

## **INNOCUITÀ ED EFFICACIA PROTETTIVA DEL CEPPLO ATTENUATO *SALMONELLA GALLINARUM* SGP695AV NEL POLLO.**

Legretto M.<sup>1</sup>, Circella E.<sup>1</sup>, Caroli A.<sup>1</sup>, Pugliese N.<sup>1</sup>, Meliota F.<sup>2</sup>, Lozito P.<sup>2</sup>, Camarda A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"*.

<sup>2</sup> *Fatro . Ozzano dell'Emilia, Bologna*

*Corresponding Author: Antonio Camarda, Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" S.p. per Casamassima Km 3, Valenzano Bari.*

*Email: antonio.camarda@uniba.it*

### **SUMMARY**

#### **Safety and protective efficacy of the attenuated strain *Salmonella gallinarum* SGP695AV in chickens.**

Fowl typhoid, caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum, causes heavy economic loss to the industrial poultry farms due to its strong impact in terms of mortality and morbidity. Furthermore, its management is quite difficult, as the infectious agent may remain in the poultry farms even during sanitary breaks. Therefore, many Countries have implemented strict preventive measures, leading the disease to be eradicated in many Western Countries. Notwithstanding, fowl typhoid is still widely diffused in the Mediterranean Countries, and in Africa, Asia and South America as well. Among the preventive measures needed to control the disease, the vaccination plays a pivotal role. To date, the only available vaccine consists of a rough strain of *S. Gallinarum*. The aim of this work was to assess the protective efficacy and safety of a live attenuated strain, termed SGP695AV.

At T0 and 15 days after (T15),  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^9$  and  $2 \times 10^{11}$  UFC of SGP695AV were administered *per os* to three groups of 12 30-day old laying hens, termed A, B and C, respectively. On the other hand, a verified pathogenic *S. Gallinarum* strain, SG354 were administered *per os* to another group, termed P, at T0. An equal volume of physiological solution was administered to the group N at T0 and T15. Thirty-seven days after the first administration (T37), 5 randomly chosen chickens from the groups A, B, C and P were humanly sacrificed to evaluate the presence of SGP695AV in livers, spleens and guts. Contemporarily, the other animals of groups A, B, C and N were inoculated *per os* with  $1 \times 10^{13}$  UFC of SG354. Everyday, each animal was observed to assess its clinical score on the basis of its symptomatology.

Serological test by rapid serum agglutination was performed at T0, T15, T37 and 15 days after administration of SG354 (T52). Daily, cloacal swabs were collected to evaluate the fecal excretion of SGP695AV and/or SG354.

The data we gathered showed that vaccine did not cause significant adverse effects in chicken. Before T37, Clinical scores was low in A, B and C groups, even when higher doses of the vaccinal strain were administered. Contrarily, the clinical score

of the group P between T15 and T37 was up to 200 times higher than those of the groups A, B and C. After infection with SG354, the clinical scores remained low in the three vaccinated groups.

The excretion of SGP695AV was low and limited to the first 15 days. The fecal elimination of SG354 after T37 was equally low in the groups A, B and C, while was significantly more consistent in the group N.

Finally, the serological analyses evidenced that SGP695AV induce a significant seroconversion, which was higher at T15.

On aggregate, our data showed that SGP695AV is effective and safe, as it is preventive towards fowl typhoid and it did not cause evident adverse effects. Further analyses should assess if the protection which SGP695AV confers may be long-termed and if it could be suitable for a wide scale usage.

## **INTRODUZIONE**

La Pullurosi/Tifosi aviare rappresenta fin dalle origini dell'industria avicola moderna una delle cause più frequenti e più temute di riduzione della redditività aziendale (Barrow and Neto, 2011). La malattia una volta comparsa, tende a radicarsi in allevamento, ripresentandosi nei cicli successivi specie nel momento di massima produzione .

Le perdite economiche, legate ai costi per le cure necessarie al controllo della malattia, alla riduzione della produttività del gruppo, alla mortalità, alle misure di polizia veterinaria previste ed implementate dalle Autorità sanitarie e al calo d'immagine per l'azienda, incidono pesantemente sul bilancio dell'allevamento.

In molte Nazioni, il ricorso alla profilassi di stato, volta ad individuare ed eliminare i gruppi portatori, ha consentito di ottenere una consistente riduzione della diffusione della malattia senza giungere all'obiettivo definitivo della sua eradicazione (Shivaprasad, 2000). La Tifosi, pertanto, è ancora frequentemente segnalata in Africa, Asia e Centro-Sud America (Kang et al., 2012), mentre in Europa resta diffusa nelle regioni mediterranee del continente (Pugliese et. al, 2011).

Uno dei mezzi utilizzati per combattere questa salmonellosi, consiste nel ricorso al monitoraggio sistematico dei riproduttori, nonché all'effettuazione di profonde e radicali disinfezioni di ambienti e attrezzature, associate ad un vuoto sanitario durevole (Shivaprasad, 2000). Tuttavia, molto spesso, per motivi di carattere economico, quest'ultimo appare difficile da realizzare sul campo, dove è comune il riscontro di allevamenti o gruppi di galline ovaiole multietà. La possibilità di individuare ed eliminare tutti i focolti di infezione è praticamente irrealizzabile.

Da alcuni anni in molti Paesi, ai citati provvedimenti di profilassi igienico-sanitaria è stata aggiunta la vaccinazione; questo soprattutto negli allevamenti commerciali, specie quelli a vita produttiva lunga, come ad esempio le galline ovaiole.

Nel passato, la profilassi immunitaria è stata affidata a vaccini spenti, i quali, somministrati per via parenterale non hanno però sortito gli effetti sperati (Lee et al., 2005).

Più recentemente vengono utilizzati in molte aree del mondo vaccini vivi, basati su ceppi di *Salmonella gallinarum* in fase rugosa, con risultati migliori rispetto ai vaccini spenti nel ridurre l'impatto della forma clinica della malattia (Kwon et Cho, 2011, Lee, et al., 2005, 2007, Silva, et al, 1981) .Questi risultati hanno incoraggiato la ricerca di ceppi attenuati di *S. pullorum/gallinarum*, più efficaci per

via non parenterale, che potessero mostrare i requisiti idonei per essere impiegati come principi attivi per vaccini vivi contro la Tifosi aviare.

La selezione sequenziale di Salmonelle fagocitate da granulociti neutrofilo di mammiferi (Roof et al, 1992) o da eterofili di pollo (Kramer, 1998, Kramer et Hirl, 2001), si è dimostrata un metodo efficace di attenuazione di ceppi di Salmonelle patogene per diverse specie animali.

In questo contesto si inquadrano le attività riportate in questo lavoro volte a testare, in trials preliminari di laboratorio, l'innocuità e l'efficacia protettiva di un ceppo di *S. gallinarum* (SGP695AV), attenuato per adattamento ad eterofili di pollo, somministrato *per os* a polli di 37 giorni di vita.

## MATERIALI E METODI

**Animali.** Sono stati utilizzati 60 polli SPF di 30 giorni di vita, privi di anticorpi anti *S. gallinarum*. Al momento dell'accasamento gli animali sono stati suddivisi in cinque gruppi formati ciascuno da 12 soggetti, scelti casualmente; ad ogni soggetto è stato assegnato un numero riportato su un anello posto alla zampa sinistra.

Ciascun gruppo è stato accasato in un diverso ambiente, a terra, su lettiera di truciolo di legno. La temperatura e un idoneo ricircolo d'aria sono stati garantiti da sistemi di condizionamento ad aria forzata e lampade ad infrarossi.

I gruppi sono stati nominati rispettivamente A, B, C, P ed N.

**Piano sperimentale.** La sperimentazione ha avuto inizio dopo un periodo di adattamento dei pulcini di una settimana. Lo schema sperimentale è riportato in tabella 1.

Gruppo	Via di Somministr.	Somministrazione di SGP695AV		Challenge
		T0	T15	T37
		Dose	Dose	Dose
Gruppo A	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>7</sup> UFC/ml SGP695AV	2 X 10 <sup>7</sup> UFC/ml SGP695AV	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354
Gruppo B	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>9</sup> UFC/ml SG695AV	2 X 10 <sup>9</sup> UFC/ml SGP695AV	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354
Gruppo C	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>11</sup> UFC/ml SGP695AV	2 X 10 <sup>11</sup> UFC/ml SGP695AV	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354
Gruppo Controllo Positivo	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>11</sup> UFC/ml SG-354-	Nessuna somministrazione	-
Gruppo Controllo Negativo	<i>per os</i>	Soluzione fisiologica	Soluzione fisiologica	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354

**Tabella 1. Schema sperimentale adottato.**

A T0 e a T15 ai gruppi A, B e C è stata somministrata mediante gavage nel gozzo una dose di *S. gallinarum* SGP695AV rispettivamente alla dose di  $2 \times 10^7$  UFC/ml,  $2 \times 10^9$  UFC/ml e  $2 \times 10^{11}$  UFC/ml.

Contestualmente, a T0 gli animali del gruppo P (Controllo Positivo) sono stati sperimentalmente infettati con un ceppo patogeno di campo di *S. gallinarum* denominato SG354 isolato presso la Sezione di Patologia Aviaria del Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia dell'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro". L'infezione è avvenuta per via orale mediante gavage nel gozzo, alla dose di  $2 \times 10^{11}$  UFC.

Il gruppo N è stato tenuto come Controllo Negativo non infettato/non vaccinato.

A T37, 5 soggetti dei gruppi A, B, C, P, sono stati sacrificati mediante eutanasia e sottoposti ad esami necroscopici e batteriologici per la presenza di *Salmonella gallinarum* a partire da fegato, milza ed intestino.

**Challenge.** Al fine di valutare l'efficacia protettiva del ceppo SGP695AV, a T37 è stato effettuato sui polli rimasti dei gruppi A, B, C e su un pari numero di animali del gruppo N un challenge con il ceppo di *S. gallinarum*, SG354 alla dose di  $1 \times 10^{13}$  UFC/ml, somministrato con le modalità precedentemente descritte (il gruppo successivamente al challenge è stato denominato Gruppo non vaccinato/infettato). Gli animali sono stati sottoposti ad osservazione per un periodo di 15 giorni, al termine del quale sono stati sacrificati. Sulle carcasse sono stati eseguiti esami autoptici e microbiologici.

#### **Metodo di valutazione della sintomatologia e della mortalità (Clinical score).**

Giornalmente è stata registrata sintomatologia clinica (Abbattimento, stato del sensorio/anoressia) ed eventuale mortalità di ogni animale.

Ciascun pollo ha ricevuto una osservazione/giorno. Per il calcolo delle osservazioni si è operato nel seguente modo:

12 animali per gruppo = 12 osservazioni per gruppo al giorno, moltiplicato x il numero dei giorni di sperimentazione. In tal modo è stato ottenuto, per gruppo, il numero di osservazioni totali.

Ai sintomi ed alla mortalità è stato assegnato un punteggio come di seguito indicato:

1: per ogni giorno in cui il soggetto presentava abbattimento

2: per ogni giorno in cui il soggetto presentava diarrea

20: per ogni soggetto deceduto.

Il valore del punteggio finale è stato ottenuto calcolando il punteggio della sintomatologia clinica ed espresso come somma di punteggi o come percentuale in rapporto al numero delle osservazioni effettuate nel periodo considerato.

**Esami sierologici.** Esami sierologici per la ricerca di anticorpi nei confronti di *Salmonella gallinarum* sono stati allestiti a partire da campioni di sangue prelevati dagli animali dei gruppi A, B, e C ai tempi T0, T15, T37 e 15 giorni dopo il challenge. È stato utilizzato il test di agglutinazione rapida su vetrino (SAR) impiegando 2 differenti antigeni *Salmonella pullorum*, forniti rispettivamente da Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna e da Intervet (SP Antigen).

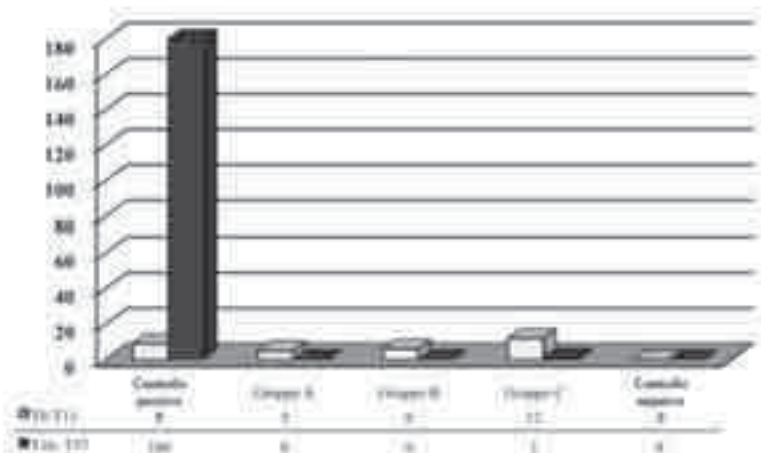
**Esami batteriologici per la ricerca di *S. gallinarum*.** Giornalmente, per l'intero periodo della sperimentazione, prima e dopo il challenge, sono stati eseguiti a partire da tutti gli animali tamponi cloacali per verificare l'eventuale escrezione fecale di *Salmonella gallinarum*.

Gli esami microbiologici sono stati effettuati, oltre che dai tamponi cloacali, anche a partire da fegato, milza, intestino, polmone, rene e midollo osseo dei soggetti deceduti e di quelli sacrificati. I tamponi cloacali e i campioni d'organo sono stati inoculati in terreno di prearricchimento, acqua peptonata tamponata (Buffered peptone water). Da tutti gli organi, inoltre, tranne che dall'intestino, al fine di reisolare la Salmonella sono state allestite semine dirette su terreni selettivi/differenziali Agar Verde Brillante (AVB)( Oxoid) ed Hektoen Enteric Agar (HE) (Oxoid), incubati a 37° C. Dai terreni di prearricchimento i campioni sono stati seminati su Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth (Oxoid) ed incubati a 41° C per 24 ore. Anche questi successivamente sono stati ripassati su AVB ed HE e posti a 37° C per 24 ore.

Le colonie sospette provenienti sia dai campioni arricchiti che da semina diretta sono state ripassate su agar nutritivo e successivamente sottoposte a test biochimici di identificazione mediante API20E (Biomérieux).

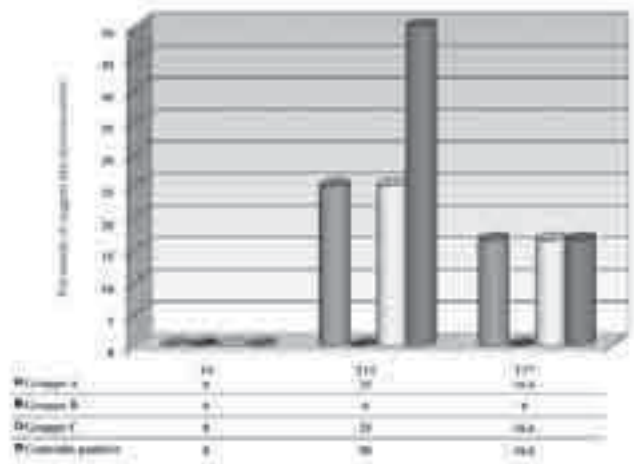
## RISULTATI

Gli animali dei gruppi A, B e C hanno reagito alla somministrazione con il ceppo SGP695AV manifestando una sintomatologia scarsa o inapparente, evidenziabile solo con lieve abbattimento e occasionale diarrea, fino alla seconda settimana di sperimentazione. Il *clinical score* è risultato in generale molto basso in tutti e 3 i gruppi; il punteggio più elevato è stato ottenuto dal gruppo C, che aveva ricevuto la dose più alta di SGP695AV. In ogni caso nessun animale è deceduto a seguito della somministrazione di SGP695AV. Diversa la situazione nel gruppo di controllo P, in cui la somministrazione del ceppo di campo SG354 ha determinato la comparsa di una grave forma clinica in tutti gli animali del gruppo, a partire dalla seconda settimana, con apice tra il 17° e il 25° giorno. Il gruppo di controllo negativo, in accordo con le aspettative, non ha manifestato alcuna sintomatologia (Fig. 1).



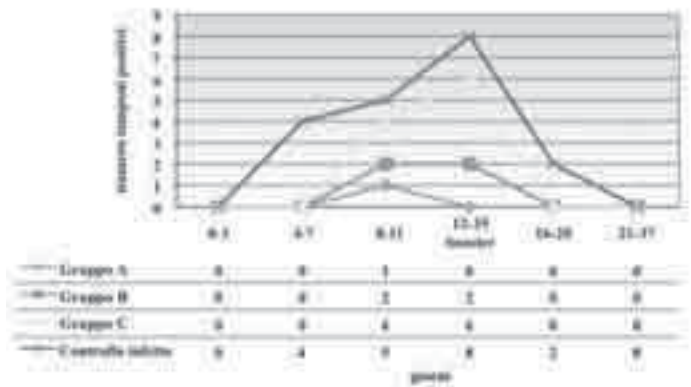
**Figura 1. Sintomatologia (espressa in punteggio per gruppo) osservata in pulcini che hanno ricevuto SGP695AV a dosi differenti rispetto a un gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo SG354.**

Gli esami sierologici per la ricerca di anticorpi specifici anti *S. pullorum/gallinarum* hanno evidenziato la presenza significativa di anticorpi nel 25% degli animali dei gruppi A e C al tempo T15, valore che si è ridotto al 16,6% al tempo T37; questo dato indica che il richiamo al tempo T15 con SGP695AV non ha determinato un aumento del numero di soggetti sieropositivi alla sieroaagglutinazione. Nel gruppo B nessun soggetto ha sierconvertito. Nel gruppo di controllo P, al tempo T15, il 50% degli animali era sieropositivo; anche questo valore si è ridotto al tempo T37 (Fig. 2).



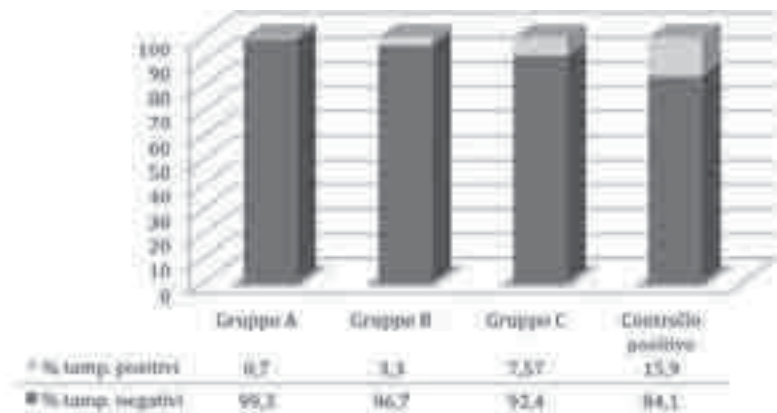
**Figura 2. Risposta anticorpale di polli ad una doppia somministrazione di SGP695AV e di un gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo SG354**

L'eliminazione del ceppo SGP695AV è risultata occasionale e limitata ai primi 15 giorni di sperimentazione (Fig. 3).



**Figura 3. Escrezione fecale di SGP695AV in gruppi di polli vaccinati per os a dosi differenti e di *S. gallinarum* di campo (SG354) nel gruppo di controllo positivo .**

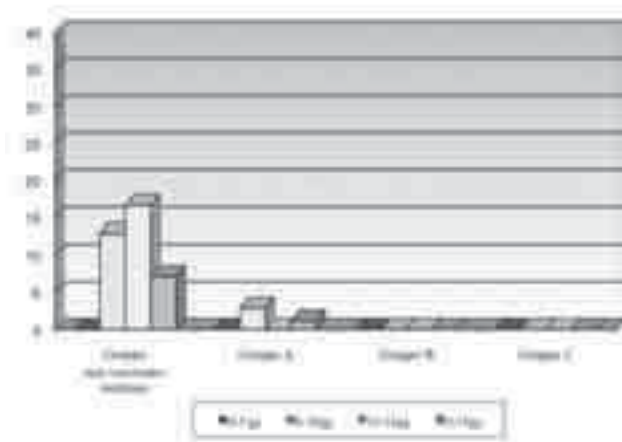
I soggetti del gruppo A hanno eliminato la salmonella in minor percentuale (0.7%), quelli del gruppo C in percentuale maggiore (7,57%). Molto più elevata l'escrezione della Salmonella con le feci da parte del gruppo di controllo positivo (15,9%) (Fig. 4).



**Figura 4. Percentuale di tamponi positivi a SGP695AV in 3 gruppi di polli che hanno ricevuto dosi differenti di SGP695AV e di un gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo SG354**

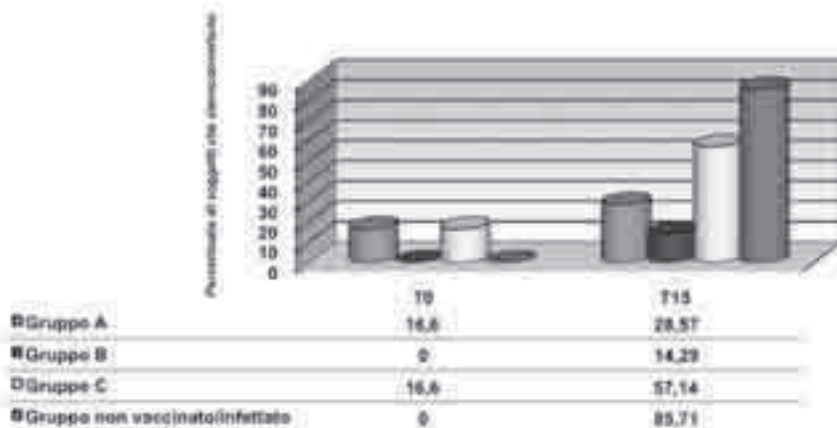
A distanza di 37 giorni dalla somministrazione il ceppo SGP695AV è stato reisolato dalla milza di 3 soggetti del gruppo C e da fegato e milza di 1 soggetto dei gruppi A e B.

L'infezione sperimentale dei gruppi A, B, e C con il ceppo di campo SG354 ha indotto sintomatologia clinica solo in un animale del gruppo A tra il 6° e il 10° giorno (Fig. 5).



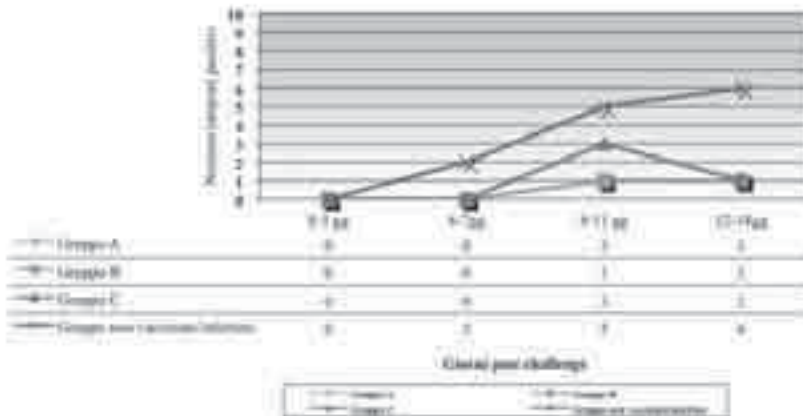
**Fig.5. . Clinical score (espresso come % sul numero di osservazioni/gruppo) di gruppi vaccinati con SGP695AV ed infettati con il ceppo di campo SG354.**

Gli animali dei tre gruppi hanno inoltre sierconvertito, manifestando a 15 giorni dall'infezione con il ceppo di campo anticorpi nei confronti di *S. gallinarum* in percentuali variabili. I polli del gruppo C hanno mostrato la maggiore percentuale di conversione sierologica (57,14%) (Fig. 6).



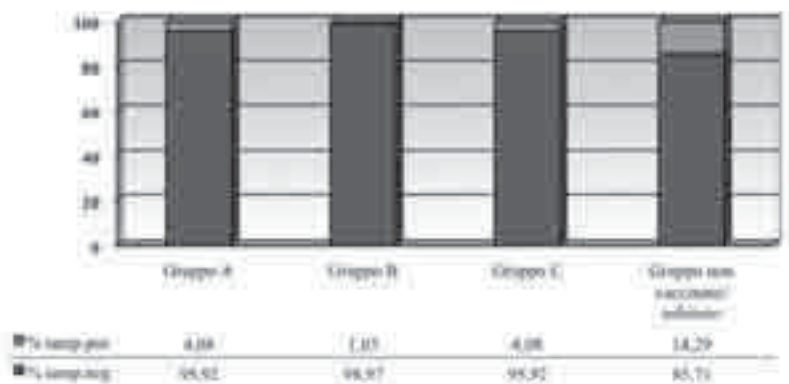
**Figura 6. Sieroconversione di polli vaccinati con SGP695AV ed infettati con *S. gallinarum* di campo (SG354)**

Nei 15 giorni post challenge solo il 4,08% dei tamponi cloacali dei gruppi A e C e l'1,03% del gruppo B è risultato contaminato dal ceppo di *S. gallinarum* di campo. L'escrezione del germe da parte del gruppo di controllo, oltre che persistente (Fig. 7) è stata significativamente superiore anche da un punto di vista quantitativo, giungendo nel complesso ad una percentuale del 14,29% (Fig. 8).



**Figura 7. Escrezione attraverso le feci della *Salmonella gallinarum* SG354 di campo dopo challenge di gruppi vaccinati con una doppia dose di SGP695AV**





**Figura 8. Percentuale di tamponi positivi a *Salmonella gallinarum* di campo (SG354) in gruppi di polli che hanno ricevuto dosi differenti di SGP695AV e in un gruppo di controllo non vaccinato (il dato è espresso in % di positività rispetto al numero di tamponi eseguiti).**

Il ceppo di *S. gallinarum* di campo, ricercato dagli organi degli animali del controllo positivo e dei polli dei gruppi A, B e C, sacrificati dopo 14 giorni dal challenge, è risultato, come atteso, persistente soprattutto nei soggetti del gruppo di controllo, essendo stata isolata da 6 soggetti su 7. Al contrario questa positività è risultata notevolmente inferiore negli animali dei gruppi A, B e C (rispettivamente 1 pollo per i gruppi A e C, e 2 per il gruppo B).

## DISCUSSIONE

La sperimentazione effettuata dimostra la piena innocuità del ceppo di *Salmonella gallinarum* SGP695AV somministrato *per os* alle dosi di  $2 \times 10^7$  UFC/ml,  $2 \times 10^9$  UFC/ml e  $2 \times 10^{11}$  UFC/ml in polli di 37 giorni di vita.

Il ceppo impiegato, infatti, nonostante la giovane età dei polli dimostra un elevato grado di attenuazione, inducendo solo una sintomatologia occasionale e comunque transitoria nei gruppi trattati. Il *clinical score*, è, infatti, pressoché sovrapponibile a quello di soggetti non vaccinati anche se è possibile evidenziare una certa dipendenza della reazione vaccinale in funzione della dose di SGP695AV ricevuta dagli animali.

La somministrazione di un richiamo conferma la totale innocuità del ceppo SGP695AV. In particolare, dopo la seconda dose, gli animali non presentano alcuna sintomatologia riferibile alla malattia.

La dose utilizzata sembra influenzare l'escrezione del ceppo SGP695AV. Gli animali che hanno ricevuto una dose di  $1 \times 10^7$  eliminano SGP695AV in numero inferiore rispetto a quelli che hanno ricevuto dosi più alte. In ogni caso, l'eliminazione della *S. gallinarum* SGP695AV con le feci è limitata nel tempo e ridotta ai primi 15 giorni dalla prima somministrazione. Il richiamo sembra non influire sull'escrezione del ceppo che si esaurisce completamente entro una settimana dalla seconda somministrazione. L'escrezione della *Salmonella* con le

feci è molto più alta e persistente nei polli del gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo.

Questi polli sembrano convertire in maggior numero rispetto a quelli dei gruppi che hanno ricevuto la *Salmonella* SGP695AV, in cui la produzione di anticorpi agglutinanti è rilevabile nel 25% degli animali dopo 15 giorni. La stessa persistenza degli anticorpi è ridotta se si considera che, dopo 37 giorni di sperimentazione e 2 somministrazioni, sia nel gruppo A che nel gruppo C presentano anticorpi solo il 16,6% degli animali.

Questo dato sembra correlato all'innocuità del ceppo SGP695AV che indurrebbe, dopo la somministrazione *per os*, una scarsa tendenza a stimolare la produzione precoce di anticorpi agglutinanti limitando la circolazione nell'organismo del germe e la sua colonizzazione negli organi interni. Questa caratteristica, tuttavia, non sembra influenzare negativamente l'efficacia immunizzante del ceppo SGP695AV che, a seguito del challenge, ha determinato una significativa riduzione del *clinical score* indipendentemente dalla dose impiegata per l'immunizzazione, rispetto al gruppo di controllo.

La somministrazione della *Salmonella* SGP695AV influenza anche l'escrezione del ceppo di campo. Dopo 14 giorni dal challenge, a fronte di una positività di 6 polli su 7 nel gruppo di controllo, solo 1 è ancora eliminatore nei gruppi A, B e C. Questi risultati sono confermati dall'esame del numero totale di tamponi positivi a *Salmonella gallinarum* che è stato estremamente contenuto in tutti e 3 i gruppi immunizzati rispetto al gruppo di controllo infetto.

## CONCLUSIONI

I risultati di questa sperimentazione dimostrano la piena innocuità e l'efficacia protettiva del ceppo SGP695AV su polli di 37 giorni di vita. Ulteriori indagini saranno necessarie per accertare l'immunità nella gallina ovaioia in condizioni di laboratorio e soprattutto di campo, al fine di poter giungere ad un impiego del ceppo in programmi di vaccinazione su larga scala.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barrow PA, Freitas Neto OC. 2011. Pullorum disease and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.*;40:1-13.
2. Kang MS, Kwon YK, Kim HR, Oh JY, Kim MJ, An BK, Shin EG, Kwon JH and Park CK. (2012). Differential identification of *Salmonella* enteric serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Vet. Microbiol.* In press.
3. Kramer T. (1998). Effects of heterophil adaptation on *Salmonella enteritidis* fecal shedding and egg contamination. *Avian Dis.*, 42:6-13.
4. Kramer T., Hirl M. (2001) Loss of virulence by eterophil-adapted *Salmonella pullorum*. *Avian Dis.*, 45:453-455.
5. Kwon HJ, Cho SH. 2011 Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. *Vaccine.* 29:1311-8.
6. Lee YJ, Mo IP, Kang MS. (2005). Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. *Avian Pathol.* 34:362-6.
7. Lee YJ, Mo IP, Kang MS. (2007). Protective efficacy of live *Salmonella gallinarum* 9R

8. vaccine in commercial layer flocks. *Avian Pathol.* 36:495-8
9. Pugliese N, Circella E, Pazzani C, Pupillo A, Camarda A. (2011). Validation of a seminested PCR approach for rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum*. *J. Microbiol. Methods.* 85: 22-27
10. Roof M., Kramer T., Roth J., Minion F. (1992). Characterisation of a *Salmonella choleraesuis* isolate after repeated neutrophil exposure. *Am J. Vet. Res.* 53:1328-1332.
11. Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF. (1981). Studies on the use of 9R strain of *Salmonella Gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian. Dis.* 25:38-52.
12. Shivaprasad HL. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19: 405-424.