McSorley, S. J., B. T. Cookson, and M. K. Jenkins. 2000. Characterization of CD4+ T Cell Responses During Natural Infection with *Salmonella* Typhimurium. *J Immunol* **164**:986-993.
178. McSorley, S. J., and M. K. Jenkins. 2000. Antibody Is Required for Protection against Virulent but Not Attenuated *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium. *Infect Immun* **68**:3344-3348.
179. Meenakshi, M., C. S. Bakshi, G. Butchaiah, M. P. Bansal, M. Z. Siddiqui, and V. P. Singh. 1999. Adjuvanted Outer Membrane Protein Vaccine Protects Poultry against Infection with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Res Commun* **23**:81-90.
180. Methner, U., S. Al-Shabibi, and H. Meyer. 1995. Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with *Salmonella* Enteritidis strains. *J Vet Med* **42**:459-469.
181. Middleton, D. 2009. *Salmonella Enteritidis in Humans in Ontario* ( Ontario Multi-Agency *Salmonella Enteritidis Working Group*). Salmonellosis, Antimicrobial Use, and Antimicrobial Resistance Symposium. Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario .

182. Mintz, E. D., M. L. Cartter, J. L. Hadler, J. T. Wassell, J. A. Zingeser, and R. V. Tauxe. 1994. Dose-Response Effects in an Outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiol and Infect* **112**:13-23.
183. Mittrucker, H. W., and S. H. Kaufmann. 2000. Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. *J Leukoc Biol* **67**:457-463.
184. Miyamoto, T., E. Baba, T. Tanaka, K. Sasai, T. Fukata, and A. Arakawa. 1997. *Salmonella* Enteritidis Contamination of Eggs from Hens Inoculated by Vaginal, Cloacal, and Intravenous Routes. *Avian Dis* **41**:296-303.
185. Miyamoto, T., T. Horie, T. Fujiwara, T. Fukata, K. Sasai, and E. Baba. 2000. *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis in vitro. *Poult Sci* **79**:7-11.
186. Miyamoto, T., D. Kitaoka, G. S. Withanage, T. Fukata, K. Sasai, and E. Baba. 1999. Evaluation of the efficacy of *Salmonella* Enteritidis oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. *Avian Dis* **43**:497-505.
187. Morris, G. 1990. *Salmonella* Enteritidis and eggs: Assessment of risk. *Dairy, Food Environ Sanitation* **10**:279-281.
188. Muir, W. I., W. L. Bryden, and A. J. Husband. 1998. Evaluation of the efficacy of intraperitoneal immunization in reducing *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. *Poult Sci* **77**:1874-1883.
189. Mukherjee, K., S. A. Siddiqi, S. Hashim, M. Raje, S. K. Basu, and A. Mukhopadhyay. 2000. Live *Salmonella* Recruits N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Protein on Phagosomal Membrane and Promotes Fusion with Early Endosome. *J Cell Biol* **148**:741-754.

190. Nagaraja, K. V., and G. Rajashekara. 1999. Vaccination against *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infection: Dilemma and Realities. p 397-404. *In: Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals: Epidemiology, Pathogenesis, and Control. Press AMES, Iowa State University, Iowa.
191. Nakamura, M., N. Nagamine, T. Takahashi, S. Suzuki, M. Kijima, Y. Tamura, and S. Sato. 1994. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis and effect of stress on shedding in laying hens. *Avian Dis* **38**:282-288.
192. Nakamura, M., N. Nagamine, T. Takahashi, M. Norimatsu, S. Suzuki, and S. Sato. 1995. Intratracheal Infection of Chickens with *Salmonella* Enteritidis and the Effect of Feed and Water Deprivation. *Avian Dis* **39**:853-858.
193. Nakamura, M., N. Nagamine, T. Takahashi, S. Suzuki, and S. Sato. 1994. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis* **38**:717-724.
194. Nakamura, M., Nagamine, N., Suzuki, S., Orimatsu, M., Oishi, K., Kijima, M., Tamura, Y., and Shizuo Sato. 1993. Long-Term Shedding of *Salmonella* Enteritidis in Chickens which Received a Contact Exposure within 24 Hrs of Hatching. *J Vet Med Sci* **55**:649-653.
195. Nakamura, M., T. Nagata, S. Okamura, K. Takehara, and P. S. Holt. 2004. The effect of killed *Salmonella* Enteritidis vaccine prior to induced molting on the shedding of *S. Enteritidis* in laying hens. *Avian Dis* **48**:183-188.
196. Nancy, A. B., Craig, J.L., Magdalene, Y. H. and So Fred Heffron. 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella* Typhimurium are avirulent

- and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol Microbiol* **7**:933-936.
197. Nassar, T. J., Al-Nakhli, H.M. and Al-Ogaily ZH. 1994. Use of live and inactivated *Salmonella* Enteritidis phage type 4 vaccines to immunise laying hens against experimental infection. *Rev Sci Tech* **13**:855-867.
198. Nicolas, P., and A. Mor. 1995. Peptides as Weapons Against Microorganisms in the Chemical Defense System of Vertebrates. *Annu Rev Microbiol* **49**:277-304.
199. O'Regan, E., E. McCabe, C. Burgess, S. McGuinness, T. Barry, G. Duffy, P. Whyte, and S. Fanning. 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol* **8**:156.
200. Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon, and E. A. Groisman. 1996. *Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:7800-7804.
201. Ochoa-Repáraz J., S. B., Álvarezc M., Jesús Renedod M., Irached J. M., and Gamazo C. 2004. Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella* Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet Res* **35**:291-298.
202. Okamura, M., Y. Kamijima, T. Miyamoto, H. Tani, K. Sasai, and E. Baba. 2001. Differences among Six *Salmonella* Serovars in Abilities to Colonize Reproductive Organs and to Contaminate Eggs in Laying Hens. *Avian Dis* **45**:61-69.

203. Okamura, M., H. S. Lillehoj, R. B. Raybourne, U. Babu, and R. Heckert. 2003. Antigen-specific lymphocyte proliferation and interleukin production in chickens immunized with killed *Salmonella* Enteritidis vaccine or experimental subunit vaccines. *Avian Dis* **47**:1331-1338.
204. Okamura, M., H. S. Lillehoj, R. B. Raybourne, U. S. Babu, and R. A. Heckert. 2004. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella* Enteritidis vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-[gamma] production. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**:255-272.
205. Okamura, M., H. Tachizaki, T. Kubo, S. Kikuchi, A. Suzuki, K. Takehara, and M. Nakamura. 2007. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. *Vaccine* **25**:4837-4844.
206. Olsen, A. R. a. H., T.S. 2000. Isolation of *Salmonella* spp. from the Housefly, *Musca domestica* L., and the Dump Fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (*Diptera: Muscidae*), at Caged-Layer Houses. *J Food Prot* **63**:958.
207. Ordonez, G., N. Llopis, and P. Penalver. 2008. Efficacy of Eugenol Against a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Experimental Infection in Commercial Layers in Production. *J Appl Poult Res* **17**:376-382.
208. Otomo, Y., K. Abe, K. Odagiri, A. Shiroto, K. Takatori, and Y. Hara-Kudo. 2009. Detection of *Salmonella* in Spent Hens and Eggs Associated with Foodborne Infections. *Avian Dis* **51**:578-583.

209. Parmentier, H. K., M. B. Kreukniet, B. Goeree, T. Fred Davison, S. H. M. Jeurissen, E. G. M. Harmsen, and M. G. B. Nieuwland. 1995. Differences in distribution of lymphocyte antigens in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Vet Immunol Immunopathol* **48**:155-168.
210. Paul, S. 2005. *Bactériologie - Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies (Cours)*, 6<sup>e</sup> édition ed. Dunod, Paris.
211. Public Health Agency of Canada. 2007. *Annual Summary 2006*. Laboratory Surveillance Data For Enteric Pathogens In Canada. Retrieved Septembre 9, 2009 from <http://www.nml-inm.gc.ca/NESP-PNSME/assets/pdf/2006AnnualReport.pdf>.
212. Public Health Agency of Canada. 2008. *Rapport Sommaire 2007*. C-EnterNet. Retrieved Septembre 9, 2009 from <http://www.phac-aspc.gc.ca/c-enternet/pdf/sr2008-fra.pdf>.
213. Piao, Z., Y. Toyota-Hanatani, H. Ohta, K. Sasai, H. Tani, and E. Baba. 2007. Effects of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis vaccination in layer hens subjected to *S. Enteritidis* challenge and various feed withdrawal regimens. *Vet Microbiol* **125**:111-119.
214. PICRA. 2006. Rapport annuel du Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens. Retrieved Septembre 9, 2009 from <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/pdf/cipars-picra-2006-fra.pdf>.
215. Popoff, M. Y., and L. Le Minor Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. *In*: 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris. 1997.

216. Poppe, C. 2000. *Salmonella* infections in the domestic fowl, p. 107-132. In: Wray, C. and A. Wray (ed), *Salmonella* in Domestic animals. CABI Publishing, New York.
217. Poppe, C., McFadden, K.A., Brouwer, A.M. and W. Demczuk. 1993. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains. Can J Vet Res. **57**:176-184.
218. Poppe C., C. L. a. M. A. 1998. *Salmonella* Contamination of Hatching and Table Eggs: A Comparison. Can J Vet Res **62**:191-198.
219. Poppe, C. J. R., Forsberg CM, and R J Irwin. 1992. *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. Can J Vet Res **56**:226-232.
220. Powell, P. C. 1987. Immune mechanisms in infections of poultry. Vet Immunol Immunopathol **15**:87-113.
221. Rajashekara, G., S. Munir, M. F. Alexeyev, D. A. Halvorson, C. L. Wells, and K. V. Nagaraja. 2000. Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection of chickens. Appl Environ Microbiol **66**:1759 - 1763.
222. Rampling, A., Upson, R., Ward, L.R., Anderson, J.R., Peters, E. and Rowe, B. 1989. *Salmonella* Enteritidis phage type 4infections of broiler chickens: A hazard to public health. The Lancet **334**:436-438.
223. Raupach, B., and S. H. E. Kaufmann. 2001. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? Microb and Infect **3**:1261-1269.
224. Raupach, B., and S. H. E. Kaufmann. 2001. Immune responses to intracellular bacteria. Curr Opin in Immunol **13**:417-428.

225. Reiner, N. E. 1994. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today* **15**:374-381.
226. Riber, U., and P. Lind. 1999. Interaction between *Salmonella* Typhimurium and phagocytic cells in pigs: Phagocytosis, oxidative burst and killing in polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **67**:259-270.
227. Riber, U., Nielsen, B., Hoorfar, J., Lind, P. 1995. Induction of oxidative burst response by porcine blood polymorphonuclear leucocytes and monocytes with *Salmonella* Typhimurium. p 276. 1995. *In: Fourth Int. Vet. Immunol. Symp.* University of California, Davis.
228. Rigby, C. E., and J. R. Pettit. 1979. Some Factors Affecting *Salmonella* Typhimurium Infection and Shedding in Chickens Raised on Litter. *Avian Dis* **23**:442-455.
229. Robert, H. D., and B. Mark. 2003. Persistence of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ Microbiol* **5**:79-84.
230. Rodrigue, D. C., R. V. Tauxe, and B. Rowe. 1990. International Increase in *Salmonella* Enteritidis: A New Pandemic? *Epidemiol and Infect* **105**:21-27.
231. Rodriguez, A., P. Pangloli, H. A. Richards, J. R. Mount, and F. A. Draughon. 2006. Prevalence of *Salmonella* in Diverse Environmental Farm Samples. *J Food Protect* **69**:2576-2580.
232. Roitt, I., and Rabson, A. . 2002. *Immunologie médicale - L'essentiel*, Maloine ed., Paris.



233. Rose, M. E., and E. Orlans. 1981. Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Dev Comp Immunol* **5**:15-20.
234. Rycroft, A. N. 2000. Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella*, p. 19-33. *In*: Wray, C. and A. Wray (ed), *Salmonella* in Domestic animals. CABI Publishing, New York.
235. Salyers, A. A., and Dixie D. Whitt. 1994. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press, Washington D.C.
236. Sasai, K., Yoshimura, K., Lillehoj, H.S., Withanage, G.S.K., Fukata, T., Baba, E. and Arakawa A. 1997. Analysis of splenic and thymic lymphocyte subpopulations in chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* **59**:359-367.
237. Shiloh, M. U., and C. F. Nathan. 2000. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of *Salmonella* and *Mycobacteria*. *Current Opinion in Microbiol* **3**:35-42.
238. Shivaprasad, H. L., J. F. Timoney, S. Morales, B. Lucio, and R. C. Baker. 1990. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis Infection in Laying Chickens. I. Studies on Egg Transmission, Clinical Signs, Fecal Shedding, and Serologic Responses. *Avian Dis* **34**:548-557.
239. Sinha, K., P. Mastroeni, J. Harrison, R. D. de Hormaeche, and C. E. Hormaeche. 1997. *Salmonella* Typhimurium aroA, htrA, and aroD htrA mutants cause progressive infections in athymic (nu/nu) BALB/c mice. *Infect Immun* **65**:1566-1569.

240. Skov, M. N., B. Carstensen, N. Tornøe, and M. Madsen. 1999. Evaluation of sampling methods for the detection of *Salmonella* in broiler flocks. *J Appl Microbiol* **86**:695-700.
241. Spector, M. 1998. The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. *Adv Microb Physiol* **40**:233-279.
242. Springer, S. a. S., H.J. 1996. Can a live *Salmonella* Typhimurium vaccine be used against *Salmonella* Enteritidis in chickens? *World Poult* **5**:39.
243. Stabler, J. G., T. W. McCormick, K. C. Powell, and M. H. Kogut. 1994. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella* Enteritidis. *Vet Microbiol* **38**:293-305.
244. Storz, G., L. A. Tartaglia, S. B. Farr, and B. N. Ames. 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genetics* **6**:363-368.
245. Strindelius, L., L. D. Wikingsson, and I. Sjöholm. 2002. Extracellular Antigens from *Salmonella* Enteritidis Induce Effective Immune Response in Mice after Oral Vaccination. *Infect Immun* **70**:1434-1442.
246. Swaggerty, C. L., I. Y. Pevzner, V. K. Lowry, M. B. Farnell, and M. H. Kogut. 2003. Functional comparison of heterophils isolated from commercial broiler chickens. *Avian Pathol* **32**:95 - 102.
247. Sztein, M. B., M. K. Tanner, Y. Polotsky, J. M. Orenstein, and M. M. Levine. 1995. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. *J Immunol* **155**:3987-3993.
248. Terri, M., A. A. Godwin, B. Jacqueline, B. Samera, B. Tesfaye, O. E. Francis, and U. I. Joseph. 2002. Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology* **105**:213-221.

249. Thiagarajan, D., Saeed A.M. and Asem E.K. 1994. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* Enteritidis in laying hens. *Poult Sci* **73**:89-98.
250. Thirumalapura, N. R., R. J. Morton, A. Ramachandran, and J. R. Malayer. 2005. Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies. *J Immunol Methods* **298**:73-81.
251. Thorns, C. J., C. Turcotte, C. G. Gemmell, and M. J. Woodward. 1996. Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis. *Microb Pathog* **20**:235-246.
252. Timms, L. M., R. N. Marshall, and M. F. Breslin. 1990. Laboratory assessment of protection given by an experimental *Salmonella* Enteritidis PT4 inactivated, adjuvant vaccine. *Vet Rec* **127**:611-614.
253. Timms, L. M., R. N. Marshall, and M. F. Breslin. 1994. Laboratory and field trial assessment of protection given by a *Salmonella* Enteritidis PT4 inactivated, adjuvant vaccine. *Br Vet J* **150**:93-102.
254. Tite, J. P., G. Dougan, and S. N. Chatfield. 1991. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J Immunol* **147**:3161-3164.
255. Tizard, I. 2002. The avian antibody response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **11**:2-14.
256. Tizard, I. R. 2004. *Veterinary Immunology, An Introduction*. p 145-154. 7th ed. Saunders, Philadelphia.
257. Tizard, I. R. 2004. *Veterinary Immunology, An Introduction*. p 92-104. 7th ed. Saunders, Philadelphia.

258. Toyota-Hanatani, Y., M. Inoue, T. Ekawa, H. Ohta, S. Igimi, and E. Baba. 2008. Importance of the major Fli C antigenic site of *Salmonella* Enteritidis as a subunit vaccine antigen. *Vaccine* **26**:4135-4137.
259. Uchiya, K.-i., M. A. Barbieri, K. Funato, A. H. Shah, P. D. Stahl, and E. A. Groisman. 1999. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* **18**:3924-3933.
260. Valtonen, V. V. 1970. Mouse Virulence of Salmonella Strains: The Effect of Different Smooth-type O Side-chains. *J Gen Microbiol* **64**:255-268.
261. Van Immerseel, F., Cauwerts, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. 2002. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *World Poult Sci J* **58**:431-443.
262. Van Immerseel, F., J. De Buck, I. De Smet, J. Mast, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2002. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. *Dev Comp Immunol* **26**:355-364.
263. Van Immerseel, F., J. De Buck, I. De Smet, J. Mast, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2002. The effect of vaccination with a *Salmonella* Enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. *Vaccine* **20**:3034-3041.
264. Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, L. Bohez, F. Boyen, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004. Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. *Poult Sci* **83**:1911-1916.

265. Van immerseel F, M. U., Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, and Barrow P.A. 2005. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect* **133**:959-978.
266. Van Zijderveld, F. G., A. M. Van Zijderveld-van Bommel, and J. Anakotta. 1992. Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella* Enteritidis infections in experimentally infected chickens. *J Clin Microbiol* **30**:2560-2566.
267. Waaij, D. V. 1992. History of Recognition and Measurement of Colonization Resistance of the Digestive Tract as an Introduction to Selective Gastrointestinal Decontamination. *Epidemiol Infect* **109**:315-326.
268. Wang, S. J., and D. B. Yeh. 2002. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods and faecal samples. *Lett Appl Microbiol* **34**:422-427.
269. Ward, L. R., J. D. H. d. Sa, and B. Rowe. 1987. A Phage-Typing Scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiol Infect* **99**:291-294.
270. Wells, L. L., V. K. Lowry, J. R. DeLoach, and M. H. Kogut. 1998. Age-dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil. *Dev Comp Immunol* **22**:103-109.
271. Withanage, G. S. K., K. Sasai, T. Fukata, T. Miyamoto, and E. Baba. 1999. Secretion of *Salmonella*-specific antibodies in the oviducts of hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* **67**:185-193.

272. Withanage, G. S. K., K. Sasai, T. Fukata, T. Miyamoto, E. Baba, and H. S. Lillehoj. 1998. T lymphocytes, B lymphocytes, and macrophages in the ovaries and oviducts of laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* **66**:173-184.
273. Withanage, G. S. K., K. Sasai, T. Fukata, T. Miyamoto, H. S. Lillehoj, and E. Baba. 2003. Increased lymphocyte subpopulations and macrophages in the ovaries and oviducts of laying hens infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Avian Pathol* **32**:583 - 590.
274. Withanage, G. S. K., P. Wigley, P. Kaiser, P. Mastroeni, H. Brooks, C. Powers, R. Beal, P. Barrow, D. Maskell, and I. McConnell. 2005. Cytokine and Chemokine Responses Associated with Clearance of a Primary *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in the Chicken and in Protective Immunity to Rechallenge. *Infect Immun* **73**:5173-5182.
275. Wong, K.-K., M. McClelland, L. C. Stillwell, E. C. Sisk, S. J. Thurston, and J. D. Saffer. 1998. Identification and Sequence Analysis of a 27-Kilobase Chromosomal Fragment Containing a *Salmonella* Pathogenicity Island Located at 92 Minutes on the Chromosome Map of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. *Infect Immun* **66**:3365-3371.
276. Woodward, M. J., G. Gettinby, M. F. Breslin, J. D. Corkish, and S. Houghton. 2002. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol* **31**:383 - 392.
277. Yamane, Y., J. D. Leonard, R. Kobatake, N. Awamura, Y. Toyota, H. Ohta, K. Otsuki, and T. Inoue. 2000. A case study on *Salmonella* Enteritidis (SE)

- origin at three egg-laying farms and its control with an *S. Enteritidis* bacterin. *Avian Dis* **44**:519-526.
278. Yap, L. F., L. Sharon, W. Liu, H. Loh, T. P. Teo, and J. Kwang. 2001. Detection and Screening of *Salmonella* Enteritidis-Infected Chickens with Recombinant Flagellin. *Avian Dis* **45**:410-415.
279. Yoshimura, Y. 2004. Significance of local immunity in hen reproductive organs. *Ani Sci J* **75**:183-191.
280. Zhang-Barber, L., A. K. Turner, and P. A. Barrow. 1999. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine* **17**:2538-2545.

## ANNEXE

Article 2. Effects of *Salmonella* Enteritidis bacterins vaccination on layers' protection and immune response

Table I. Clinical signs and lesions observed in SE challenged hens

	Challenge 1 (55 weeks)				Challenge 2 (65 weeks)			
	Days post challenge			Total of hens (%)	Days post challenge			Total of hens (%)
	1	7	14		1	7	14	
<b>Clinical signs</b>								
Mortality								
Diarrhea		7	8	15(16,6) <sup>a</sup>		12	18	30(32) <sup>b</sup>
<b>Lesions</b>								
Splenomegaly		1	2	3(3,3)	1	2	1	4(4,4)
Petechias on liver	4	7		11(12,2)	3	6	2	11(12,2)
Paint brush haemorrhagic on liver				0(0) <sup>c</sup>	1	3	2	6(6,6) <sup>d</sup>
Hepatomegaly	2			2(2,2)				0(0)
Necrotic hepatitis		3	2	5(5,5)	1	7	2	10(11,1)
Diphtheritic typhlitis	1	1		2(2,2)	1	4	1	6(6,6)
Diphtheritic enteritis	1	7	1	9(10)	1	1	1	3(3,3)
Congested oviduct						1		1(1,1)
Peritonitis						1	1	2(2,2)

n= 90 hens inoculated for each challenge. Total of hens (%) = (hens presented lesions during days post challenge/n). <sup>a,b,c,d</sup>: p < 0.03



Table II. Phagocytosis level of mononuclear cells before challenge

Weeks	2 immunizations (2I)				1 immunization (1I)				Control	
	MBL SE4C		Layermune		MBL SE4C		Layermune		H	M
	H	M	H	M	H	M	H	M		
54	0 <sup>a</sup>	1.18±2.6	0.6±0.8	19.3±43	0.01±0.02 <sup>a</sup>	8.34±16	0	7.5±16.7	2.71±4.5	1.6±3.6
64	8.2±8.1 <sup>b</sup>	34.4 ± 21	5.8±5.8	23.2±11	18.0±13.6 <sup>b</sup>	24.4±25	7.2±6.5	16.7±12	0.6±0.6 <sup>a</sup>	19.5±10

H : Heterophil; M : monocyte ; The data of phagocytosis was presented in percentage of each cell type ± standard deviation (n = 5 birds/group); a,b:  $P < 0.0003$ .

Table III. Intracellular survival of SE in leucocytes of laying hens one week before challenge 1 (54 weeks of age) and challenge 2 (64 week of age), expressed in number of bacteria ( $\times 10^3$  CFU/ml)

Weeks of age	2 immunizations (2I)		1 immunization (1I)		Control
	MBL SE4C	Layermune	MBL SE4C	Layermune	
54	70.6 ± 49.2 <sup>c</sup>	59.4 ± 41.8 <sup>c</sup>	307.80 ± 239.7 <sup>a,α</sup>	181.8 ± 71.72 <sup>a,α</sup>	26.2 ± 21.72 <sup>c,β</sup>
64	326.6 ± 217.7 <sup>d,γ</sup>	296.6 ± 112.8 <sup>d,γ</sup>	18.20 ± 14.02 <sup>b,δ</sup>	7.6 ± 4.16 <sup>b,δ</sup>	234.8 ± 91.27 <sup>d,γ</sup>

Data are presented as mean ± SD (n=5 birds/group). <sup>a,b,c,d,α,β,δ,γ</sup> :  $P \leq 0.002$

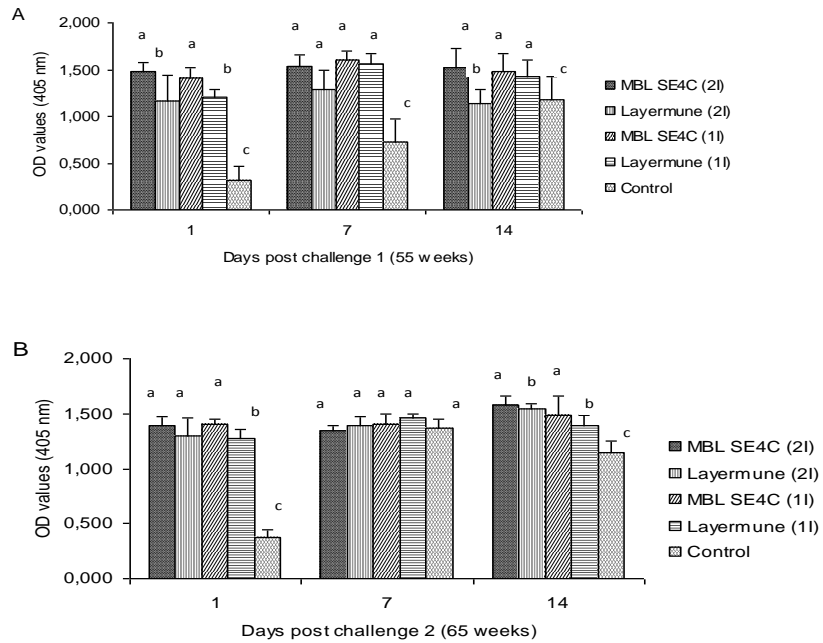


Figure 1. Detection of IgG in sera of laying hens post challenge 1 (A) and 2 (B)

Antibodies (IgG) analysed by an in - house SE whole cell antigen ELISA. Vaccination protocol was made either 1 immunization (1I) or 2 immunizations (2I). Data represent mean of OD values (at 405 nm ) (5 birds/group)  $\pm$  standard deviation. a,b,c =  $P < 0.002$ .