

**NEWCASTLE ROAKİN SUŞU İLE DOKU KÜLTÜRÜNDE
HAZIRLANAN AŞININ BAĞIŞIKLIK DEĞERİ
ÜZERİNDE DENEMELER**

Hasan Başkaya*

Mustafa Arda**

Giriş

Yalancı Veba (Newcastle), kanatlı hayvanların çok öldürücü seyreden viral bir hastalığıdır. Tavuk yetiştiren yabancı ülkelerde ve yurumuzda zaman zaman büyük epidemilere sebep olmuştur (8). Hastalığı önlemek ve ekonomik zararlarını en düşük limitlere indirmek için, yumurtadan aşı hazırlama yolları aranmıştır. Bu gaye için, embriyolu yumurtaların allantois-amnion keselerinde üretilen Newcastle virusları, canlı (9,21) veya muhtelif maddelerle, formalinle (20,29), beta-Propiolactone'la (28,30), veya kristal violet'le (23,24) inaktive edilerek kullanılmıştır. Hem canlı ve hem de inaktive edilmiş virusların bağışıklık değerleri üzerinde çok çalışılmış olup, bunlardan inaktive edilenlerin pratikte pek fazla tavsiyeye şayan olmadıkları ve iyi bir immunitate vermedikleri tesbit edilmiştir (15). Canlı olarak kullanılan ve embriyodan elde edilen aşınların da önemli bir mahzuru ortaya çıkmıştır. Yumurta vasıtasıyla bir çok bakteriyel (13,19), PPLO (16) ve viral (10,14,26,31) etkenlerin de aşılarla karıştığı ve salgınlara sebep olduğu anlaşılmıştır. Buna mani olmak için, aşıları yumurtadan hazırlamak yerine, doku kültürlerinden elde etme metodları denenmiştir. Önceleri, Newcastle virusları, tavuk embriyo hücrelerinde (2,18,22-25) ve sonraları da çeşitli memeli hayvan hücrelerinde (3,11,18) üretilmiş ve bu yolla modifiye aşılar elde edilmiştir.

Doku kültürlerinde üretilerek modifiye edilen Newcastle Virusu ile hazırlanan aşınların bağışıklık güçleri, koruma durumları, aşı

* A. Ü. Vet. Fak. Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Profesörü, Ankara, Türkiye.

** A. Ü. Vet. Fak. Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Doçenti, Ankara, Türkiye.

hayvanlardan saçılmaları ve yumurta prodüksiyonuna etkileri üzerine bir çok araştırmacılar (2,4,5,6,7,17) eğilmişler ve iyi sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir.

Biz de, mezogenik bir virus olan Roakin Newcastle aşısı suşunu maymun böbrek hücrelerinde 20 pasajını yaparak, virusda meydana gelecek antijenik değişimleri, bağışıklık gücünü ve yumurta prodüksiyonu üzerinde olan etkisini denemek gayesi ile bu ön çalışmayı ele aldık.

Materyal ve Metod

Aşı Virusu: Roakin Newcastle aşısı virusu, maymun böbrek hücrelerinde üretilerek 20 pasajı yapıldı ve bu son pasajdan elde edilen doku kültürü sıvısı, aşısı materyali olarak kullanıldı. Doku kültürü aşısı virusunun Embryo Letal Dozu, $10^{-3.5}$ ELD₅₀ / 0.2 cc. ve Hemaglutinasyon titresini (HA) 1: 640 olarak tesbit edildi.

Eprüve Virusu: Eprüve için kullanılan patojen Newcastle virusu, Etlik Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsünden temin edilmiş ve kürsümüzde 2 yumurta pasajı yapılmıştır. Bir virusun Embryo Letal Doz'u, $10^{-2.5}$ ELD₅₀ / 0.1 cc. ve Hemaglutinasyon titresini (HA) 1:160 olarak bulunmuştur.

Gerçek Roakin aşısı ve gerekirse patojen virus, - 20° C. derecesinde saklanmıştır.

Piliçler: Denemelerde, 6 haftalık erkek ve dişi Leghorn piliçleri kullanılmıştır. Bunlar, kürsümüze ait aşısız hayvanların yumurtalarından elde edilmişlerdir. Deneme sırasında hayvanlar, her biri 12 tane olmak üzere 3 grubu ayrıldılar ve kanat numaraları takılarak ayrı ayrı kafeslere konuldular. Piliçler, Ankara Yem Sanayinden temin edilen toz piliç yemi ile beslenmişlerdir.

Tavuklar: Doku kültürü aşısının yumurta prodüksiyonu üzerine olan etkisini ölçmede, A. Ü. Ziraat Fakültesine ait, 10 aylık, Leghorn, Newhempshire ve melez (CornishxLeghorn) tavuklarından istifade edilmiştir. Aşılardan 15 gün önce ve aşından 15 gün sonraya kadar olmak üzere, her üç ırk tavuk gruplarının yumurtalarının ortalaması alınmıştır.

Hücre: Roakin Newcastle virusunu üretmek ve pasajlarını yapmak için, Japonyadan temin edilen, Stabil Maymun (MS) böbrek hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, 4 x 11 cm. boyutlarındaki şişelerde üretilmiş ve üretme besisi yeri olarak da % 10 dana serumlu Hanks-

Laktalbumin kullanılmıştır. Virus ekimlerinde ve hücre idamesinde, serum oranı % 2 ye indirilmiştir (1).

Virus Ekimi: Hücreler şişelerin tabanını tek tabaka (monolayer)-halinde kapladıktan sonra ılık buffer solusyonu ile 3 defa yıkandılar. Bir önceki pasaj sıvısından (virus materyali), her şişeye 1 cc. miktarında ekim yapıldı ve şişeler 30 dakika müddetle adsorbsiyon için 37°C. derecelik etüve konuldular. Bu zamanın sonunda % 2 inaktif dana serumu ihtiva eden, 9 cc. besi yeri ilave edildi ve ağzları iyice kapatıldıktan sonra tekrar etüve bırakıldılar.

Hücrelerde, virusdan ileri gelen sitopatik (CP) değişmeleri iyice görebilmek ve takip edebilmek için, hücreler her gün, sabah ve akşam, mikroskop altında kontrol edildiler. Hücrelerde % 75-85 dejenerasyon meydana geldiği zaman, şişeler -20°C dereceye konuldular.

Her pasaj sonu alınan virus materyalleri, PPLO (Pleuropneumonia-Like Organizma), acrob ve anaerob mikroorganizmalar yönünden uygun besi yerlerine ekilerek kontrol edilmişlerdir.

Virus Titresinin Tayini: Virusların, buffer solusyonu içinde 10^{-1} den başlayarak, 10^{-10} a kadar, 10 katlı sulandırılmaları yapıldı. Her bir dilisyonundan, 9 günlük kuluçkalanmış 4 adet embryonlu yumurtanın allantois boşluğuna, aşı virusundan 0.2 cc. ve patogen virusdan ise 0.1 cc. miktarlarında ekimler yapıldı. Yumurtalar rutubetli etüve (37°C . derece) bırakıldılar ve her gün sabah ve akşam olmak üzere günde iki defa canlılık kontrolleri yapıldı. İkinci günden itibaren ölen yumurtalar buzdolabında (+4°C. derece) 2-3 saat tutulduktan sonra usulüne göre açıldı ve allantois - amnion sıvıları alındı. Lâm üzerinde yapılan çabuk hemaglutinasyonla, virusun varlığı tesbit edildi. Gerek patogen ve gerekse aşı virusunun, yüzde elli embryo letal dozları, Reed ve Muench (27) metoduna göre tayin edilmiştir.

Serolojik Yoklamalar: Roakin ve patogen newcastle viruslarının Hemaglutinasyon (HA) ve serumların Hemaglutinasyon -İnhibisyon (HAİ) titreleri, Cunningham (12) tekniğine uyularak yapılmıştır.

Piliçleri Aşılama: Roakin newcastle virusu (20. pasaj) steril fizyolojik su ile 1 : 100 oranında sulandırılarak, I. grupta bulunanlara 0.2 cc. ve II. gruptakilerine de 0.4 cc. miktarlarında, göğüs kası içine, şırınga edilmiştir. III grup, aşılanmamış, kontrol olarak bırakılmıştır.

Eprüve: Piliçler aşılandıktan 15, 90(3 ay) ve 180 (6ay) gün sonra olmak üzere 3 eprüvasyona tabi tutulmuşlardır. Her eprüveden önce, gruplardan, (rastgele) 4 er tane hayvanın kanat altı venasından kan alınarak HAİ testine tabi tutulmuştur. Eprüve için patogen virusdan

hayvanların göğüs kası içine 0.5 cc (10000 ELD₅₀/0.5 cc.) şırınga edildi ve her gruptan 3 hayvan denemeye sokuldu.

Sonuçlar

Roakin Newcastle virusu, maymun böbrek hücrelerine kolayca adapte olmuş ve üremiştir. İlk pasajlarda virus 6 cı gün % 70 - 80 hücre dejenerasyonu meydana getirmesine karşılık, 18 - 19 uncu pasajlarda bu süre, 5 inci güne inmiştir. Hücrelerin tam dejenerasyonu beklemeden, hücreler ve vasat alınmış ve böylece termal inaktivasyon oranı asgari limitlere indirilmiş ve inokulumlarda aktif virus miktarı yüksek oranda tutulmuştur. Patogen etlik virusunun yüzde elli embryo letal dozu $10^{-8.5}$ / 0.1 cc., Roakin aşı virusunun ise $10^{-5.5}$ / 0.2 cc bulunmuştur.

Meydana gelen hücre dejenerasyonlarının şekli bakımından, ilk pasajlarla son pasajlar arasında bir fark görülememiştir. Hücrelerde, genel olarak, virusun etkisi ile yuvarlaklaşmalar, stoplazmalarında büzülme meydana gelmekte ve hücreler arası boşuklar artmaktadır. Ölen hücrelerin şişelere olan bağlantıları kopmakta ve vasata düşmektedirler. Böylece, monolayer üzerinde gözle görülebilecek derecede büyük hücre aralıkları meydana gelmektedir.

Hayvanlar aşılanmadan önce, rastgele 6 tanesinden kan alınarak, Newcastle virusuna karşı passif Hemaglutinin durumları, HAI deneyi ile kontrol edildi ve hepsi negatif bulundu. Hemaglutinin titrilerinin tayininde Beta-usulu kullanıldı ve virus, 2 HA Ünitesinde (1/80) sabit tutuldu.

Aşılandıktan 14 gün sonra (1. eprüveden bir gün önce), her gruptan rastgele 4 hayvan tutularak kanları alındı ve Hemaglutinin antikorları yönünden teste tabi tutuldu. Bu defa alfa - üsulü kullanıldı. Serumları muayene edilen 12 hayvandan, kontroller hariç olmak üzere, I ve II. grup hayvanlar pozitif titre gösterrdiler. Kontrollerin hepsi negatif bulunmuştur.

I. Eprüvasyon:

Birinci eprüve, aşılamadan 15 gün sonra uygulanmıştır. Kanı alınan hayvanlar, eprüve üzerinde fena etki yapar düşüncesi ile, denemeye sokulmamışlardır. Eprüveye her gruptan (I., II., ve III.) 3 er hayvan iştirak ettirilmiştir ve patogen virusdan, göğüs kası içine 0.5 cc. (10000 ELD₅₀ / 0.5 cc.) şırınga edilmiştir. Alınan sonuçlar tabelâ - 1 de gösterilmiştir.

TABELÂ-1

I. Eprüvenin Sonuçları						
Gruplar	Aşı Miktarı	Oran	Ölen	Kalan	Ölüm %	Koruma %
I. Grup	(0.2 cc. aşı)	2/3	2	1	66.6	33.3
II. Grup	(0.4 cc. aşı)	0/3	0	3	0	100
III. Grup	(Kontrol)	3/3	3	0	100	—

Eprüveden sonra ilk ölümler 4. gün başlamış ve 8 gün içinde son bulmuştur. Çizelgeden de anlaşılacağı üzere, 0.2 cc. aşı verilen I. grupta 3 hayvandan ikisinin ölmesine (% 66.6), bir tanesinin canlı kalmasına karşılık, 0.4 cc. aşı verilen II. grupta ise hiç bir hayvan ölmemiştir. Halbuki, Kontrollerin hepsi (% 100) ölmüştür. Bu durum, 15 günlük çok kısa bir süre içinde, 0.4 cc. aşı virusunun, 0.2 cc. ye nazaran daha erken ve kuvvetli bağışıklık verdiğini göstermektedir.

II. Eprüvasyon (3 ay sonra):

Eprüveden bir gün önce her gruptan rastgele, 4 hayvandan kan alındı ve hemaglutinin antikorları yönünden teste tabi tutuldu. Yapılan HAI testinde (alfa - usulü) kontroller hariç, diğer I. ve II. grup hayvanlarında hemaglutinin tesbit edilmiştir. Kontroller ise negatif bulunmuştur.

Bu eprüveye de aynı şekilde, her gruptan 3 hayvan iştirak ettirilmiş ve bir gün önce kanı alınan hayvanlar konulmamıştır. Hayvanlara, aynı miktar patogen virus şırınga edilmiş ve alınan sonuçlar tabelâ -2 de gösterilmiştir.

TABELÂ-2

II. Eprüvasyonun Sonuçları						
Gruplar	Aşı miktarı	Oran	Ölen	Kalan	Ölüm (%)	Koruma (%)
I. Grup	(0.2 cc. aşı)	0/3	0	3	0	100
II. Grup	(0.4 cc. aşı)	0/3	0	3	0	100
III. Grup	(Kontrol)	3/3	3	0	100	—

Bu eprüvede kontroller 4. gün ölmeğe başladılar ve 3 gün içinde hepsi ölmüştür. Buna karşılık aşıllara hiç bir şey olmamıştır. Her iki grupta da (0.2 cc ve 0.4 cc.) iyi bir bağışıklık meydana gelmiş ve koruma % 100 olmuştur.

III. Eprüvasyon (6 ay sonra):

Eprüveden bir gün önce, aynı tarzda, her gruptan rastgele 4 hayvandan kan alınarak, hemaglutinin yönünden teste tabi tutuldular.

Aşılı olan (6 ay önce) I. ve II. grup hayvanların kanlarında bu uzun süre içinde hamaglutininler düşmüş ve negatif sonuç vermişlerdir. Kontroller ise tam olarak negatif idiler.

Eprüveye her gruptan 3 hayvan iştirak ettirilmiş ve aynı miktar patojen virus şırınga edilmiştir. Sonuçlar tabelâ - 3 de gösterilmiştir.

TABELÂ-3

III. Eprüvasyonun Sonuçları						
Gruplar	Aşı miktarı	Oran	Ölen	Kalan	Ölüm (%)	Koruma (%)
I. Grup	(0.2 cc. aşı)	0/3	0	3	0	100
II. Grup	(0.4 cc. aşı)	0/3	0	3	0	100
III. Grup	(Kontrol)	3/3	3	0	100	—

Aşıdan 6 ay sonra, hayvanların kanlarında hamaglutininin antikorları tesbit edilememesine rağmen, aşıları hayvanlar, patojen virusun 10000 ELD₅₀ / 0.5 cc. sine karşı mukavemet göstermişlerdir. Buna karşılık hiç aşılanmamış ve HAI testi, aynı şekilde, negatif olan kontroller tamamen ölmüşlerdir.

Eprüveye alınan hayvanlar 20 gün gözlenmişler ve bundan sonra dışarı çıkarılmışlardır. Ölen hayvanların otopsilerinde Newcastle tesbit edilmiştir.

Roakin Newcastle virusunun maymun böbrek hücrelerinde 20 pasajı yapılarak elde edilen modifiye virus, piliçlerde, 0.2 cc. ve 0.4 cc. miktarlarında 6 ay gibi uzun bir süre bağışıklık vermiştir. Eprüve dozunun yüksek tutulması sonunda alınan bu sonuçlar, aşının değeri ve immunizasyon kudreti bakımından önem taşımaktadır. Her ne kadar 15 günlük eprüvede, 0.2 cc. aşı miktarı, 0.4 cc. aşı'ya nazaran daha az bir koruma sağladığı ortaya çıkmışsa da, tavuklar, tabii şartlarda bu kadar yüksek dozla ve bir defada enfekte olma ihtimalleri çok zayıftır. Diğer bir deyimle, hayvanlara şırınga edilen 10000 ELD₅₀ / 0.5 cc. miktarı hattı zatında yüksek bir enfeksiyon dozudur. Bu bakımdan, 0.2 cc. lik aşı, tabii koşullarda bulunan hayvanları koruyabilir niteliktedir.

Aşının yumurtlayan tavuklarda yumurta üzerine olan etkisini tesbit etmek için, leghorn, Newhempshire ve melez (Cornishxleghorn) tavuklarına, 1/100 sulandırılmış olan virusdan 0.2 cc. intramuskular olarak verilmiştir. Şırıngadan 15 gün önce alınan yumurta ortalamaları ile, 15 gün sonraya kadarki ortalamalar arasında hemen hemen hiç bir fark bulunamamıştır. Alınan sonuçlar tabela - 4 te gösterilmiştir:

TABELÂ-4

Aşının Yumurta Prodüksiyonu Üzerinde Etkisi		
Tavuk Irkları	Aşıdan 15 gün önceki ortalama	Aşıdan 15 gün sonra-ya kadar ortalama
Leghorn	24.6	25
Newhempshire	52.7	48.2
Melez (Cornish x Leghorn)	118	117.8

Doku kültüründen elde edilen aşının, yumurta prodüksiyonu üzerine her hangi bir zararlı etkisi tesbit edilememiştir.

Tartışma

Roakin Newcastle virusu çeşitli hücrelerde (HeLa, Hep- 2, İnsan kalp, tavuk embryo fibroblast ve sığır embryo börek hücreleri) kolaylıkla üretilmiş (18) ve aynı virus, maymun böbrek hücrelerinde adaptasyon güçlüğü göstermeden üremiştir.

Newcastle viruslarının hücreler üzerinde seri pasajlarını yaparak modifiye suretile, araştırmacılar tarafından iyi immunité sağlayan aşılarda elde edilmiştir. Bankowski (4), Calif 11914 Newcastle suşunu tavuk fragmant kültürlerinde seri pasajlarını yaparak bir aşı hazırlamıştır. Aşı, piliçlere intramusküler veya intravenöz verildiğinde yüksek bir bağışıklık vermiştir. Bankowski ve ark. (5,6), Bankowski ve Corsvet (7), doku kültürlerinde modifiye ettikleri newcastle virusu ile yaptıkları bağışıklık denemelerinde iyi sonuçlar aldıklarını, aşılılardan kontrollere virusun bulaşmadığını ve aşıdan ileri gelen herhangi bir semptomla tesadüf etmediklerini bildirmişlerdir. Aynı şekildeki çalışmalar Gale ve ark. (17) tarafından da yapılmıştır.

Denemelerimizde, Roakin virusunun, maymun böbrek hücrelerinde üretilerek yapılan 20 pasajı sonunda elde edilen aşı virusu, piliçleri 0.2 cc. ve 0.4 cc. miktarında 6 ay bir süre, patogen virusun 10000 ELD₅₀ sine karşı korumuştur. Her ne kadar 15 günlük eprüve de, 0.2 cc. aşı, 0.4 cc. aşı kadar bir bağışıklık vermedi isede, 3 ve 6 ay sonra yapılan eprüvelerde her ikisi de aynı dercede bulunmuştur.

Bu çalışmada ortaya çıkan bir önemli nokta da, aşıları hayvanların serumlarında, 6 ay sonra, hemaglutininer pozitif seviyenin altında (1/80, 1/40 ve 1/20) olmalarına rağmen, patogen virusa karşı mukavemet göstermeleridir. Nitekim, buna benzer denemeler, Bankowski(4) tarafından da izlenmiştir. Araştırmacı, HAI titresi, 1/80 olan piliçlerin intramusküler yolla patogen newcastle virusunun 200.000 embryo Minimal Letal Doz'una (mld) tahammül ettiklerini ve 1/40 titre göste-

renlerin ise % 95 inin aynı derecede yüksek bir bağışıklığa sahip olduğunu müşahade etmiştir.

Doku kültürü aşlarının, hayvanlarda yüksek bir immunité göstermesi, yumurta üretimini etkilememesi, aşı virusunun etrafa bulaşma ihtimalinin olmaması, hazırlanmalarının kolay olması ve kanatlılar için her hangi bir patojen etkene sahip olmaması bakım-larından, yumurtadan elde edilenlere tercih edilmelidirler.

Ö z e t

Roakin Newcastle virusunun maymun böbrek hücrelerinde 20 pasajı yapılmış ve elde edilen sıvı aşı materyali olarak kullanılmıştır. Virusun hücrelere adaptasyonunda herhangi bir güçlük görülmemiştir. Virus % 1 oranında sulandırılarak hayvanlara 0.2 - 0.4 cc. miktarında intramuskuler olarak verilmiştir. Eprüveler, patojen virusun 10.000 ELD₅₀ / 0.5 cc. ile yapılmıştır. Her iki doz aşı ile aşılanmış hayvanlar 6 aylık süre içinde bağışık bulunmuştur.

Aşının yumurtlayan tavuklara tatbikinde, yumurta verimine hiç bir kötü etkisi görülmemiştir.

S u m m a r y

Studies on the Immunogenic Values of the Newcastle Virus (Roakin Strain) grown in Monkey Kidney Cells (MS)

The Virus was subcultured 20 times in monkey kidney cells without any difficulties. Virus material, in 0.2 ml and 0.4 ml quantities was inoculated by i. m. route. Animals were challenged against the 10000 ELD₅₀/0.5 ml dose of the pathogenic virus strain. The animals vaccinated with two different doses of the vaccine strain were found immune in a period of 6 months.

Reduced egg production were not observed after vaccination of layinghens.

Teşekkür: Mesainin yapılmasında yardımcıları dokunan Müt-hassis adayı Sevim Güneri, Selahattin Can ve Yavuz Kurtul'a teşekkürlerimizi sunarız.

L i t e r a t ü r

- 1- Arda, M. 1959. *Doku Kültürü Laboratuvar Metodları*. A. Ü. Vct. Fak. Yayın No. 107, Tatbikat Kılavuzu : 1

- 2- **Bankowski, R. A.** 1957. *A Modified Live Newcastle Disease Virus Vaccine.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96: 114 - 118.
- 3- **Bankowski, R. A., and Hyde, J.** 1957. *Cultivation and Cytopathogenicity of Newcastle Disease Virus in Hela and Bovine Kidney Cell Culture.* Am. J. Vet. Res., 18: 743 - 746.
- 4- **Bankowski, R. A.** 1958. *A Tissue Culture Modified Newcastle Disease Virus. I. Modification, Propagation and Characteristics of the Tissue Culture Newcastle Disease Virus.* Avian Dis., 2: 197 - 209.
- 5- **Bankowski, R. A., Corstvet, R., and Fabricant, J.** 1958. *A Tissue Culture-Modified Newcastle Disease Virus. II-Immunogenicity of the Live Tissue Culture - Modified Newcastle Disease Virus in Chickens.* Avian Dis., 2 : 227 - 240.
- 6- **Bankowski, R. A., Corstvet, R., and Fabricant, J.** 1958. *A Tissue - Culture Modified Newcastle Disease Virus III. The Immunity Induced by the Modified Virus and Crystal Violet Inactivated Vaccines in Laying Birds.* Avian Dis., 2: 466 - 495.
- 7- **Bankowski, R. A., and Corstvet, R.** 1960. *Immunity and the Reproductive Tract of Laying Hens Vaccinated With the Tissue - Culture Newcastle Disease Vaccine.* Am. j. Vet. Res., 21: 610 - 617.
- 8- **Başkaya, H.** 1969. *Kümes Hayvan Hastalıkları Ders Notları.* Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Bak. ve Salgınlar Kürsüsü.
- 9- **Beaudette, F. R., Bivins, J. A., and Miller, B. R.** 1949. *Newcastle Disease Immunization with Live Virus.* Cornell Vet., 39: 302 - 334.
- 10- **Burmester, B. R., and Waters, N. F.** 1955. *The role of the Infected Egg in the Transmission Visceral Lymphomatosis.* Poult. Sci., 34: 1415 - 1429.
- 11- **Chanock, R. M.** 1955. *Cytopathogenic Effect of Newcastle Virus in Monkey Kidney Cultures and Interference with Poliomyelitis Viruses.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89: 379 - 381.
- 12- **Cunningham, C. H.** 1952. *A Laboratory Guide in Virology.* Burgess Publishing Company. Revised Ed.
- 13- **Ditchfield, J., and Julian, R. J.** 1958. *A case Report Egg - Borne Pullorum Infection in Adult Hens.* Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 22: 181 - 183.
- 14- **Fabricant, O., and Levine, P. R.** 1951. *The Persistence of Infectious Bronchitis Virus in Eggs and Tracheal Exudates of Infected Chickens.* Cornell Vet., 41: 240 - 246.

- 15- **Fabricant, J.** 1955. *The Present Status of Killed Vaccine in the Control of Newcastle Disease.* Proceedings A. V. M. A., 92 th Annual Meeting, 326 - 329.
- 16- **Fahey, J. E., and Crawley, J. F.** 1954. *Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. III. Egg Transmission of Pleuropneumonia-Like Organisms.* Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 18: 67 - 75.
- 17- **Gale, C., Gard, D. I., Ose, E. A., and Berkman, R. N.** 1965. *Evaluation of a Tissue - Culture Newcastle Disease Vaccine.* Avian Dis., 9: 348 - 358.
- 18- **Gelenczei, E., and Bordt, D.** 1960. *Studies of Newcastle Disease Virus Strain in Various Cell Cultures.* Am. J. Vet. Res., 21: 987 - 991.
- 19- **Hall, W. J., Legenhausen, D. H., and McDonald, A. D.** 1949. *Studies on Fowl Typhoid. I. Nature and Dissemination.* Poult. Sci., 23: 344 - 362.
- 20- **Hofstad, M. S.** 1953. *Immunization of Chickens Against Newcastle Disease by Formalin Inactivated Vaccine.* Am. J. Vet. Res., 14: 586-589.
- 21- **Johnson, E. P.** 1955. *The Results from Various Methods of Administering B₁ Newcastle Disease vaccine.* Proceedings A. V. M. A., 92 th Annual Meeting. 329 - 330.
- 22- **Kohn, A., and Goldwasser, R.** 1957. *Multiplication of Newcastle Disease virus in Embryo Tissue Culture.* Proc. Soc.^o. Exp. Biol. Med., 96: 198 - 200.
- 23- **Legenhausen, D. H., and Sinkiewicz R. J.,** 1959. *Studies of Newcastle Disease. II. Evaluation of Two Killed Newcastle Disease Vaccine.* Avian Dis. , 3: 3 - 11.
- 24- **Legenhausen, D. H., Sinkiewicz, R. J., and Sullivan, J. F.** 1959. *Studies of Newcastle Disease. III. Further Studies of a Killed Newcastle Disease Vaccine.* Avian Dis., 3: 12 - 22.
- 25- **Mason, E. J., and Kaufman, N.** 1955. *Newcastle Disease Virus in Cultures of Chick Embryo Tissues. Its Multiplication, Titration and Cytopathogenicity.* Am. J. Pathol., 31: 883 - 900.
- 26- **Prier, J. E., Millen, T. W., and Alberst, J. O.** 1950. *Studies on Newcastle Disease. IV. The Presence of Newcastle Disease Virus in Eggs of Hens Vaccinated With Live Vaccine.* J. Amer. Vet. Med. Asso., 116: 54 - 55.
- 27- **Reed, L. J., and Muench, H.** 1938, *A Simple Methods of Estimating Fifty Percent Endpoints.* Am. J. Hyg., 27: 493 - 497.

- 28- **Simmins, G. B., and Baldwin, B. A.** 1963. *Studies on Beta-Propiolactone Inactivated Newcastle Disease Vaccine.* Res. Vet. Sci., 4: 286 - 293.
- 29- **Waller, E. F., and Gardier, M. R.** 1953. *Newcastle Disease. Response to Formalized Vaccine.* Poult. Sci., 32: 405 - 411.
- 30- **Winmill, A. J., and Weddell, W.** 1961. *A Newcastle Disease Vaccine Inactivated by Beta-Propiolactone.* Res. Vet. Sci., 2: 381 - 386
- 31- **Yetes, V. J., and Fry, D. E.** 1957. *Observation on a Chicken Embryo Lethal Orphan (CELO) Virus.* Amer. J. Vet. Res., 18: 257 - 260.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 18.7.1969 günü gelmiştir.