

CONTROLLO DELLE INFEZIONI DA *SALMONELLA* NEL SUINO: STRATEGIE VACCINALI

CONTROLLING SALMONELLA INFECTIONS IN PIGS: VACCINATION PROTOCOLS

RUGGERI J.¹, PESCIAROLI M.^{2,3}, MARTINELLI N.¹, CHIRULLO B.²,
SCAGLIONE F.E.⁴, PREGEL P.⁴, AMMENDOLA S.⁵, LAZZARO M.¹, GIACOMINI E.¹,
OSSIPRANDI MC.⁶, BATTISTONI A.⁵, BOLLO E.⁴, PASQUALI P.², ALBORALI G.L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 25124 Brescia, Italy;

²Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; FAO Reference Center for Veterinary Public Health.

³VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense Madrid. 28040 Madrid. Spain.

⁴Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Torino, 10095 Torino, Italy;

⁵Department of Biology, Università di Roma Tor Vergata, 00133 Rome, Italy;

⁶Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Parma, 43100 Parma, Italy;

Parole chiave: Vaccinazione, *Salmonella*, Suino, Immunogenicità, Sanità Pubblica.

Keywords: Vaccination, *Salmonella*, Pig, Immunogenicity, Public Health.

Riassunto

Salmonella sp. è uno dei principali responsabili di tossinfezioni alimentari dovute al consumo di prodotti contaminati di origine animale. Il suino è la principale fonte d'infezione, determinando l'ingresso del patogeno nella fase di macellazione. La situazione italiana è caratterizzata da un'elevata percentuale di allevamenti suini infetti, e la vaccinazione avrebbe un ruolo decisivo nel controllo dell'infezione, ma nessun vaccino è disponibile in commercio per il suino. L'obiettivo del nostro lavoro è quello di descrivere i dati relativi alla valutazione della sicurezza ed efficacia di un vaccino attenuato di *S.Typhimurium*, in condizioni sperimentali, e di un vaccino stabulogeno inattivato di *S.Typhimurium* var. Monofasica, testato in campo. Il ceppo attenuato è sicuro e protettivo, limitando l'eliminazione fecale e la colonizzazione degli organi del ceppo virulento e la sua efficacia è stata testata anche a seguito della somministrazione parenterale e in corso d'infezione eterologa con *S.Choleraesuis*. Il ceppo stabulogeno inattivato è stato somministrato in alcune scrofe in gestazione e/o nei loro suinetti. I buoni risultati ottenuti hanno confermato che la vaccinazione delle scrofe, e il trasferimento degli anticorpi tramite il colostro, è maggiormente protettiva rispetto alla diretta vaccinazione dei suini.

Abstract

First results.

Salmonella sp. is responsible of human infections due to consumption of contaminated pork products. Carrier pigs introduce bacteria in the slaughter process. Italian situation is characterized by a high percentage of infected farms, and vaccination could have a decisive role in controlling infection. Unfortunately, none vaccine, licensed for swine, is available in Italy. The aim of our work is to describe data related to efficacy and safety of an attenuated *S.Typhimurium* vaccine, tested in experimental conditions, and an inactivated autogenous vaccine, tested in field conditions. Attenuated strain is safe and protective, limiting fecal spread and organs colonization by virulent *S.Typhimurium* and it is also effective when

intramuscularly administered or challenge is performed with *S.Choleraesuis*. Inactivated autogenous vaccine was administered in pregnant sows and their piglets of two farms. The results of this trial confirmed that sows vaccination, therefore antibody transfer with colostrum, is more protective than direct piglets vaccination.

1. INTRODUZIONE

Salmonella spp. è un cocco-bacillo, Gram-, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile, non lattosio fermentante, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Ad oggi, sono stati identificati più di 2400 sierotipi che possono essere classificati in: sierotipi ospite-ristretti, in grado di provocare una manifestazione clinica sistemica tifoideale in uno spettro d'ospite limitato (*Salmonella Typhi* nell'uomo); sierotipi ospite-adattati, patogeni per una specie ospite, ma in grado di provocare la malattia anche in altre specie (*Salmonella Choleraesuis* e *Typhisuis* nei maiali); infine i sierotipi più numerosi che possono infettare un ampio spettro di ospiti determinando prevalentemente una forma morbosa localizzata a livello del tratto intestinale (Mastroeni et al., 2001). Alcuni di questi serovar (*S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* var. *Monofasica*, *S. Derby*, *S. Enteritidis*, etc.) (EFSA, 2010; Lettini AA, 2014) sono i principali responsabili d'infezione alimentare nell'uomo, caratterizzata da gastroenterite acuta conseguente al consumo di alimenti di origine animale contaminati e poco cotti (Beloil et al., 2004), e di danni economici per gli allevatori, come conseguenza della riduzione dell'indice di produzione o l'aumento della percentuale di morti (Selke et al., 2007; Hur et al., 2010).

A tutela della salute umana, la Comunità Europea ha emanato il Regolamento Europeo 2160/2003 per individuare e controllare alcune serovar di *Salmonella* lungo tutta la filiera alimentare. Durante l'ultimo decennio, il controllo dell'infezione in allevamento era essenzialmente legato all'uso di antibiotici, determinando però un aumento dei ceppi farmaco-resistenti e una riduzione del numero di principi attivi efficaci verso l'infezione, anche per la terapia nell'uomo (Selke et al., 2007). Al momento, le strategie per ridurre la prevalenza prevedono: misure igienico-sanitarie, metafilassi con mangimi medicati, probiotici ed acidi organici, misure di biosicurezza e controllo degli animali infettanti e programmi di monitoraggio sierologico. La vaccinazione rappresenterebbe la soluzione più efficace per ridurre l'infezione nei paesi che presentano un'alta percentuale d'isolamento di *Salmonella* –spp. al macello (Boyen, 2009; Hur, 2011). La situazione italiana è caratterizzata da un'elevata percentuale d'isolamenti di *S. Typhimurium* (29.3%) e *S. Typhimurium* var. *Monofasica* (28.9%) nell'uomo, principalmente causati dal consumo di prodotti di origine animale contaminati (Lettini AA, 2014). L'elevata percentuale di casi umani, l'incremento dell'antibiotico-resistenza e la mancata disponibilità in commercio di vaccini per il controllo dell'infezione negli allevamenti suini, ha indirizzato il nostro gruppo di lavoro a valutare l'efficacia di un vaccino attenuato in corso d'infezione sperimentale con *S. Typhimurium* (Pesciaroli et al., 2013; Gradassi et al., 2013; Ruggeri et al., 2014) o *S. Choleraesuis* (manoscritto in preparazione) e quella di un vaccino stabulogeno inattivato per il controllo dell'infezione in due allevamenti endemici (manoscritto in preparazione).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Vaccino attenuato *S. Typhimurium* $\Delta ZnuABC$ e vaccino stabulogeno *S. Typhimurium* var. *Monofasica*.

S. Typhimurium $\Delta ZnuABC$ è un ceppo attenuato, ottenuto per inserzione di una cassetta di

resistenza al cloramfenicolo all'interno del gene *ZnuABC*, che codifica per un trasportatore dello zinco. L'attenuazione del ceppo è stata confermata *in vitro* e, successivamente, sono state verificate la sicurezza e l'efficacia del ceppo in un modello murino d'infezione sperimentale. Il vaccino stabulogeno di *S. Typhimurium* variante Monofasica è stato prodotto dopo l'isolamento da campioni provenienti da un allevamento endemico mediante amplificazione e inattivazione in formalina ed è stato somministrato alla dose 2×10^9 UFC.

2.2 *Trial 1. Valutazione della sicurezza e dell'efficacia del vaccino attenuato S. Typhimurium ΔZnuABC a seguito della somministrazione orale.*

La sicurezza e l'efficacia di *S. Typhimurium ΔZnuABC* a seguito di somministrazione orale a due diversi dosaggi sono state testate in 26 suini magroni divisi in quattro gruppi, tre costituiti da 6 suini (A, B e C) e il quarto gruppo (D), che rappresenta il controllo, da 8 suini. I gruppi A e B sono stati vaccinati per via orale con *S. Typhimurium ΔZnuABC* alla dose di 5×10^8 e 5×10^7 UFC, il gruppo C è stato vaccinato con un vaccino inattivato di *S. Typhimurium* alla dose di 10^9 UFC. Il challenge è stato eseguito per via orale con 4×10^8 UFC di *S. Typhimurium* virulenta mediante sonda gastrica, al giorno 35 dopo la vaccinazione. Settimanalmente, sono stati prelevati campioni di sangue, feci e tamponi ambientali per l'analisi sierologica e microbiologica. Al giorno 56, gli animali sono stati abbattuti ed è stata eseguita l'autopsia per l'analisi microbiologica e istopatologica sugli organi.

2.3 *Trial 2. Valutazione della sicurezza e dell'efficacia del vaccino attenuato S. Typhimurium ΔZnuABC a seguito della somministrazione parenterale.*

La sicurezza e l'efficacia di *S. Typhimurium ΔZnuABC* a seguito di somministrazione parenterale sono state valutate in 25 suinetti divisi in 5 gruppi, costituiti da 5 animali. Il gruppo A è stato vaccinato IM con 10^4 UFC di *S. Typhimurium ΔZnuABC*, il gruppo B e C sono stati vaccinati per via orale con *S. Typhimurium ΔZnuABC* alla dose di 5×10^7 e 5×10^5 UFC, il gruppo D non è stato vaccinato. Il challenge è stato eseguito per via orale mediante sonda gastrica, solo nel gruppo E per simulare un modello d'infezione pseudo-naturale (seeder model), con 4×10^8 UFC di *S. Typhimurium* virulenta al giorno 42 dopo la vaccinazione. Gli animali sono rimasti a contatto con gli eliminatori del gruppo E per 2 settimane. Settimanalmente, sono stati prelevati campioni di sangue, feci e tamponi ambientali per l'analisi sierologica e microbiologica. Al giorno 28 dopo il contatto tra gli infetti e gli altri gruppi, gli animali sono stati abbattuti ed è stata eseguita l'autopsia per l'analisi microbiologica e istopatologica sugli organi.

2.4 *Trial 3. Valutazione dell'efficacia del vaccino attenuato S. Typhimurium ΔZnuABC a seguito del challenge con S. Choleraesuis.*

L'efficacia di *S. Typhimurium ΔZnuABC* a seguito d'infezione sperimentale con *S. Choleraesuis* è stata testata in 18 suinetti divisi in 3 gruppi, ognuno costituito da 6 animali. Il gruppo A è stato vaccinato per OS con 5×10^8 UFC di *S. Typhimurium ΔZnuABC*, il gruppo B è stato vaccinato per via IM con *S. Choleraesuis* inattivato, il gruppo C non è stato vaccinato ed il challenge è stato eseguito per via orale mediante sonda gastrica con 5×10^8 UFC di *S. Choleraesuis* virulenta al giorno 35 dopo la vaccinazione. Settimanalmente sono stati prelevati campioni di sangue, feci e tamponi ambientali per l'analisi sierologica e microbiologica. Al giorno 47 è stata eseguita l'autopsia per l'analisi microbiologica degli organi.

2.5 Trial 4. Valutazione dell'efficacia del vaccino stabulogeno in due allevamenti endemici.

L'efficacia del vaccino stabulogeno *S.Typhimurium* var. Monofasica è stata testata in un allevamento endemico e 40 scrofe sono state divise in due gruppi: 20 vaccinate e 20 non vaccinate. Le 40 nidiatae, provenienti da tali scrofe, sono state in seguito divise in gruppi: 20 nidiatae provenienti da scrofe vaccinate sono state divise in due gruppi, un gruppo vaccinato e il secondo gruppo non vaccinato. Similmente, le 20 nidiatae provenienti da scrofe non vaccinate sono state divise in vaccinate e non vaccinate, formandosi 4 gruppi: 1 suinetti vaccinati figli di scrofe vaccinate, 2 suinetti non vaccinati figli di scrofe vaccinate, 3 suinetti vaccinati figli di scrofe non vaccinate e 4 suinetti non vaccinati figli di scrofe non vaccinate. Le scrofe sono state vaccinate 6 e 2 settimane prima del parto e i suinetti sono stati immunizzati a 4 e 8 settimane dalla nascita. Gli animali sono stati seguiti dalla nascita alla macellazione e i prelievi di sangue e feci sono stati eseguiti in ogni fase produttiva (svezzamento, magronaggio, ingrasso e macellazione). La stessa prova è stata condotta in un secondo allevamento con un numero dimezzato di animali.

2.6 Microbiologia e Sierologia

Le analisi microbiologiche, condotte in accordo alla procedura ISO 6579:2002, hanno lo scopo di determinare il titolo nei campioni in esame di *Salmonella* spp. I campioni positivi sono inviati al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, il quale definisce il sierotipo coinvolto mediante tipizzazione sierologica. Inoltre, le colonie sospette sono state sottoposte all'identificazione in PCR per distinguere il ceppo virulento da *S.Typhimurium AznuABC*.

L'analisi sierologica è stata condotta usando un kit commercial per l'esecuzione dell'ELISA indiretta in grado d'identificare anticorpi verso i sierogruppi B, C1 e D di *Salmonella* (Herd-Check Swine *Salmonella* Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories Inc., Switzerland).

3. RISULTATI

3.1 Sicurezza ed efficacia di *S.Typhimurium AznuABC* a seguito della vaccinazione orale

Analizzando la sicurezza del ceppo attenuato nei due gruppi trattati (A e B), abbiamo registrato un leggero rialzo febbrile fino al secondo giorno post-vaccinazione. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata nel ritmo di crescita tra soggetti vaccinati e i controlli e la concentrazione di *S.Typhimurium AznuABC* nelle feci è progressivamente diminuita fino alla negatività, al giorno 28 dopo la vaccinazione. Analizzando l'efficacia del ceppo attenuato, abbiamo riscontrato assenza di segni clinici nel gruppo A e B a seguito dell'infezione con il ceppo virulento, a differenza degli animali del gruppo C e D che hanno invece mostrato prostrazione, anoressia, incremento transitorio della temperatura corporea a 2 giorni dal challenge e riduzione del peso corporeo.

Tutti i gruppi vaccinati producono l'IFN- γ a 7 giorni dal challenge, mentre il gruppo D raggiunge un picco di produzione d'IFN- γ solo dopo tre settimane. La concentrazione fecale di *S.Typhimurium* nei gruppi vaccinati (A e B) subisce una radicale diminuzione dal secondo giorno post-infezione. All'abbattimento, *S. Typhimurium* ha colonizzato gli organi degli animali dei gruppi A e B a concentrazioni inferiori rispetto ai gruppi C e D, inoltre i soggetti vaccinati con il ceppo inattivato hanno una maggiore colonizzazione a carico degli organi linfatici e una minore colonizzazione degli organi intestinali rispetto al gruppo D.

3.2 *Sicurezza ed efficacia di S.Typhimurium AznuABC a seguito della vaccinazione parenterale*

Analizzando la sicurezza del vaccino attenuato nei tre gruppi vaccinati (A, B e C), non abbiamo evidenziato l'eliminazione fecale di *S.Typhimurium AznuABC* nel gruppo immunizzato per via IM.

L'eliminazione fecale del ceppo virulento di *S.Typhimurium* è inferiore nei gruppi A e B (con A>B) rispetto agli altri gruppi; inoltre, dopo la prima settimana, il trend d'eliminazione decresce rapidamente. Le tonsille e i linfonodi sono scarsamente colonizzati negli animali vaccinati (A, B e C) e la differenza nella colonizzazione del colon tra gli animali del gruppo B e D è statisticamente significativa. All'esame autoptico, il gruppo A presenta l'ispessimento della parete dell'ileo rispetto al gruppo B, negli altri gruppi è stata osservata anche reattività dei linfonodi ileocolici. Dal punto di vista istopatologico, il gruppo C e D hanno evidenziato le lesioni più gravi con conglutinazione epiteliale e necrosi.

3.3 *Efficacia di S.Typhimurium AznuABC a seguito del challenge con S.Choleraesuis.*

La vaccinazione con il ceppo attenuato riduce la febbre causata dall'infezione sperimentale con *S.Choleraesuis* e la colonizzazione di tonsille, linfonodi ileocecali, ileo, cieco e colon. Diversamente, poche differenze si registrano nella colonizzazione degli organi di suini vaccinati con il vaccino inattivato e non vaccinati. Infine, la vaccinazione con il ceppo attenuato induce una pronta risposta immunitaria sia umorale che cellulosa-mediata nei suini infettati con *S.Choleraesuis*, indicando che è possibile una parziale cross-protezione con il ceppo eterologo di *S.Typhimurium*.

3.4 *La vaccinazione delle scrofe con un vaccino stabulogeno di S.Typhimurium var. Monofasica, è protettiva verso l'infezione dei loro suinetti.*

La vaccinazione delle scrofe e delle loro nidiate migliora l'accrescimento dei suini. Le differenze sono statisticamente significative, in tutte le fasi di produzione, tra il gruppo non vaccinato proveniente da scrofe non vaccinate e il gruppo vaccinato proveniente da scrofe vaccinate. L'analisi sierologica ha evidenziato una riduzione della circolazione del patogeno nei suini, figli di scrofe vaccinate, sia in fase di lattazione sia in fase di accrescimento/ingrasso. L'intervento immunizzante delle scrofe non limita l'eliminazione fecale delle madri, ma riduce il numero di suini eliminatori. L'analisi della colonizzazione degli organi ha evidenziato una differenza statisticamente significativa a livello delle tonsille tra i suini vaccinati figli di scrofe vaccinate e suini non vaccinati figli di scrofe non vaccinate. Quest'aspetto è di fondamentale importanza, considerando che, le tonsille sono gli organi responsabili del mantenimento delle infezioni croniche.

4. DISCUSSIONE

La salmonellosi negli allevamenti suini è un danno economico a carico degli allevatori ed è un pericolo per la salute dei consumatori (Selke et al., 2007). Negli allevamenti con alto indice di prevalenza, la vaccinazione, associata alle buone pratiche manageriali, è lo strumento più valido nel controllo dell'infezione (Hotes et al., 2011). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare la sicurezza e l'efficacia di due categorie di vaccini: i vaccini attenuati e i vaccini stabulogeni inattivati. La vaccinazione eseguita con un ceppo attenuato è caratterizzata da una maggiore protezione dei soggetti trattati, poiché il vaccino

attenuato mima in modo più efficace l'infezione con il ceppo virulento, attivando la risposta immunitaria cellulo-mediata, protettiva verso i batteri, parassiti facoltativi endocellulari, come *Salmonella* (Meeusen et al., 2007). La vaccinazione con il ceppo inattivato induce prevalentemente una risposta immunitaria umorale, tuttavia le immunoglobuline prodotte non sono completamente efficaci nel controllo dell'infezione da *Salmonella*.

I nostri esperimenti hanno dimostrato che *S.Typhimurium* Δ znuABC non è patogeno per i suini in accrescimento, è immunogeno, poiché stimola la risposta immunitaria cellulo-mediata, caratterizzata da una rapida e cospicua produzione d'IFN- γ a seguito del challenge ed è efficace, poiché la clearance di *S.Typhimurium* o *S.Choleraesuis* è più rapida nei suini vaccinati e la concentrazione di colonizzazione degli organi di questi soggetti è minore rispetto agli altri gruppi. È presumibile sostenere che la vaccinazione con *S.Typhimurium* Δ znuABC protegga dalla malattia e riduca il numero di portatori nell'allevamento.

La vaccinazione con il vaccino stabulogeno inattivato ha evidenziato migliore crescita dei suini, riduzione del numero di suinetti eliminatori ed inferiore colonizzazione degli organi in fase di macellazione. Il ruolo fondamentale è attribuibile all'immunità materna, poiché la vaccinazione delle scrofe determina un incremento delle immunoglobuline e il loro trasferimento nel colostro. Il trasferimento di IgAs ai suinetti tramite il colostro provoca un incremento dell'immunità mucosale a livello intestinale, di conseguenza gli animali risultano maggiormente protetti verso l'infezione da *Salmonella*, che ha un ciclo feco-orale e l'intestino rappresenta l'organo bersaglio (De Busser, 2013). La sola vaccinazione dei suinetti con il vaccino stabulogeno non è ugualmente protettiva perché gli anticorpi ematici non sono protettivi a livello intestinale e, a livello sistemico, la protezione è maggiormente determinata dall'immunità cellulo-mediata.

Alla luce di questi risultati, il migliore protocollo vaccinale, per garantire una completa protezione dei suini in allevamento, è caratterizzato da una vaccinazione delle scrofe con vaccino inattivato durante il periodo preparto, seguito dalla vaccinazione dei suini, durante la fase di svezzamento quando l'immunità materna colostrale è in declino, con un vaccino attenuato di *Salmonella*.

BIBLIOGRAFIA:

1. Beloeil P.A., Chauvin C., Proux K., Madec F., Fravalto P., Alioum A. (2004) "Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter". *Vet Res* 35, 513-530.
2. Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. (2009) "Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control". *Vet Microbiology* 130, 1-19.
3. De Busser E.V., De Zutter L., Dewulf J., Houf K., Maes D. (2013) "Salmonella control in live pigs and at slaughter." *Vet J.* 196, 20-27.
4. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens (2010). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1546.pdf>.
5. Hotes S., Traulsen I., Krieter J. (2011) "Salmonella control measures with special focus on vaccination and logistic slaughter procedures". *Transbound Emerg Dis.* 58(5):434-44.
6. Hur J., Lee J.H. (2010) "Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis". *Vet Microbiol* 143, 270-276.
7. Hur J., Song S.O., Lim J.S., Chung I.K., Lee J.H. (2011) Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella Typhimurium* vaccine for protection against *Salmonella* infections

in growing piglets". *Vet Immunol Immunopathol* 139, 250-256.

8. Lettini A.A., Saccardin C., Ramon E., Longo A., Cortini E., Dalla Pozza M.C., Barco L., Guerra B., Luzzi I., Ricci A. (2014). "Characterization of an unusual *Salmonella* phage type DT7a and report of a foodborne outbreak of salmonellosis." *Int J Food Microbiol.* 17;189:11-7.
9. Mastroeni P., Chabalgoity J.A., Dunstan S.J., Maskell D.J., Dougan G. (2001) "Salmonella: Immune responses and vaccines". *Vet J* 131, 132-164.
10. Meeusen E.N., Walker J., Peters A., Pastoret P.P., Jungersen G. (2007) "Current status of veterinary vaccines." *Clin Microbiol Rev.* 20(3):489-510. Review.
11. Selke M., Meens J., Springer S., Frank R., Gerlach G.F. (2007) "Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine". *Infect Immun* 75, 2476-83.
12. Pesciaroli M., Gradassi M., Martinelli N., Ruggeri J., Pistoia C., Raffatellu M., Magistrali C.F., Battistoni A., Pasquali P., Alborali G.L. (2013). "Salmonella Typhimurium lacking the Znuabc transporter is attenuated and immunogenic in pigs". *Vaccine.* 31, 2868-73.
13. Gradassi M., Pesciaroli M., Martinelli N., Ruggeri J., Petrucci P., Hassan W.H., Raffatellu M., Scaglione F.E., Ammendola S., Battistoni A., Alborali G.L., Pasquali P. (2013) "Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZnuABC transporter: an efficacious orally-administered mucosal vaccine against salmonellosis in pigs". *Vaccine.* 31, 3695-701.
14. Ruggeri J., Pesciaroli M., Gaetarelli B., Scaglione F.E., Pregel P., Ammendola S., Battistoni A., Bollo E., Alborali G.L., Pasquali P. (2014) "Parenteral administration of attenuated *Salmonella Typhimurium* Δ znuABC is protective against salmonellosis in piglets." *Vaccine* 7;32(32):4032-8.