

# APPLICAZIONE DI PROTOCOLLI VACCINALI PER IL CONTROLLO DI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM VARIANTE MONOFASICA NELL'ALLEVAMENTO SUINO

## *APPLICATION OF DIFFERENT VACCINATION PROTOCOLS TO CONTROL SALMONELLA TYPHIMURIUM MONOPHASIC VARIANT IN PIGS*

RUGGERI J.<sup>1</sup>, CHIRULLO B.<sup>2</sup>, DRUMO R.<sup>2</sup>, PESCIAROLI M.<sup>3</sup>, MARTINELLI N.<sup>1</sup>, SCAGLIONE F.E.<sup>4</sup>, PREGEL P.<sup>4</sup>, AMMENDOLA S.<sup>5</sup>, LAZZARO M.<sup>1</sup>, GIACOMINI E.<sup>1</sup>, OSSIPRANDI MC.<sup>6</sup>, CORRADI A.<sup>6</sup>, BATTISTONI A.<sup>5</sup>, BOLLO E.<sup>4</sup>, PASQUALI P.<sup>2</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 25124 Brescia, Italy;*

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

<sup>3</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy;*

<sup>4</sup>*Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Torino, 10095 Torino, Italy;*

<sup>5</sup>*Department of Biology, Università di Roma Tor Vergata, 00133 Rome, Italy;*

<sup>6</sup>*Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Parma, 43100 Parma, Italy;*

**Parole chiave:** *Salmonella* Typhimurium variante Monofasica, Controllo, Sanità Pubblica.  
**Keywords:** *Salmonella* Typhimurium Monophasic Variant, Control, Public Health.

### **Riassunto**

L'infezione umana sostenuta da mST è sempre più frequente negli ultimi anni ed il consumo di carne di suino contaminata rappresenta una delle principali fonti di trasmissione. Nell'allevamento suino l'infezione è controllata attraverso l'uso di antibiotici, tuttavia l'incremento di ceppi multiresistenti ha determinato una riduzione dei principi attivi utili per la terapia nell'uomo e negli animali e per tale motivo risulta necessario applicare nuove strategie di controllo. La vaccinazione rappresenta uno strumento efficace soprattutto se associato ad un'ottima gestione manageriale dell'allevamento. Tuttavia, vaccini efficaci e sicuri non sono attualmente disponibili per la profilassi in Italia. L'obiettivo di questo lavoro è quello di descrivere i risultati ottenuti dalla vaccinazione con un ceppo attenuato di mST testato in condizioni sperimentali ed i risultati ottenuti dalla vaccinazione con un ceppo inattivato e stabulogeno di mST testato in condizioni di campo. Il protocollo vaccinale ideale è caratterizzato dalla vaccinazione delle scrofe, prima del parto, con un vaccino inattivato o stabulogeno garantendo un'adeguata trasmissione di immunoglobuline alle nidiate attraverso il colostro. Successivamente, si completa con la vaccinazione dei suinetti con un vaccino attenuato che meglio attiva l'immunità cellulo-mediata. In questo modo, sia la componente umorale che quella cellulo-mediata sono correttamente stimolate garantendo una protezione completa.

### **Abstract**

Human infection caused by *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (mST) is increasingly frequent during last years and contaminated pork meats represent one of the most important source of transmission. Control of infection in piggeries is principally based on administration of antibiotics in feed. Unfortunately, increment of multidrug-resistant strains has underlined the necessity to apply new control strategies. Vaccination, associated

to good farming management, is effective, however, efficacious and safe vaccines are not available. The aim of project is to show results obtained from different research activities focused on application of a mST attenuated vaccine tested in experimental conditions and on application of a mST bacterins administered in animals of an endemic farms. An ideal vaccination protocol is characterized by vaccination of sows with an autogenous vaccine, before delivery, guaranteeing an adequate transmission of immunoglobulin through colostrums and vaccination of piglets with an attenuated vaccine which better activates cell-mediated immune system. In this way, both humoral and cell-mediated immune systems are correctly activated to protect animals.

## INTRODUZIONE

*Salmonella* Typhimurium variante Monofasica è un cocco-bacillo, Gram-, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile, non lattosio fermentante, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Questo ceppo, la cui formula antigenica è 4,[5],12:i:-, ha perso o non esprime la fase 2 dell'antigene flagellare (H2) e per tale motivo si differenzia da *Salmonella* Typhimurium (Echeita et al., 2001; Switt et al., 2009). L'antigene flagellare è responsabile della motilità del batterio e per il genere *Salmonella* esistono 35 antigeni flagellari che esprimono due fasi. L'espressione dell'antigene flagellare sta alla base dell'identificazione dei vari sierotipi di *Salmonella* spp. L'espressione delle fasi dell'antigene flagellare consente di distinguere i ceppi in monofasici o bifasici. La variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium è stata identificata durante gli anni Novanta e la sua incidenza è nettamente incrementata nel corso degli ultimi due decenni come conseguenza della rapida diffusione del patogeno e dell'affinamento delle metodiche diagnostiche (Echeita et al., 1999). *S.*Typhimurium variante monofasica è largamente diffusa nell'ambiente e nel suino determina una sintomatologia enterica scarsamente distinguibile da quella indotta da *S.*Typhimurium. Tuttavia, a differenza di *S.*Typhimurium, negli animali la sintomatologia sembrerebbe essere leggermente attenuata e, per tale motivo, numerosi animali portatori asintomatici albergano il patogeno e determinano la contaminazione delle carcasse in fase di macellazione. Il consumo di prodotti carnei poco cotti determina un incremento del rischio di trasmissione all'uomo, il quale manifesta una sintomatologia più severa rispetto che l'animale (Hauser et al., 2010; Arnold et al., 2015). Inoltre, l'utilizzo non controllato di antibiotici ad uso metafilattico negli animali ha determinato un incremento di ceppi multiresistenti di *S.*Typhimurium e *S.* Typhimurium variante Monofasica e, conseguentemente, una drastica riduzione dei principi attivi disponibili per la terapia nell'uomo. Per tale motivo, a tutela della Salute Pubblica, risulta necessario intraprendere nuove strategie per il controllo dell'infezione negli animali e ridurre la percentuale di malattia nell'uomo associata al consumo di prodotti contaminati. I sierotipi maggiormente coinvolti nella salmonellosi dell'uomo sono *S.*Enteritidis (principalmente trasmessa con il consumo di prodotti avicoli) e *S.* Typhimurium, inclusa la variante monofasica (principalmente trasmessa con il consumo di carne di suino). La Comunità Europea ha emanato diversi Regolamenti (E.R. n° 2160/2003 e successive implementazioni) con l'obiettivo di tutelare la salute dei consumatori e di ridurre la percentuale di salmonellosi nell'uomo associata al consumo di prodotti di origine animale. Principalmente, è stato richiesto agli Stati Membri il controllo delle infezioni da *Salmonella* sp. nelle specie avicole e l'applicazione obbligatoria della vaccinazione in questi animali ha determinato una drastica riduzione dei casi di salmonellosi nell'uomo. Alla luce degli ottimi risultati ottenuti con l'applicazione della vaccinazione negli allevamenti avicoli e con l'obiettivo di ridurre l'uso di antibiotici negli allevamenti suini, la Comunità Europea potrebbe richiedere l'applicazione di nuove misure di controllo, compresa la vaccinazione, nei confronti dei sierotipi principalmente isolati nella filiera suina. A differenza dell'allevamento avicolo, non esistono in Italia vaccini

registrati per il controllo di *S. Typhimurium* variante monofasica nei suini. L'obiettivo di questo lavoro è di presentare i risultati ottenuti dall'applicazione di un vaccino attenuato e di uno inattivato per il controllo delle infezioni da *S. Typhimurium* variante monofasica nell'allevamento suino.

## **MATERIALI E METODI**

### *Applicazione di un protocollo vaccinale con ceppo attenuato in condizioni sperimentali*

*S. Typhimurium* (ST) e *S. Typhimurium* variante Monofasica (mST) sono i sierotipi più frequentemente isolati nell'allevamento suino. L'obiettivo dell'applicazione di questo protocollo vaccinale è stato la verifica della sicurezza e dell'efficacia di un vaccino attenuato di *S. Typhimurium* variante Monofasica (mST $\Delta$ znuABC) in corso d'infezione omologa (mST) ed eterologa (ST). Il vaccino attenuato è stato prodotto inserendo una cassetta di resistenza alla streptomicina e cloramfenicolo nei geni che codificano per il trasporto dello zn (znuABC) secondo il protocollo pubblicato in precedenza (Ammendola et al., 2007). Il disegno sperimentale ha previsto la divisione in 4 gruppi di 20 suinetti svezzati provenienti da allevamenti *Salmonella*-free. Il gruppo A (5 suini) ed il gruppo B (5 suini) sono stati vaccinati con  $5 \times 10^7$  UFC di mST $\Delta$ znuABC per via orale ed l'eliminazione fecale del ceppo vaccinale è stata monitorata tramite esame microbiologico a cadenza settimanale fino al giorno 35 post-vaccinazione. L'infezione è avvenuta il giorno 36 post vaccinazione con  $5 \times 10^8$  UFC di mST nei gruppi A e D e  $5 \times 10^8$  UFC di ST nei gruppi B e C. I parametri valutati sono stati il peso, la temperatura, l'eliminazione fecale del ceppo vaccinale e del ceppo virulento e la colonizzazione degli organi (tonsille, linfonodi ileociecocolici, milza, ileo, cieco e colon).

### *Applicazione di un protocollo vaccinale con ceppo inattivato in condizioni di campo*

L'obiettivo di questo studio è stato la valutazione dell'efficacia di un vaccino stabulogeno di *S. Typhimurium* variante monofasica testato in condizioni di campo tramite l'applicazione di diversi protocolli. Tali protocolli hanno previsto la sola vaccinazione dei riproduttori, la sola vaccinazione degli animali in fase di accrescimento e la vaccinazione combinata dei riproduttori e delle loro nidiate. L'ipotesi iniziale è stata che la vaccinazione dei riproduttori determina una produzione di anticorpi trasmessi alla prole tramite il colostro e la presenza di immunoglobuline mucosali inibisce l'attecchimento e l'invasione del patogeno che penetra per via orale. I gruppi oggetto di studio sono stati i seguenti: 20 scrofe vaccinate (gruppo V), 20 scrofe non vaccinate (gruppo nV), 30 suinetti vaccinati e figli di scrofe vaccinate (VV), 30 suinetti non vaccinati e figli di scrofe vaccinate (VnV), 30 suinetti vaccinati e figli di scrofe non vaccinate (nVV) e 30 suinetti non vaccinati e figli di scrofe non vaccinate (nVnV). Il vaccino è stato prodotto da un ceppo isolato da un'azienda endemica oggetto dello studio. Il ceppo è stato isolato, amplificato, inattivato e somministrato ai riproduttori (gruppo V), alla sesta e alla seconda settimana antecedente il parto, e ai suinetti (gruppi VV e nVV) alla quarta e all'ottava settimana di vita alla dose  $2 \times 10^9$  UFC per via intramuscolare. Gli animali oggetto dello studio sono stati identificati con delle apposite marche auricolari e allevati nelle medesime condizioni degli animali non oggetto dello studio per verificare l'efficacia della vaccinazione in una situazione più rappresentativa delle condizioni di campo. I campioni prelevati nei riproduttori sono stati il sangue, le feci e i tamponi ambientali a 7 giorni dal parto, al momento del parto e tre settimane dopo. I suinetti sono stati monitorati dalla nascita alla macellazione. Il peso è stato registrato a 2, 28, 125 e 293 giorni di vita, il sangue è stato prelevato a 2, 28, 91, 125, 250 e 293 giorni di vita, le feci sono state prelevate a 2, 28, 125 e 293 giorni di vita, i tamponi ambientali sono stati prelevati a 7 giorni dallo spostamento nei box della fase di svezzamento ed infine, le tonsille, i linfonodi ileociecocolici e il contenuto intestinale sono stati prelevati in fase di macellazione (giorno 294 di vita). Gli esami eseguiti

sono stati l'esame microbiologico semiquantitativo per le feci e gli organi e l'esame sierologico per la valutazione del titolo anticorpale del sangue.

## **RISULTATI**

### *Efficacia di S. Typhimurium variante monofasica $\Delta$ znuABC a seguito del challenge omologo ed eterologo*

I risultati registrati nella prima prova sperimentale hanno confermato che il vaccino attenuato pur essendo un ceppo vivo non ha determinato alterazioni nel ritmo di crescita degli animali ed il trend d'eliminazione fecale del ceppo vaccinale ha corroborato dati precedentemente pubblicati (Pesciaroli et al, 2013; Ruggeri et al., 2014) per cui il ceppo non è più rilevabile dopo la terza settimana dalla vaccinazione. In merito all'efficacia della vaccinazione, è emerso che l'eliminazione fecale sia di mST sia di ST ha subito una drastica riduzione nei primi sette giorni successivi all'infezione nei gruppi vaccinati. La differenza è risultata statisticamente significativa al giorno 14 post-infezione tra i gruppi vaccinati ed il corrispondente gruppo non vaccinato, ma infetto con mST o con ST. Tuttavia, la differenza non ha raggiunto la significatività statistica durante i successivi time-points. In merito alla colonizzazione organica, è emerso che la vaccinazione con mST $\Delta$ znuABC ha determinato una riduzione della colonizzazione delle tonsille e dei linfonodi da parte del ceppo eterologo virulento (ST) rispetto alla colonizzazione dei medesimi organi del gruppo non vaccinato ed infetto con il medesimo ceppo eterologo virulento. Nessuna differenza di colonizzazione organica nella milza, nell'ileo, nel cieco e nel colon è stata registrata tra i gruppi vaccinati e non vaccinati entrambi infetti con mST o ST. Tuttavia, anche se la differenza non raggiunge la significatività statistica, la vaccinazione sembrerebbe ridurre la colonizzazione dell'ileo e del colon in animali vaccinati ed infetti con mST o con ST.

### *Efficacia del vaccino stabulogeno di S. Typhimurium variante monofasica testato in riproduttori e suinetti*

I risultati ottenuti dall'applicazione in campo di un vaccino stabulogeno inattivato hanno evidenziato che la vaccinazione delle madri migliora il peso dei suinetti allo svezzamento ed, inoltre, è stata registrata una differenza statisticamente significativa di peso medio tra suini vaccinati figli di scrofe vaccinate (VV) e suini non vaccinati figli di scrofe non vaccinate (nVnV) sia in fase di ingrasso che di macellazione. La vaccinazione delle scrofe non determina alcuna riduzione della loro eliminazione fecale, tuttavia determina una riduzione del numero di suinetti eliminatori in fase di svezzamento. Ugualmente la vaccinazione delle scrofe e dei suinetti determina una riduzione del numero dei soggetti eliminatori in fase di ingrasso, ma nessuna differenza è stata evidenziata tra i gruppi nVV e VnV, che hanno subito un unico intervento vaccinale. Il titolo anticorpale delle scrofe vaccinate tende a decrescere tra l'ultima fase della gravidanza fino allo svezzamento delle nidiate, diversamente il titolo anticorpale cresce nel medesimo periodo nelle scrofe non vaccinate indicando una possibile circolazione del patogeno. Il titolo anticorpale dei suinetti prima della loro vaccinazione è maggiore nei figli delle scrofe vaccinate rispetto che ai figli delle scrofe non vaccinate. Il titolo anticorpale dei suini dopo la loro vaccinazione evidenzia che il gruppo VnV ha un titolo anticorpale statisticamente inferiore rispetto agli altri gruppi per tutto il periodo di studio. Il gruppo VV ha un titolo anticorpale maggiore rispetto al gruppo VnV a causa del richiamo vaccinale eseguito nei suinetti all'ottava settimana di vita. Tuttavia, in questi gruppi che sono entrambi costituiti dai figli di scrofe vaccinate (VnV e VV) il titolo anticorpale tende a ridursi nel tempo o subire leggere inflazioni. Diversamente, nei gruppi nVnV e nVV costituiti da suini figli di scrofe non vaccinate, il titolo anticorpale è superiore rispetto al gruppo VnV per tutto il periodo di studio ed inoltre aumenta esponenzialmente in fase di magronaggio-ingrasso fino alla macellazione indicando una circolazione del patogeno.

## DISCUSSIONE

### *Sicurezza ed efficacia del vaccino attenuato di *S. Typhimurium* variante monofasica*

L'analisi della sicurezza del ceppo vaccinale attenuato mST $\Delta$ znuABC ha evidenziato che la crescita degli animali non è alterata dalla somministrazione per via orale di tale ceppo. Inoltre, i dati relativi all'ecotossicità hanno evidenziato che il ceppo non è più rilevabile dopo tre settimane nelle feci degli animali, corroborando i dati già pubblicati relativi all'ecotossicità di un ceppo attenuato di *S. Typhimurium* (ST $\Delta$ znuABC) (Ruggeri et al., 2014; Pesciaroli et al., 2013; Gradassi et al., 2013). In relazione all'efficacia, è emerso che la vaccinazione riduce significativamente l'eliminazione fecale sia di mST sia di ST al 14° giorno successivo all'infezione. In merito alla colonizzazione organica, il ceppo vaccinale riduce significativamente la colonizzazione del ceppo eterologo virulento ST nelle tonsille e nei linfonodi. La valutazione della virulenza dei ceppi wild type consente di dedurre che ST sembrerebbe più virulento rispetto a mST. A parità di dosaggio d'infezione, gli animali vaccinati o non vaccinati, ma infetti con mST, hanno mostrato un incremento di peso leggermente superiore, un minore rialzo febbrile e un'eliminazione fecale meno cospicua a confronto degli animali infetti con ST. Tuttavia, a livello organico mST ha colonizzato maggiormente le tonsille e i linfonodi rispetto che ST. La mancanza della seconda fase flagellare sembrerebbe non influenzare l'invasione mucosale (Crayford G. et al., 2014) e sembrerebbe ridurre la stimolazione della risposta aspecifica ed infiammatoria che aiutano l'ospite a controllare l'infezione (Van Parys et al., 2011), per tali motivi questo ceppo è avvantaggiato nella colonizzazione organica.

### *Efficacia del vaccino stabulogeno di *S. Typhimurium* variante monofasica*

I risultati ottenuti dimostrano che il vaccino stabulogeno di *S. Typhimurium* variante monofasica è in grado di ridurre la prevalenza d'infezione, l'eliminazione fecale e la colonizzazione organica in suini allevati in aziende endemiche. Il grado di efficacia è relazionata al protocollo vaccinale applicato (vaccinazione delle scrofe e dei suinetti o sola vaccinazione di scrofe o di suinetti). Il protocollo migliore è risultato la doppia vaccinazione di scrofe e suinetti. Gli animali nati da scrofe vaccinate assumono tramite colostro un ingente quantitativo di anticorpi mucosali che sono più protettivi rispetto che gli anticorpi sierici in corso d'infezione con un patogeno facoltativo intracellulare come *Salmonella* sp. La somministrazione del vaccino inattivato anche nelle nidiate in un periodo caratterizzato dalla riduzione dell'immunità materna e da stress ambientale dovuto allo svezzamento fornisce un valido supporto per il controllo dell'infezione. Il gruppo VV è risultato il più protetto per il migliore incremento di peso, per il minore numero di animali eliminati e per il minore numero di organi colonizzati, riducendo anche il rischio di introduzione del patogeno in fase di macellazione e di possibile trasmissione all'uomo.

## CONCLUSIONE

*Salmonella* Typhimurium variante monofasica rappresenta sempre più un problema di Sanità Pubblica per l'incremento dei casi umani di salmonellosi dovuti al consumo di carne di suino contaminata con questo sierotipo. Inoltre, rappresenta un problema di sanità animale per le ingenti perdite economiche dovute ad un ritardato accrescimento e al costo dei trattamenti. A seguito dell'introduzione della vaccinazione obbligatoria negli allevamenti avicoli, il suino rappresenta una delle principali fonti responsabili della malattia nell'uomo. Per tale motivo, la Comunità Europea potrebbe richiedere nuovi ed efficaci sistemi di controllo anche nell'allevamento suino e la vaccinazione rappresenta il sistema di controllo più adatto in aree ad elevata presenza di allevamenti endemici. Tuttavia, vaccini sicuri ed efficaci per il controllo dell'infezione da *Salmonella* sp. nell'allevamento suino non sono disponibili in Italia. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di fornire dei risultati preliminari ottenuti dall'applicazione sia di un vaccino attenuato sia di un vaccino inattivato. I vaccini attenuati rappresentano la scelta migliore poiché è stata ampiamente dimostrata la loro capacità a stimolare prevalentemente il

sistema immunitario cellulo-mediato che è più protettivo nei confronti dei patogeni intracellulari facoltativi come *Salmonella* sp. Diversamente, i vaccini inattivati risultano essere più sicuri in quanto prodotti con un ceppo spento. Alla luce dei risultati ottenuti, è emerso che sia il vaccino attenuato che quello inattivato hanno avuto un ruolo importante nel controllo dell'infezione. In conclusione, il protocollo vaccinale ideale dovrebbe basarsi sulla vaccinazione dei riproduttori con un ceppo inattivato, preferibilmente stabulogeno, a fine gestazione. Le immunoglobuline trasferite alla nidata tramite il colostro, essendo prevalentemente mucosali, giocano un ruolo importante nel controllo dell'attecchimento e dell'invasione del patogeno. Successivamente, gli animali in fase di svezzamento dovrebbero essere vaccinati con un ceppo attenuato che stimola prevalentemente una risposta immunitaria cellulo-mediata più protettiva nei confronti di patogeni facoltativi intracellulari come *Salmonella* sp.

## BIBLIOGRAFIA

- Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A (2007). "High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*". *Infect Immun.* 75(12):5867-76.
- Arnold ME, Gosling RJ, Martelli F, Mueller-Doblies D, Davies RH (2015). "Evaluation of the sensitivity of faecal sampling for detection of monophasic *Salmonella Typhimurium* and other *Salmonella* in cattle and pigs". *Epidemiol Infect.* 143(8):1681-91.
- Crayford G, Coombes JL, Humphrey TJ, Wigley P (2014). "Monophasic expression of *FliC* by *Salmonella* 4,[5],12:i:- DT193 does not alter its pathogenicity during infection of porcine intestinal epithelial cells". *Microbiology.* 160(Pt 11):2507-16.
- Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA (1999). "Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain". *J Clin Microbiol.* 37(10):3425.
- Echeita MA, Herrera S, Usera MA (2001). "Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar *Typhimurium*". *J Clin Microbiol.* 39(8):2981-
- 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.
- Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, Rabsch W, Appel B, Fruth A, Malorny B(2010). "Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans". *Appl Environ Microbiol.*;76(14):4601-10.
- 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.
- 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
- Switt AIM, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M (2009). "Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-". *Foodborne Pathog Dis.* 6(4):407-15.
- Van Parys A, Boyen F, Leyman B, Verbrugghe E, Haesebrouck F, Pasmans F (2011). "Tissue-specific *Salmonella Typhimurium* gene expression during persistence in pigs". *PLoS One.*;6(8):e24120.