

INATIVAÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA-DE-NEWCASTLE PELA BETA-PROPIOLACTONA, ACETILENOIMINA E ETILENOIMINA BINÁRIA¹

MARIA CELESTE GOMES C. DE SOUZA², RAYMUNDO G. CUNHA³ e ARNALDO SOARES LEAL⁴

RESUMO - Estudou-se a ação inativante da BPL da AEI e da EIB sobre a infecciosidade e capacidade hemoaglutinante do vírus da doença-de-newcastle (cepa macapá) contido em líquido alantóide virulento. O inativante era adicionado à suspensão de vírus, incubada à 37°C e uma amostra retirada a determinados intervalos para verificação da esterilidade e títulos infeccioso e hemoaglutinante. A BPL, na concentração de 1:4000, demonstrou poder inativante mais acentuado no período de duas horas de inativação, devendo a inativação ser completa às seis horas e 16 minutos. A AEI empregada na concentração de 0,05% revelou maior inativação por volta de seis horas de ação, indicando os dados experimentais tempo de onze horas e 28 minutos para a eliminação da infecciosidade. O poder inativante da EIB a 2% foi mais acentuado no período de quatro horas, devendo a inativação ter-se completado com quatro horas e 18 minutos. As três substâncias químicas experimentais mostraram uma ação inativante do tipo linear, completa, sobre a infecciosidade do vírus em estudo, sem afetar sua capacidade hemoaglutinante.

Termos para indexação: paramixovírus, inativantes de primeira ordem, galinhas.

THE INACTIVATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS BY BETA-PROPIOLACTONE, ACETHYLENEIMINE AND BINARY ETHYLENEIMINE

ABSTRACT - The inactivating action of BPL, AEI and BEI upon the infectivity and hemagglutinating activity of Newcastle Disease virus (Macapá strain), was studied. The inactivant was added to infected allantoic fluid, incubated at 37°C and samples collected at appropriate intervals to determine infectivity, hemagglutination titer and sterility. BPL at a final concentration of 1:4000 revealed higher inactivation at two hours incubation period and complete inactivation by six hours and 16 minutes. AEI, at a final concentration of 0,05%, showed more accentuated inactivation around six hours incubation period and complete inactivation calculated to occur by 11 hours and 28 minutes. The 2% of BEI inactivating action was higher at four hours incubation with complete inactivation taking place at four hours and 18 minutes. All three chemical substances showed first order inactivating action, with linear infectivity decrease and no residual active virus particle.

Index terms: paramyxoviruses, first order inactivants, hens.

INTRODUÇÃO

A inativação de suspensões virulentas por substâncias químicas foi estudada por vários pesquisadores. Fermi (1908) e Semple (1911) fizeram uso do fenol para inativar o vírus rábico no preparo de vacinas a serem aplicadas no tratamento preventivo da doença. Com igual propósito, Cumming (1914) introduziu o uso do formol, que passou a ser amplamente utilizado, extendendo-se sua aplicação a dife-

¹ Aceito para publicação em 16 de abril de 1990.

Trabalho realizado no Lab. da Disciplina Doenças Infecciosas do Dep. de Patol. e Clínica Vet. da UFF-Faculdade de Veterinária.

Extraído da tese apresentada pela autora para obtenção do grau de M.Sc. em Medicina Veterinária na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

² Méd. - Vet., M.Sc., Prof. - Assist., Dep. de Microbiol. e Parasit. da Universidade Federal Fluminense (UFF) - Faculdade de Veterinária, Rua Vital Brasil Filho nº 64, CEP 24800 Niterói, RJ.

³ Méd. - Vet., Prof. - Titular da UFF. Bolsista do CNPq.

⁴ Méd. - Vet., Prof. - Adjunto da UFF.

rentes vírus (Vallée et al. 1926, Burnet 1955, Potash 1968). Entretanto, o registro do acidente ocorrido com a vacina antipoliomielite, inativada pelo formol, em 1955 (Gard 1957, Nathanson & Langmuir 1963) determinou estudos mais detalhados da cinética de sua inativação e a busca de outro inativante mais eficaz. Foram experimentados mais de 600 agentes físicos e químicos. Destes, a betapropiolactona (BPL) se revelou um eficiente inativante, tendo sido empregada com diversos vírus (Lo Grippio & Hartmann 1955, Polley & Guerin 1957, Schaaf 1959, Stone & Delay 1961, Fernelius et al. 1972). Seu emprego na inativação do vírus da doença-de-newcastle foi descrito em diversos trabalhos (Mack & Chotisen 1955, Winmill & Wedell 1961, Appleton et al. 1963, Simmins & Baldwin 1963, Stone & Boney Júnior 1972, Brugh & Siegel 1978).

Brown et al. (1963) demonstraram que a acetil-etileno-imina (AEI) exerce rápida ação inativante sobre o vírus da Febre Aftosa, dando ensejo e vacinas de qualidade antigênica satisfatória. Resultados similares foram descritos para o vírus da raiva e da influenza equina (Cunha & Silva 1971, Cunha et al. 1982).

Bahnemann (1975) estudou a inativação do vírus aftoso pela etilenoimina binária (EIB), com resultados satisfatórios.

Não foi encontrada, na literatura, referência à inativação do vírus da doença-de-newcastle pelo AEI ou EIB. Em vista da importância econômica desta doença para a avicultura nacional, julgou-se de interesse estudar o processo de inativação de seu vírus, representado por amostra autoctone, frente a BPL, ao AEI e EIB.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa de vírus

O vírus da doença-de-newcastle empregado representava uma cepa nacional, isolada de um surto natural da doença em Macapá, AP (Cunha & Silva 1955). A amostra vem sendo mantida por passagens em ovos embrionados de dez a onze dias de incuba-

ção, inoculados no saco alantóide, com coleta de novo líquido virulento após incubação a 37°C, por cerca de 72 horas. Entre passagens, o líquido alantóide virulento era mantido em congelação a -60°C (= 60°C negativos).

Ovos embrionados

Ovos embrionados de dez a onze dias de incubação, provenientes de galinhas Leghorn, de criação própria ou de granja experimental, com estado sanitário conhecido, foram utilizados.

Prova de hemoaglutinação (HA) - A capacidade hemoaglutinante dos líquidos alantóides dos ovos infectados com o vírus em estudo foi aferida pela prova de HA com eritrócitos de galinha a 0,5%. De uma maneira geral, a técnica preconizada pela Organização Mundial de Saúde foi adotada (Lepine 1954). Diluições duplas do líquido em exame a partir de 1:5 e sucessivamente até 1:5120 eram preparadas em solução salina fosfatada (SSF) de pH 7,2-7,4 (Souza 1987) em volume de 0,5 ml. A cada tubo agregava-se igual volume da suspensão de hemácias a 0,5%. Após agitação, os tubos eram mantidos à temperatura ambiente e a leitura final feita em torno de 60 minutos, na dependência dos tubos controles.

Titulação da infecciosidade - O título infeccioso das diferentes amostras de líquido alantóide (LA) virulento, utilizado no processo de inativação foi determinado pela inoculação do líquido ou de diluições décuplas da amostra, preparadas em SSF, contendo 10% de caldo simples e antibióticos (penicilina e estreptomyciná), em faixa variável conforme o tempo de inativação. Em ordem decrescente de diluição, eram as mesmas inoculadas na cavidade alantóide de ovos embrionados de dez a onze dias de incubação, quatro ovos por diluição.

Os ovos inoculados eram colocados na estufa a 37°C e revisados às 24 horas, desprezando-se os que apresentavam embriões mortos. Os ovos com embriões vivos voltavam à incubação e reexaminados cada 24 horas pelo período de cinco a sete dias, retirando-se a cada exame os ovos mortos para geladeira. Ao final desse período, coletava-se o LA de todos os ovos, vivos e mortos. Estes LA eram examinados, individualmente, para sua capacidade hemoaglutinante, indicadora final de positividade. O título infeccioso da suspensão era calculado pelo método de Reed & Muench (1938) e assim encontrada a dose infectante média (DI 50). Nos períodos mais longos de inativação, a suspensão original do LA, sem diluir, foi inoculada.

Prova de esterilidade - As provas de esterilidade mencionadas eram levadas a efeito em meio de tioglicolato (Difco 0256-81).

Inativantes

Como inativantes foram experimentadas três substâncias químicas: 1) Beta-propiolactona (Beta-prone); 2) Acetil-etileno imina (n-Acetylaziridine e 3) Bromidrato de 2-Bromo-Etilamina (2-bromoetilamina hydrobromide).

Inativação

O material virulento utilizado era constituído de LA da 58a. passagem em ovo embrionado do vírus da DNC, amostra macapá, submetido previamente às provas de esterilidade, HA e infecciosidade e conservado em congelação a -20°C . Sete a 21 dias após as titulações preliminares, o LA era descongelado e centrifugado a 2.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante formava a suspensão virulenta para a prova de inativação. Esta se processava em banho-maria a 37°C , com agitação freqüente da mistura vírus-inativante. Os três inativantes antes mencionados, foram experimentados.

1) Beta propiolactona (BPL) - Duas experiências foram efetuadas com este inativante. Uma solução de BPL a 1:2.000, preparada em bicarbonato de sódio a 0,2 M, era misturada em partes iguais com LA infectado. A seguir, a mistura era colocada na temperatura de inativação, retirando-se uma amostra para exame nos intervalos programados, após reajuste do pH para 7,4 com fosfato monossódico. A amostra retirada logo após adição da BPL era considerada a 0 (zero) hora. Na primeira experiência, a inativação foi acompanhada pela retirada de amostras com 06, 12, 24 e 48 horas. Conhecidos seus resultados, a segunda experiência foi efetuada por um período de seis horas, retirando-se uma amostra a cada hora. Para medir a ação do inativante, de cada amostra era pesquisada a esterilidade, a capacidade hemoaglutinante e o título de infecciosidade.

2) Acetil-etileno-imina (AEI) - O líquido alantóide, previamente selecionado, era misturado em partes iguais, com uma solução de AEI a 0,1% em SSF. Retirada a amostra de zero hora, a mistura era colocada em banho-maria a 37°C . Em experiência preliminar foram examinados dois tempos de inativação, nove e 16 horas. Conhecidos os resultados, o processo de inativação foi investigado por doze horas, com retirada de amostra às duas, quatro, seis e doze horas de ação do inativante. Cada amos-

tra, imediatamente à sua obtenção, era tratada com tiossulfito de sódio a 5%, na proporção de 1 ml para 10 ml da suspensão em estudo, passando-se, em seguida, as provas de esterilidade, título infeccioso e HA.

3) Etilenoimina binária (EIB) - Foi adotada a técnica descrita por Bahnemann (1975), obtendo EIB a partir do Bromidrato de 2-Bromo-Etilamina (BEA) em NaOH 1 M. Como indicador de pH foi usado o betanafol violeta para acompanhar a transformação de BEA para EIB. O inativante era adicionado ao LA virulento já aquecido a 37°C , na proporção de 2%. Em experiência preliminar, foi examinada a inativação ocorrida com oito e doze horas. Conhecidos os resultados, foi efetuado novo experimento, verificando-se os títulos infecciosos a zero hora e com uma, duas, três, quatro, cinco e seis horas de inativação. A cada intervalo era retirada a amostra e, em seguida, efetuadas as provas de esterilidade, título infeccioso e HA.

4) Análise estatística - O processo de inativação da amostra, utilizando-se a BPL, AEI e EIB, foi determinado por análise tabular com posterior representação gráfica dos resultados obtidos.

A influência do tempo para o período de inativação foi avaliada pela regressão linear e análise de variância (Sounis 1972).

RESULTADOS

1) Inativação pela BPL

Na experiência preliminar, as amostras retiradas com 12, 24, 48 e 72 horas mostraram-se inócuas para os ovos inoculados, mesmo nas suspensões sem diluir. Na amostra de seis horas, dois de quatro ovos inoculados com a suspensão sem diluir se apresentaram positivos, mostrando um resíduo de infecciosidade.

A verificação da inativação a 37°C pelo período de seis horas e exames de amostras com intervalo de uma hora está representado na Fig. 1. Nesta figura, fica claro que no período de duas horas o poder inativante da BPL foi mais acentuado. A análise de regressão linear dos títulos infecciosos apresentou comportamento decrescente por hora de inativação. Segundo o modelo matemático ($\hat{y} = 7,46 - 1,19 X$), a inativação total da amostra deverá

ocorrer em torno de seis horas e 16 minutos ($P < 0,01$).

Durante o processo de inativação, o título HA inicial de 1:1280 após uma hora era de 1:640 e persistiu até o final do período.

Os líquidos alantóides dos embriões mortos após 24 horas de inoculação apresentaram resultados de HA positivo.

2) Inativação pelo AEI

Na experiência preliminar com nove e 16 horas de inativação, os resultados indicaram completa inativação nas duas amostras examinadas. Os resultados obtidos na experiência seguinte, quando se verificou a inativação com duas, quatro, seis, oito, dez e doze horas de inativação estão apresentados na Fig. 2.

O maior percentual de inativação obtido neste experimento ocorreu por volta de seis horas (Fig. 2).

Os títulos infecciosos analisados por regressão linear demonstraram um processo decrescente por tempo de inativação. Segundo a equação da reta ($\hat{y} = 8,25 - 0,72 X$), o tempo necessário para que ocorra a inativação total foi calculado ser em torno de onze horas e 28 minutos ($P < 0,01$).

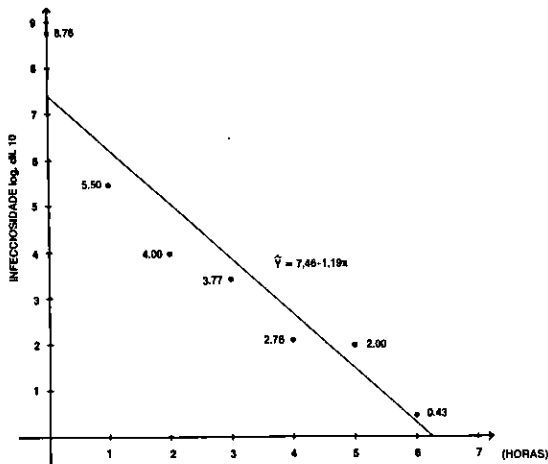


FIG. 1. Inativação do vírus da doença de Newcastle (VDNC), Macapá, pela Betapropiolactona a 37°C.

O título HA da amostra (1:1280) após duas horas de inativação foi alterado para 1:640 e persistiu durante todo o processo de inativação.

Resultados de HA positivo foram constatados em todos os líquidos alantóides coletados dos ovos com embriões mortos após as primeiras 24 horas de observação.

Não se registraram resultados de HA positivos com os líquidos alantóides coletados dos ovos com embriões sobreviventes.

3) Inativação pelo EIB

Na experiência preliminar, as amostras obtidas com oito e doze horas de inativação mostraram-se inócuas mesmo nas suspensões sem diluir. Os resultados do experimento seguinte de amostras retiradas com uma, duas, três, quatro, cinco e seis horas de inativação são apresentados na Fig. 3.

O poder inativante do EIB foi mais acentuado no período de quatro horas, conforme é demonstrado na Fig. 3. A regressão linear, seguindo a equação da reta ($\hat{y} = 7,80 - 1,48 X$), calculada pelos títulos de infecciosidade após inativação pelo EIB a 37°C, indica decréscimo

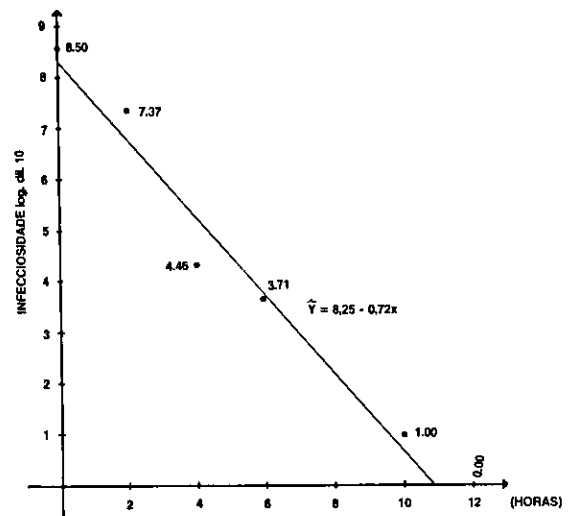


FIG. 2. Inativação do vírus da doença de Newcastle (VDNC), Macapá, pelo Acetil-imina a 37°C.

mo do título infeccioso, de acordo com o tempo horário de observação. Segundo estes cálculos, a inativação completa deverá ocorrer às 4,33 horas ou seja às quatro horas e 18 minutos, conforme se observa na Fig. 3 ($P < 0,01$).

A titulação de uma suspensão virulenta controle, incubada a 37°C mas sem inativante, mostrou títulos infecciosos de $10^{8,66}$, $10^{8,50}$ e $10^{7,66}$, respectivamente, para amostras de zero, três e seis horas de incubação, para um volume de 0,1 ml de inóculo.

O título HA inicial foi de 1:1280, assim permanecendo com as amostras de duas, três, quatro e cinco horas. Com a amostra de seis horas, o título foi de 1:640.

Esterilidade - Os LA originais e as diversas amostras retiradas nos experimentos de inativação, semeadas no meio de tioglicolato, mostraram-se livres de contaminantes bacterianos e fúngicos.

DISCUSSÃO

Vários autores relatam a inativação de amostras do vírus da DNC pela BPL, em diferentes concentrações e temperaturas diversas (Mack & Chotisen 1955, Winmill & Wedell 1961, Appleton et al. 1963, Stone & Boney Júnior 1972, Brugh & Siegel 1978). Entre-

tanto, estes trabalhos referem-se à inativação final da suspensão de vírus, sem informar a gradação ocorrida e conseqüente processo cinético de inativação, aclarando sua natureza.

Os resultados dos experimentos por nós realizados com o vírus da DNC, amostra macapá, fazendo uso da BPL na concentração final de 1:4000 a 37°C, demonstraram que após duas horas o percentual de inativação alcançou 50%, e com 12 horas, a inativação era total, indicando uma linha reta de inativação, sem deixar resíduo ativo de vírus.

Brown & Crick (1959) verificaram que uma suspensão de vírus aftoso preparada a partir de epitélio podal de cobaias tornava-se inócua após incubação com 0,05% de AEI a 37°C por quatro horas. Porém, experimentos com suspensão de vírus procedente de bovinos ou cultivo celular de rim porcino mostraram que a infecciosidade podia ser revelada após oito horas, mas não com doze horas de inativação. (Brown et al. 1963). Graves & Arlinghaus (1967), estudando a cinética de inativação do AEI sobre o vírus aftoso a 37°C, encontraram que a inativação deveria ser completa com seis horas de ação do inativante, e concluíram tratar-se de uma reação de primeira ordem sem prejudicar as propriedades sorológicas e imunizantes do antígeno. Cunha & Silva (1971) registraram um decréscimo linear na inativação do vírus rábico pelo AEI a 37°C. Igualmente, inativação de primeira ordem foi encontrada por Bahnemann (1975) para o vírus aftoso e por Schloer (1982) para o vírus da Peste Suína Africana. Tanto Graves & Arlinghaus (1967) como Bahnemann (1975) verificaram que o aumento de proteínas na suspensão virulenta trabalhada não influencia a inativação, sugerindo que a ação do inativante se faz sobre o ácido ribonucléico do vírus.

Os resultados aqui obtidos, pelo uso de AEI ou EIB na inativação do vírus da DNC, descritos no presente trabalho, não divergem dos revistos com vírus da Febre Aftosa, Raiva e Peste Suína Africana, mostrando, também, tratar-se de inativação de primeira ordem, linear, sem resíduo de partículas virais ativas.

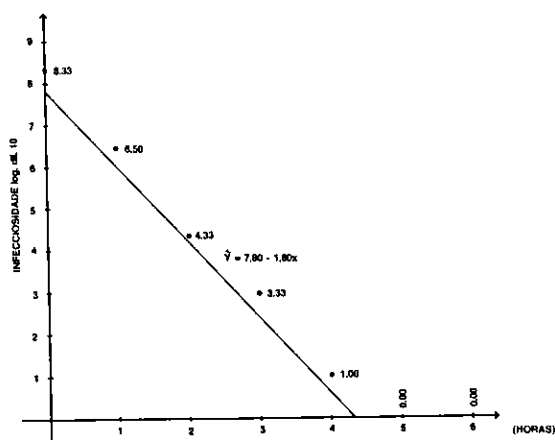


FIG. 3. Inativação da amostra do vírus da doença de Newcastle (VDNC), Macapá, pelo EIB a 37°C.

CONCLUSÕES

1. A BPL, o AEI, e a EIB mostraram uma inativação rápida, de tipo linear, de primeira ordem, sobre a infecciosidade do vírus da DNC, presente em LA de ovos embrionados infectados com a cepa macapá.

2. A capacidade hemoaglutinante do vírus foi preservada no processo de inativação.

REFERÊNCIAS

- APPLETON, G.S.; HITCHNER, S.B.; WINTERFIELD, R.W. A comparison of the immune response of chickens vaccinated with formalin and betapropiolactone inactivated Newcastle Disease vaccines. *Am. J. Vet. Res.*, **24**: 827-31, 1963.
- BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, **47**:47-56, 1975.
- BROWN, F. & CRICK, J. Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.*, **8**:444-47, 1959.
- BROWN, F.; HYSLOP, N.; CRICK, J.; MORROW, A.W. The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *J. Hyg.*, London, **61**:337-44, 1963.
- BRUGH, M. & SIEGEL, H.S. Inactivated Newcastle disease vaccines: Influence of virus concentration on the primary immune response. *Poult. Sci.*, **57**:892-6, 1978.
- BURNET, F.M. *Principles of animal Virology*. New York, Academic Press Inc., 1955. 486p.
- CUMMING, J.G. Rabies-Hydrophobia; a study of fixed virus, determination of the M.L.D., vaccine treatment (Hogyes, Pasteur and dialyzed vaccine) and immunity tests. *J. Infect. Dis.*, **14**:33-52, 1914.
- CUNHA, R.G. & SILVA, R.A. Antigenicidade de vacinas anti-rábicas inativadas pelo acetil-etilenoimina, Betapropiolactona e fenol. *R. bras. Biol.*, **31**:435-40, 1971.
- CUNHA, R.G. & SILVA, R.A. Isolamento e identificação do vírus da Doença de Newcastle no Brasil. *B. Soc. Bras. Med. Vet.*, **23**: 17-33, 1955.
- CUNHA, R.G.; PASSOS, W.S.; PAGANO, M.C.C.; ZAMBORLINI, L.C. Influenza equina - Comparação antigênica de vacinas inativadas pelo Acetil etileno imina, Betapropiolactona e formol. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, Belo Horizonte, **34**:313-24, 1982.
- FERMI, C. Über die Immunisierung gegen Wutkrankheiten. *Z. Hyg. Infektionskr.*, **58**:233-76, 1908.
- FERNELIUS, A.L.; CLASSICK, L.G.; SMITH, R.L. Evaluation of B-propiolactone-inactivated and chloroform treated-virus vaccines against Bovine Viral Diarrhea - Mucosal disease. *Am. J. Vet. Res.*, **33**:1421, 1972.
- GARD, S. Chemical inactivation of viruses. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. & MILLAR, E.C.P. eds. *The nature of viruses*. London, J. & A. Churchill, 1957. p.123-141.
- GARD, S. Inactivation of Poliovirus by Formaldehyde. *Bull. Org. Mond. Sauté*, **17**:979-89, 1957.
- GRAVES, J.H. & ARLINGHAUS, R.B. Acetyleneimine in the preparation of inactivated Foot-and-mouth Disease Vaccines. *Proc. U.S. Livestock San. Assn.*, **71**:396-403, 1967.
- LEPINE, P. Laboratory methods in the study of influenza vírus. In: INFLUENZA; a review of current research. Geneva, WHO, 1954. p.87-124. (Monograph Series, 20).
- LO GRIPPO, P.A. & HARTMANN, F.W.; Antigenicity of B-propiolactona-inactivated virus vaccine. *J. Immunol.* **75**:123-8, 1955.
- MACK, W.N. & CHOTISEN, A. Betapropiolactone as a virus altering agent for a Newcastle Disease vaccine. *Poult. Sci.*, **34**:1010-3, 1955.
- NATHANSON, N. & LANGMUIR, A.D. The Cutter Incident. Poliomyelitis following formaldehyde inactivated poliovirus vaccination in the United States during the spring of 1955. I-Background. II-Relationship of Poliomyelitis to Cutter vaccine. III-Comparison of the clinical character of vaccinated and contact

- cases occurring after use of high rate lots of Cutter vaccine. *Am. J. Hyg.*, **78**:16-81, 1963.
- POLLEY, J.R. & GUERIN, M.M. The use of Beta-propiolactone for the preparation of virus vaccines. I-Antigenicity. *Can. J. Microbiol.*, **3**:871-7, 1957.
- POTASH, L. Methods in human virus vaccine preparation. In: MARANORDSCH, K. & KOPROWSKY, H. *Methods in Virology*. New York, Acad. Press, 1968. v.4, p.371-464.
- REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent end-points. *Am. J. Hyg.*, **27**:493-7, 1938.
- SCHAAF, K. Avian encephalomyelitis immunization with inactivated virus. *Avian Dis.*, **3**:245-56, 1959.
- SCHLOER, G.M. Kinetics of inactivation of African Swine Fever antigen with Binary-ethylimine. *Proc. Ann. Meeting U.S. Anim. Health Assoc.*, Nashville, **86**:253-60, 1982.
- SEMPLE, D. **The preparation of a safe and efficient antirabic vaccine.** Calcutta, Scient. Memoirs by off. Med. San. Dept. Gov. of India, 1911. (New Series, 44).
- SIMMINS, G.B. & BALDWIN, B.A. Studies on betapropiolactone inactivated Newcastle Disease vaccines. *Res. Vet. Sci.*, **4**:286-93, 1963.
- SOUNIS, E. *Bioestatística; princípios fundamentais, metodologia estatística.* São Paulo, McGraw Hill do Brasil, 1972. 228p.
- SOUZA, M.C.G.C. **Inativação do vírus da Doença de Newcastle e conservação de sua atividade hemoaglutinante.** Niterói, RJ, UFF, 1987. 87p. Tese Mestrado.
- STONE, H.D. & BONEY JÚNIOR, W.A. Newcastle Disease vaccination with Beta-propiolactone inactivated virus given intratracheally. *Avian. Dis.*, **16**:639-43, 1972.
- STONE, S.S. & DELAY, P.D. The inactivation of rinderpest virus by B-propiolactone and its effects in homologous complement fixing and neutralizing antibodies. *J. Immunol.*, **87**:464-7, 1961.
- VALLÉE, M., CARRÉ, H.; RINJARD, P. Sur l'immunisation antiaphtheuse par le virus formulée. *Rev. Gen. Med. Vet.*, **35**:129, 1926.
- WINMILL, A.J. & WEDELL, W. A Newcastle Disease vaccine inactivated by Beta-propiolactone. *Res. Vet. Sci.*, **2**:381-6, 1961.