

NEWCASTLE HASTALIĞINA KARŞI AŞILAMA DENEMELERİ

1- Hitchner B1 aşı virusunun içme suyuna katılarak uygulanması sonu tavuklarda oluşan bağışıklık durumu.

Birsen Akçadağ¹ Mustafa Arda² Nejat Aydın³ Ömer Akay⁴
Müjgan İzgür⁵

Newcastle disease vaccination studies.

1- Immune response of chickens vaccinated with B1 virus administered through the drinking water.

Summary: *In this study, NVD vaccine B1 strain (Weybridge origin) was used and the virus supplied by Etlik Microbiology Institute. This virus was grown in 9 days embryonated eggs. The other viruses, such as Roakin and velogenic strains, were obtained from Microbiology Department. The titers of the viruses were calculated by the method described by Reed and Muench.*

Two hundred 22 days olds hibrid chickens were divided into two groups of 150 and 50 each. The animals in first group were vaccinated with B1 strain twice when they were 22 and 45 days of age. Second group was kept as control (non vaccinated) throughout the experiment. Animals will be vaccinated were deprived of water for approximately 4 hours prior to vaccination and the vaccine was given in quantities of water that would be consumed in less than an hour. Each chicken was allowed to drink water containing 10^7 EID₅₀ vaccine virus. After administration, vaccinated and non vaccinated animals were housed in a well separated place.

The HI test was performed using 8 HA units of live Roakin virus. The mean log₂ HI titers of chickens were calculated.

-
- 1- Uz. Veteriner Hek., Pendik Vet. Kont. Araşt. Enst., Pendik, İstanbul.
2- Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
3- Doç. Dr., " " " "
4- Doç. Dr., " " " "
5- Dr., " " " "

All animals were challenged intramusulary using velogenic strain in dose of 10^5 ELD₅₀ / 0.1 ml.

It was observed that chickens vaccinated by drinking water administration protected against intramuscular challenge in high dose of velogenic strain. There was close correlation between the mean log₂ titer and the protection obtained from immunity test. The animals had titer ≥ 8 resisted experimental infection and remained healthy. In contrast to this, non vaccinated animals were all died of challenge.

Özet: *Bu çalışmada kanlarında negatif düzeyde maternal antikor içeren ve HBI virusu sularına katılmak suretiyle 2 kez aşıl原因an hayvanlarda bağışıklık durumu, HI ve eprüvasyon testleriyle incelenmiştir.*

Denemelerde, 22 günlük 200 adet Danimarka orijinli piliç kullanılmıştır. Hayvanlar aşılama denemeleri için iki gruba ayrılmıştır (150 adet aşılama grubu, 50 adet aşısız kontrol grubu). Aşılama grubunda bulunan 150 piliç 22 ve 45 günlük günlük iken iki kez içme suyu ile aşılanmışlardır ($10^{7.0}$ ELD₅₀ /1 ml).

Deneme süresince 4 HI testi yapılmıştır. Bu test sonuçlarına göre, aşılama öncesi 2 log₂ 4.0 olan titrenin birinci aşından 15 gün sonra 7.4'e, ikinci aşından 15 gün sonra 7.7 ye ve eprüvasyondan önce ise 8.5'a yükseldiği gözlenmiştir.

Bağışıklık kontrolü, hayvanlar 90 günlük oldukları zaman velojenik NC virusu yüksek dozu ile uygulanmıştır (100.000 ELD₅₀ /0.1 ml). Aşılanan grupta % 92 oranında bir korunma gözlenirken, aşısız kontrol grubunda bulunan 50 hayvanın tamamının öldüğü ve alınan sonuçlara göre, HI titre değerleri ile bağışıklık ile kontrolü arasında bir korelasyonun bulunduğu ortaya konulmuştur.

Giriş

Newcastle hastalığı kanatlı hayvanların çok bulaşıcı ve öldürücü viral bir infeksiyonudur. Ülke çapında yapılan kontrol programlarına karşın, hastalık bazen epidemik bir tarzda seyrederek büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Bu infeksiyonu kontrol altında tutabilmek için, Newcastle viruslarının lentojenik (BI,F, LaSota) ve mezojenik (Roakin, Mukteswar, MK-107) suşlarından canlı aşılar hazırlanmış ve bunlar burun-göz

(11,12,26,27), aerosol (15,18,32), kas içi (7,8,10,34), içme suyu (29, 35,36,37), kloakal yolla (5) ve kanat zarına batırmak (9,24,25) suretiyle kullanılmışlardır. Ayrıca, velojenik suşların formol (1,20), beta-propiolakton (16,17), kristal violet (6,23) ve ultraviole ışınları (23) yardımıyla inaktive edilmeleriyle hazırlanan ölü adjuvantlı aşılar da pratikte denenmiştir.

Civcivlik çağındaki aşılamalarda, dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de canlı HB1 lentojenik Newcastle virusu kullanılmaktadır (2,11,12). Bu aşı suşu virulensinin düşük olması, aşı reaksiyonunun bulunmaması ve iyi bir bağışıklık sağlaması gibi nedenlerle yaygın bir uygulama alanı bulmuştur (3,11,15,26,27). Ancak, hazırlama ve uygulama yöntemlerinin değişik olmasından, aşılama dozundan, maternal antikorlar ve diğer faktörlerden (kümes, bakım-besleme, infeksiyonlar. vb.) kaynaklanan ve bağışıklığa etkileyen bazı olumsuz yönleri de saptanmıştır (3,14,19,22,32). Bu faktörlerin giderilmesi gerekmektedir.

Yeterli bir bağışıklık vermesi ,hayvanları hırpalamadan ve stres yaratmadan uygulama kolaylığı sağlaması, kısa süre içinde çok sayıda hayvanı aşılamanın mümkün olması ve post vaksinal komplikasyonlar oluşturmaması gibi nedenlerle, son yıllarda içme sularına aşı virusu katmak suretiyle yapılan aşılama tekrar güncellik kazanmıştır. Nitekim, İbrahim ve ark. (21), lentojenik V4 ile hazırladıkları içme suyu aşısını 1. ve 21. günlerde kullanarak yaptıkları denemelerde, hayvanların 35 günlük iken 1. eprüvasyona % 100;49 günlük iken 2. eprüvasyona % 90 ve 77 günlük iken yapılan bağışıklık denemesine de % 100 direnç gösterdiklerini ve Stoneuscu ve ark. (30), HB1, virusunu içme sularına katarak 12.000.000 broyleri 2 kez aşımışlar, birinci aşılama sonrası bağışıklığın % 90-100, 2. aşılama sonrası ise bağışıklığın % 100 olduğunu saptanmışlardır. Woernle ve Scholtyssek (37), HB1 virusunu içme suyuna katarak 12 günlük civcivler üzerinde yaptıkları denemelerde, aşılama sonrası 48 gün sonra HI titrelerine ve eprüvasyon sonuçlarına dayanarak bu aşılama tarzının iyi bağışıklık verdiğini bildirmişlerdir. Sipahioğlu (29), lentojenik diğer bir aşı virusu olan F suşunu içme sularına katmak suretiyle hazırladığı aşının hayvanları yumurta dönemine kadar koruyabildiğini ve aşılama sonrası 12. günden itibaren antikorların yeterli düzeye ulaştığını ve Akat ve ark. (2), B1 suşunu içme suyuna katılması suretiyle aşılama sonrası, hayvanlarda herhangi bir stres meydana getirmediğini ve aşılama sonrası 15 gün sonra kuvvetli bir bağışıklığın oluştuğunu açıklamışlar-

dır. Winterfield ve ark. (33), 31.300 hayvan üzerinde yaptıkları içme suyu aşı denemelerinde, HB1 virusunun hayvanları koruyabileceği ve hayvanların kanında yüksek titrede antikor oluşturabileceğini ve Van Waveren ve Zuizdamx (31), içme suyu aşılmasının hayvanlarda 2.5-4.5 ay kadar bir koruma sağladığını yaptıkları çalışmalarda ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada, sularına HB1 aşı virusu katılarak iki kez aşılana, maternal antikorlara sahip olmayan hayvanlarda oluşan bağışıklığın durumunu, hemaglutinasyon-inhibisyon ve eprüvasyon testleriyle ortaya koymak, amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Viruslar

Aşı virusu: Aşılamada, Weybridge orijinli Newcastle HB1 aşı virusundan yararlanılmıştır. Kullanılmadan önce, virusun HA titresi 1/512 ve embriyodaki % 50 infektif titresi $10^{-8.5}$ /0.1 ml olarak belirlenmiştir. Aşı dozu, bu son titre üzerinden hesaplanmıştır.

Eprüve virusu: Aşılı ve aşısız (kontrol) hayvanların bağışıklık kontrollerinde Türkiye (Ankara) orijinli velojenik Newcastle hastalığı virusu kullanılmıştır. Bu virusun HA titresi 1/256 ve embriyodaki % 50 letal titresi de $10^{-8.0}$ olarak saptanmıştır. Eprüvasyonda virus, hayvanlara kas içi $10^{-5.0}$ ELD₅₀/0.1 ml miktarında verilmiştir.

Roakin virüsü: Mezojenik olan bu virus hemaglutinasyon (HA) ve hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) testlerinde kullanılmıştır.

Yumurtalara yapılan inokulasyonlarda (13) ve virusların titrelerinin tayininde (28) standart yöntemlerden yararlanılmıştır.

Piliçler

Denemelerde, koruyucu düzeyde antikor içermeyen 22 günlük 200 adet Danimarka orijinli aşısız melez (Leghorn x Newhampshire) piliçlerinden yararlanılmıştır. Hayvanlar, deneme sonuna kadar, Yem Sannayii'nin yemi ile beslenmişler ve aynı deneme koşullarında bulundurulmuşlardır.

Piliçlerin 150 adedi aşılansız ve geriye kalan 50 adedi aşılansızın kontrol olarak ayrı bir bölmede muhafaza edilmiştir.

Aşılamalar

Piliçler, bu denemede, HB1 virusu ile iki kez aşılanmışlardır. Bunlarda,

1. *aşılama*: Hayvanlar 22 günlük oldukları zaman ilk aşıları yapmıştır. Aşı virusu (HB1), her hayvan için $10^{7.0}$ EID₅₀ /1 ml olacak tarzda hesaplanmış ve iyi kalitedeki su ile karıştırılarak plastik suluklar içinde verilmiştir. Suya, aşı virusu ile birlikte % 2 oranında yağsız süt tozu katılarak homojenizasyon sağlanmıştır.

Aşı verilmeden önce, hayvanlar 4 saat kadar susuz bırakılmışlardır.

2. *aşılama*: Hayvanlar 45 günlük oldukları zaman, aynı virusla ve benzer tarzda ikinci aşılamaları yapılmıştır.

Hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) testleri

Deneme süresince hayvanlara 4 HI testi uygulanmıştır (4).

1. *HI testi*: Maternal antikorları saptamak için, hayvanlar 20 günlük iken 1. HI testi uygulanmıştır. Tesadüfi örnekleme yöntemi ile ile seçilen 20 hayvanın serumu kullanılmış ve ortalama \log_2 HI titreleri belirlenmiştir.

2. *HI testi*: Birinci aşılamadan 15 gün sonra, 20 serumla,

3. *HI testi*: İkinci aşılamadan 15 gün sonra, 20 serumla ve

4. *HI testi*: Epruvasyondan iki gün önce (hayvanlar 88 günlük iken) 20 aşı ve 20 aşısız hayvan serumu ile yapılmıştır.

Epruvasyon

Hayvanlara bağışıklık kontrolü, 90 günlük oldukları zaman yapılmış ve epruvasyonda velojenik suşun yüksek dozu (100.000 ELD₅₀ / 0.1 ml) kas içi olarak verilmiştir.

Klinik ve otopsi gözlemleri

Epruve edilen aşı ve aşısız hayvanlar 15 gün klinik gözlem altında tutulmuş, klinik bulgular kaydedilmiş ve ölenlere otopsi yapılarak makroskopik bozukluklar belirlenmiş ve virus izolasyonu için gerekli materyal alınmıştır.

Bulgular

HI test bulguları

1. *HI testi*: Maternal antikorları saptamak amacı ile yapılan bu testte, 20 hayvanın kan serumunun Newcastle'a karşı inhibe edici antikorlar taşımadığı anlaşılmıştır. Testte, hayvanların ortalama \log_2 HI titreleri 4 olarak belirlenmiştir.

2. *HI testi*: Birinci aşılardan 15 gün sonra yapılan bu testte, 20 serumun ortalama \log_2 titresi 7.4 olarak saptanmıştır. Serumların 16 tanesinin titresi ≥ 7 ve 4 tanesi de ≤ 6 olarak belirlenmiştir.

3. *HI testi*: İkinci aşılardan 15 gün sonra yapılan bu testte, kullanılan 20 serumun ortalama \log_2 HI titresi 7.7 olarak tespit edilmiştir. Bu serumlardan 18 tanesi ≥ 7 ve 2 tanesi de ≤ 6 olarak bulunmuştur.

4. *HI testi*: Eprüvasyondan 2 gün önce uygulanan HI testinde aşılların ortalama \log_2 HI titresi 8.5 olarak bulunmuş ve bütün serumların titreleri 7 ve 7 nin üzerinde toplanmışlardır. Aşısız hayvanların titresi 4.0 olarak saptanmıştır.

HI testlerinin sonuçları ve titrelerinin dağılımı toplu olarak aşağıdaki Tablo-1 de gösterilmiştir.

Tablo — 1: HI testi sonuçları.

Tablo - 1 : HI test sonuçları.

HI Testleri	Serum sayısı	\log_2 HI titreler						Ortalama \log_2 HI titreler	
		$\leq 4^*$	5	6	7	8	9		10
1. HI testi	20	20	-	-	-	-	-	-	4.0
2. HI testi	20	-	2	2	5	8	3	-	7.4
3. HI testi	20	-	-	2	5	10	3	-	7.7
4. HI testi	20	-	-	-	2	8	7	3	8.5
	20**	20	-	-	-	-	-	-	4.0

x: 1/2n, xx: Aşılanmamış hayvanların serumları.

Yukarıdaki çizelgeden kolayca görüleceği gibi, Newcastle virusunu inhibe eden antikorlar yönünden negatif olan hayvanların ilk kez su ile aşılanmaları halinde kanlarındaki antikorların ortalama HI titresi 7.4'e ulaşmakta, ancak titresi 7 ve 7 'nin altında olan 9 seruma karşın

11 serum bu titrelerin üzerinde bulunmaktadır. Birinci aşılama da duyarlı hayvan sayısı yukarıdaki bulgulara göre % 45 civarında bulunmaktadır. İkinci aşılama dan sonra titre yükselmesi açıkça görülmekte ve 88. günde ortalama \log_2 HI titresi 8.5 ulaşmakta ve duyarlı hayvan sayısı 2 ye (titre 7) inmektedir. Buna göre, dirençli hayvan sayısı % 90'a ulaşmış bir durumdadır.

Kontrol hayvanların ortalama HI titresi negatif sınır içinde bulunduğundan bunlar enfeksiyona duyarlı bulunmaktadırlar.

Epruvasyon sonuçları

Bağışıklık kontrolü için denemeye alınan 150 aşı ve 50 aşı olmayan hayvanın yapılan epruvasyon sonucu aşağıdaki Tablo-2 de gösterilmiştir.

Tablo 2: Epruvasyon sonuçları.

	Hayvan sayısı	Ortalama \log_2 titreler	Canlı	Ölen	Koruma oranı (%)
Aşılar	150	8.5	138	12	% 92
Aşısızlar	50	4.0	-	50	0

Bu çizelgede, hayvanların kanında ortalama \log_2 HI titre 8.5 bulunduğu zaman, çok yüksek doza (100.000 ELD₅₀/0.1 ml) direnç göstermesi, ancak titresi 7 olan 2 hayvanın enfeksiyon sonucu ölmesi bağışıklık kontrolü ile HI titre değerleri arasında kuvvetli bir korelasyonun bulunduğu ortaya çıkmaktadır. HI testi ile belirlenen % 90 direnç durumu bağışıklık kontrolünde de aynı hayvanlar arasında % 92 olarak saptanmıştır.

Bu durum, aynı zamanda, epruve dozunun çok yüksek olması halinde, titresi 7 olan hayvanların çok azda olsa hastalanabileceklerini de ortaya koymaktadır. Ancak, doğada hiç bir hayvanın bu kadar yüksek dozu bir defa da alma olanağı bulunmadığı gibi, titresi 7 olan hayvanların ölme ihtimali de pek bulunmamaktadır.

Klinik ve otopsi bulguları

Denemeye konan 200 hayvan, epruvasyondan sonra 15 gün klinik gözlem altında tutulmuşlardır. Hastalananların klinik tablosu (tortikollis, kanat ve bacaklarda felç) ile, ölenlerin makroskopik bozuklukları Newcastle'nın tipik bulgularını göstermişlerdir. Ölenlerden alı-

nan marazi maddeler (dalak, beyin, karaciğer) den hazırlanan emül-siyonların yumurta inokulasyonlarında da patojenik virus izole ve identifiye edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de, Newcastle hastalığı, tavuk yetiştiriciliği yapılan işletmelerde yaygın olduğu için, genellikle, daha iyi bağışıklık veren canlı aşilar tercih edilmiş ve uygulamaya konulmuştur. Ancak, içme suyu ile aşılama programı son iki yıl içinde hazırlanarak pratiğe sunulmuştur.

Lentojenik virusları (HBI gibi), içme sularına katarak bağışıklık denemeleri yapan araştırmacılar (21,30,31,33), aşılamalardan çok olumlu sonuçlar aldıklarını ve hayvanların deneysel ve doğal infeksiyonlara karşı direnç gösterdiklerini açıklamışlardır. Bu çalışmalarında, hernekadar tek bir aşı virusu kullanmışlarsa da, tavukların maternal antikor durumu, yaşı, cinsi, aşılama sayısı, epruvasyon suşu, virulensi, dozu ve uygulama tarzı farklı olmuştur. Buna rağmen, alınan sonuçlar gene de başarılı olmuş ve bağışıklık yüzdesinin yüksek (% 90-100) olduğu bildirilmiştir.

Yukarıdaki araştırmaların sonuçları ile bu denemeden elde edilen bağışıklık oranı (% 90) arasında, büyük bir uyumun varlığı belirlenmiştir.

Ayrıca bazı araştırmacılar (3,11,15,26,27), HBI aşı virusunun herhangi bir stres (büyüme ve gelişmede duraklama, yemden yararlanamama, vs.), infeksiyon veya zararlı etki oluşturmadığını vurgulamışlardır. Bu araştırmada da aynı gözlemlerin doğruluğu ortaya çıkmış ve hayvanlar arasında, içme suyu aşısının kullanımı ile ne aşidan hemen sonra ve nede bunu izleyen haftalarda, herhangi bir olumsuz etkiye raslanılmamıştır.

Ancak, yukarıda bildirilen çalışmalarda, aşılama sonu hayvanlarda oluşan HI titreleri ile bağışıklık testleri arasındaki ilişki, karşılıklı olarak değerlendirilmemiştir. Buna karşın, bu araştırmada bu durum incelenerek aydınlığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Şöyleki, ortalama \log_2 HI titreleri ≥ 8 olan hayvanların velojenik suşun yüksek dozuna (100000 ELD₅₀/0.1 ml) karşı direnç göstermişler, ortalama titreleri ≤ 7 olanların ise öldükleri saptanmıştır.

Bu araştırmanın sonucuna göre, maternal antikor içermeyen hayvanların HBI virusunun içme suyuna katılarak iki kez aşılanmalarının herhangi bir stres yaratmayacağı, iyi ve yeterli bir koruma sağlayacağı ve yüksek dozda uygulanan virulent eprüve suşuna karşı koruyacağı kanısına varılmıştır. Aynı zamanda, HI test sonuçları ile bağışıklık testi arasında yüksek oranda bir paralelliğin varlığında gözlenmiştir.

Literatür

- 1- Akat, K. (1961): *Formol ve beta-propiolakton ile inaktive edilmiş yerli Newcastle virusunun vaksinal ve antijenik değeri üzerinde çalışmalar*. Etlik Vet. Bak. Enst. Derg., 1: 247-263.
- 2- Akat, K., Sipahioğlu, A. ve Berber, R. (1963): *B₁, F, La Sota ve Haifa Newcastle aşı suşlarıyla içme sularına katmak suretiyle immunojen, antijenik ve patojenik tesirlerin mukayesesi*. Etlik Vet. Bak. Enst. Derg., 2: 76-86.
- 3- Allan, W.H., Lancaster, J.E. and Toth, B. (1978): *Newcastle disease vaccines. Their production and use*. Food and Agriculture Organization of the United Nation. FAO, Rome.
- 4- Arda, M. (1970): *Hollanda'da Newcastle hastalığı üzerinde çalışmalar ve HI testinin yeni yöntemine göre değerlendirilmesi*. Vet. Hek. Dern. Derg., 4 (1,2,3): 19-28.
- 5- Arda, M., Başkaya, H. ve Aydın, N. (1971): *Newcastle hastalığına karşı kloakal yolla aşılama üzerine araştırma*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 18 (2): 299-309.
- 6- Bankowski, R., A. Corsvet, 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., 3: 466-495.
- 7- Başkaya, H. ve Arda, M. (1969): *Newcastle Roakin suşu ile doku kültüründe hazırlanan aşının bağışıklık değeri üzerinde denemeler*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 16: 180-190.
- 8- Başkaya, H. ve Arda, M. (1970): *Patojen İsrail Newcastle suşu üzerinde immunolojik ve serolojik araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 17: 35-46.
- 9- Başkaya, H., Arda, M. ve Minbay, A. (1975): *Newcastle-Tavuk çiçeği karma aşısının kanat zarına uygulanması ile oluşan bağışıklık üzerinde araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 22: 135-146.
- 10- Bingöl, M. (1968): *Roakin aşı suşu ile Newcastle aşısının hazırlanması ve 10 yıllık tatbikat neticeleri*. Pendik Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 1: 70-74.
- 11- Bingöl, M. (1978): *Newcastle burun-göz aşısı*. Pendik Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 10: 121-125.
- 12- Bingöl, M. ve Babila, A. (1970): *Newcastle burun-göz aşısı ile meydana gelen bağışıklık üzerinde denemeler*. Pendik Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 3: 100-104.
- 13- Cunningham, C.H. (1973): *A laboratory guide in virology*. 7 th ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota.

- 14- Dorn, P. (1974): *Application and practical problems of NCD vaccination*. Berl. Münch. Tierarztl. Wschr., 87, 3: 254-257.
- 15- Duee, J.P. and Diers, R. (1967): *Vaccination accident after the use of Hitchner B₁ strain as aerosol*. Rec. Med. Vet., 143: 337-342.
- 16- Gill, E. and Stone, H.D. (1960): *Preliminary field test of betapropiolactone killed vaccine*. Avian Dis., 4: 543-544.
- 17- Gill, E. and Stone, H.D. (1964): *Newcastle disease: Immune response in chickens to a beta-propiolactone - killed virus vaccine*. Avian Dis., 8: 61-71.
- 18- Gough, R.E. and Allan, W.,H. (1974): *The potential as an aerosol vaccine of Ulster 2C strain, Newcastle disease virus*. Vet. Rec., 95: 263-265.
- 19- Gramenzi, F. (1964): *Importance of containers for the administration of live Newcastle disease vaccine in the drinking water*. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 18: 679-683.
- 20- Hofstad, M.S. (1953): *Immunization of chickens against Newcastle disease by formalin inactivated vaccine*. Amer. J. Vet. Res., 14: 586-589.
- 21- Ibrahim, A.L., Chulan, U. and Babjee, A.M. (1981): *An assesment of the Australian V4 strain of Newcastle disease virus as a vaccine by spray, aerosol and drinking water administration*. Aust. Vet. J., 57: 277-280.
- 22- Lancaster, J.E. (1964): *Newcastle disease - control by vaccination*. Vet. Bull., 34: 57-76.
- 23- Legenhausen, D.H. and Sinkiewicz, R.J. (1959): *Studies of Newcastle disease. II. Evaluation of two killed Newcastle disease vaccines*. Avian Dis., 3: 3-11.
- 24- Markham, S.F., Cox, R.H. and Bottoff, C.A. (1954): *Newcastle disease: A serological study in vaccination and revaccination*. Cornell Vet., 44: 324-345.
- 25- Nilakantan, P.R., Sakkubai, P.R. and Dhanda, M.R. (1960): *Observation on the effect of immunization of fowls with different vaccine strains of Ranihet (Newcastle) disease virus*. Indian Vet. J., 37: 503-508.
- 26- Raggi, L.G. and Lee, G.G. (1960): *Response of birds to one intranasal vaccination with B1 strain of Newcastle disease virus*. Avian Dis., 4: 187-195.
- 27- Raggi, L.G. and Lee, G.G. (1962): *Further observation on the response of birds to one intranasal vaccination with the B1 strain of Newcastle disease vaccine*. Avian Dis., 6: 297-301.
- 28- Reed, L.J. and Muench, H. (1938): *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*. Amer. J. Hyg., 27: 493-497.
- 29- Sipahioğlu, A. (1970): *Newcastle hastalığına karşı civciv ve piliçlerin püskürtme veya içme suyu vasıtasıyla aşılmalari*. Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg., 3: 40-52.
- 30- Stoneuscu, V., Niculescu, E. and Sandulescu, S. (1972): *Field trails of immunization of broilers aganist NCD through the dirinking water*. Revista de Zooteknie si Medicina Veterinara. 22; 6: 78-84.
- 31- Van Waveren, G.M. and Zuizdamx-D.M.(1955): *Vaccinatie tegen pseudopest (Newcastle) door het mengen von entisfot door het drink water*. Tijdschr. Diergegeesk., 80: 656-685.
- 32- Villages, P. and Kleven, S.H. (1975): *Aerosol vaccination against Newcastle disease. II. Effect of vaccine diluent*. Avian Dis., 20, 2: 260-267.

- 33- Winterfield, R.W., Goldman, C.L. and Seadale, E.H. (1957): *Newcastle disease immunization studies. 4. Vaccination of chickens with B1, F and La Sota strains of Newcastle disease virus administered through the drinking water.* Poultry Sci., 36:1076-1088.
- 34- Winterfield, R.W. and Hitchner, S.B. (1961): *Revaccination of chickens against Newcastle disease by vent, wing-web, and intramuscular routes.* Avian Dis., 5: 18-24.
- 35- Winterfield, R.W. and Seadale, E.H. (1957): *Newcastle disease immunization studies. 2. The immune response of chickens vaccinated with B1 Newcastle disease virus administered through the drinking water.* Poultry Sci., 36: 54-64.
- 36- Winterfield, R.W. and Seadale, E.H. (1957): *Newcastle immunization studies. 3. The immune response of chickens vaccinated at an early age with B1 Newcastle disease virus administered through the drinking water under field conditions.* Poultry Sci., 36: 65-70.
- 37- Woernle, H. and Scholtsek, S. (1972): *NCD immunization of broilers with B1 and La Sota strain live virus vaccines.* Arch. Geflügelkund., 36: 6: 201-206.