

Abstract: Evaluating the nonspecific protection of an immunostimulant based on heat-inactivated *Mycobacterium bovis* against *Salmonella Choleraesuis* infection in pigs

Trained immunity is the capacity of innate immune cells to produce an improved response against a secondary infection after a previous unrelated infection or vaccination. Salmonellosis is a zoonosis, representing a threat to public health, and it also takes a toll on the pig farming industry. In general, the vaccination against salmonellosis is still facing problems regarding the control of distinct serovars. Therefore, we hypothesized that an immunostimulant based on heat inactivated *Mycobacterium bovis* (HIMB) could have an immune training effect in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (*S. Choleraesuis*), and decided to explore the amplitude of this non-specific immunological training. For this purpose, twenty-four 10 days old female piglets were randomly separated in three groups: immunized group (n=10) received orally two doses of HIMB prior to the intratracheal *S. Choleraesuis*-challenge, positive control group (n=9) that was only challenged with *S. Choleraesuis*, and negative control group (n=5) that was neither immunostimulated nor infected. All individuals were necropsied 21 days post-challenge. *Ante-mortem* parameters analysed were: clinical signs, body temperature, weight and faecal shedding; while *post-mortem* parameters analysed were: bacterial tissue colonization, pulmonary lesions and cytokines expression. Results showed that immune response training with HIMB was effective in reducing clinical signs and limiting temperature rise and weight loss. Moreover, the HIMB group displayed significantly lower pulmonary pathology scores, improving animal health status. However, *S. Choleraesuis* excretion and tissue colonization were not reduced by HIMB immunostimulant. The principal immunological mechanism involved in the decrease of lung lesions associated to HIMB immunostimulation was the overexpression of CCL28, signalling the importance of innate immunity in the non-specific protection against *S. Choleraesuis*. This proof-of-concept study suggests beneficial clinical, pathological and immunological effects against heterologous bacterial pathogens within the concept of trained immunity, opening avenues for further research.

Resumen: Protección inespecífica de *Mycobacterium bovis* inactivado por calor frente a la infección por *Salmonella Choleraesuis* en cerdos

La inmunidad entrenada es la capacidad que tienen las células de la inmunidad innata de producir una respuesta inmunitaria mejorada frente a una infección secundaria después de la infección previa por un agente patógeno no relacionado. Las micobacterias son agentes estimuladores de la inmunidad entrenada, originando una protección cruzada inespecífica frente a un gran número de patógenos. Por otro lado, la salmonelosis representa un problema de Salud Pública que ocasiona importantes pérdidas económicas en la industria porcina, presentando la vacunación frente a este patógenos algunas deficiencias para el control de los distintos serovares. Nuestra hipótesis es que un inmunoestimulante basado en *Mycobacterium bovis* inactivado por calor (HIMB) puede tener un efecto protector inespecífico frente a *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (*S. Choleraesuis*), basándonos en el concepto de inmunidad entrenada. Para ello, veinticuatro lechones hembras de 10 días de edad fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos: grupo inmunizado (n=10), recibió por vía oral dos dosis de HIMB antes de ser infectado por vía intratraqueal con *S. Choleraesuis*; grupo control positivo (N=9), infectado con *S. Choleraesuis* y no inmunizado; y grupo control negativo (n=5), no inmunizado ni infectado. Todos los individuos fueron sacrificados a los 21 días post-infección. La inmunoestimulación con HIMB mejoró la ganancia de peso, redujo los síntomas respiratorios y las lesiones pulmonares provocadas por *S. Choleraesuis* en cerdos. Los lechones inmunizados con HIMB presentaron una mayor expresión de CCL28 en pulmón, señalando la importancia de la inmunidad innata en la protección inespecífica frente a *S. Choleraesuis*. Sin embargo, la excreción y la colonización tisular de *S. Choleraesuis* no presentaron diferencias significativas entre los grupos infectados. Este estudio sugiere que la inmunización con HIMB puede dar lugar a efectos benéficos a nivel clínico, patológico e inmunológico frente a patógenos bacterianos en porcino dentro del concepto de inmunidad entrenada, abriendo así la puerta a futuros estudios de investigación para profundizar en esta teoría.