

DOENÇA DE NEWCASTLE. II. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINA PREPARADA COM A ESTIRPE VACINAL B₁

ANTONIO CARLOS PAULILLO

Professor Assistente
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
de Jaboticabal

ARAMIS AUGUSTO PINTO

Professor Livre-Docente
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
de Jaboticabal

JOJI ARIKI

Professor Livre-Docente
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
de Jaboticabal

ANGELO BERCHIERI JUNIOR

Auxiliar de Ensino
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
de Jaboticabal

WALDENIR PENARIOL

Zootecnista

PAULILLO, A.C.; PINTO, A.A.; ARIKI, J.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PENARIOL, W. Doença de Newcastle. II. Estudo comparativo entre diferentes métodos de administração de vacina preparada com a estirpe vacinal B₁. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S. Paulo*, 19(1): 45-51, 1982.

RESUMO: Foram relatados os resultados do experimento entre diferentes métodos de aplicação de vacina preparada com a estirpe B₁ do vírus da doença de Newcastle, realizado em pintos protegidos passivamente por anticorpos maternos, procedentes de matrizes imunizadas. A resposta imune foi avaliada pela reação de inibição da hemaglutinação (HI) e pelo teste de proteção ao desafio. A primeira vacinação em pintos de 14 dias foi realizada pelas vias aerógena, ocular e oral. O método aerossol induziu melhor resposta de anticorpos inibidores da hemaglutinação, com significância ao nível de 5% de probabilidade, entretanto, sem diferenças significativas com o ocular, no teste de proteção ao desafio. Os anticorpos maternos declinaram rapidamente depois do nascimento, não sendo detectados entre o 14o. e o 21o. dia.

UNITERMOS: Doença de Newcastle*; Hemoaglutinação*; Vacinas, administração*

INTRODUÇÃO

Não havendo recursos unicamente higiênicos para sustar o aparecimento e evolução fatal da doença de Newcastle, torna-se necessário cada vez mais, o delineamento de ensaios, capazes de esclarecer a mais efetiva das vias de vacinação e, sobretudo da admissão de um esquema padronizado de imunização, que possa salvaguardar os plantéis avícolas.

Devido a esses e outros fatores, ensaios com a estirpe vacinal B₁, visando medidas imunoproláticas contra a enfermidade de Newcastle, foram conduzidos por BEARD e EASTERDAY²(1967), PAGNINI e cols¹⁵(1970), GOUGH e ALEXANDER⁸(1973) e EIDSON e KLEVEN⁷(1976).

Estudos visando determinar a duração de anticorpos passivos de origem congênita em pintos têm merecido especial atenção de vários pesquisadores^{10,11,14}, que verificaram que os anticorpos de origem materna duram aproximadamente, em média, 28 dias, em pintos procedentes de matrizes imunizadas.

No Brasil, os esforços para o controle da doença de Newcastle estão orientados para a imunização ativa, mediante vacinas vivas de caráter lentogênico, sendo empregadas exclusivamente as estirpes B₁ e La Sota. As vias de administração mais usadas são respectivamente: a instilação ocular e intranasal, administração intramuscular, aplicação na água de bebida ou disseminação no ar mediante aerossol.

Diante da escassez da literatura nacional concernente à imunoprofilaxia da enfermidade de Newcastle e sendo portanto esta moléstia de extrema importância na avicultura brasileira, realizou-se o presente trabalho, com os objetivos de determinar o tempo de circulação de anticorpos maternos nas aves e avaliar a resposta imunológica à primovacinação pelos métodos: aerossol, ocular e oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Instalações e Equipamentos

Foram utilizados como descrito em trabalho anterior PAULILLO e cols¹⁷ (1981).

Aves Experimentais e Manejo

Foram utilizados 360 pintos de corte de linhagem comercial, provenientes de matrizes imunizadas contra a doença de Newcastle e distribuídos ao acaso, em quatro tratamentos e três repetições com 30 aves por parcela. O manejo seguiu as operações de rotina empregadas em uma criação de frangos de corte.

Vacinas

Foi utilizada vacina comercial, proveniente de um mesmo laboratório e que constava de uma única partida de 10 frascos, estando todos no início de sua validade. Essa va-

cina (liofilizada) foi preparada com a estirpe lentogênica B₁ do vírus da doença de Newcastle. A determinação do título infectante em embrião (EID₅₀) da estirpe vacinal em estudo, foi obtido segundo o método de REED e MUENCH¹⁹ (1938): EID₅₀(B₁) = 10^{7.19}/0,1 ml.

Vacinação e Amostragem

De acordo com a natureza do experimento, as aves foram separadas, aleatoriamente, em quatro grupos de 90 pintos (vacinados uma única vez no 14o. dia de vida). O primeiro grupo recebeu a vacina por via aerógena, o segundo grupo por via ocular e o terceiro grupo por via oral; o quarto grupo (Testemunha) não recebeu vacina.

Como critério de avaliação da imunidade pós-vacinal, utilizaram-se os resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, com posterior desafio frente a uma estirpe velogênica viscerotrópica do vírus da doença de Newcastle.

Vacinação Via Oral, Ocular e Aerógena

Foi efetuada como descrita em trabalho anterior PAULILLO e cols¹⁷ (1981).

Colheita de sangue

Foram colhidas 480 amostras de sangue a partir do primeiro dia de idade das aves ($\pm 10\%$ das aves de cada grupo), com intervalos regulares de sete dias até o final do período experimental, sendo realizadas 10 colheitas de sangue no total.

Os soros colhidos foram previamente inativados à 56° C por 30 minutos, para remoção dos inibidores inespecíficos da hemaglutinação de acordo com PHILLIPS¹⁸ (1973) e colocados em frascos tipo penicilina, estéreis e armazenados em congelador a -20°C até o momento do uso.

Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)

Em todos os soros obtidos na fase experimental foi realizada a pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI), com antígenos vivos contendo 4 UHA. Foi utilizada a microtécnica preconizada por CUNNINGHAM⁴ (1971).

Vírus de Desafio

Foi utilizado como descrito em trabalho anterior PAULILLO e cols¹⁷ (1981).

Delineamento Experimental

Foi aplicado como descrito em trabalho anterior PAULILLO e cols¹⁷ (1981).

RESULTADOS

A imunidade passiva, de origem materna, detectada nos soros de pintos procedentes de matrizes imunizadas, contra a doença de Newcastle, representada neste estudo por títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI), encontra-se descrita quantitativa e sumariamente na Tabela 1, onde aparecem níveis de anticorpos maternos oscilantes, determinados nos primeiros dias de vida das aves experimentais, respectivamente, no primeiro, sexto e 13o. dias de idade, considerando-se a sua distribuição aleatória nos grupos de aves em estudo e nos tratamentos empregados.

As médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros das aves experimentais no período pós-vacinal (expressas em logaritmo de base 2) nos diferentes tratamentos, estão presentes na Tabela 2.

Entretanto, com o declínio vertical e arbitrário dos anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI), posteriormente aos 28 dias pós-vacinais (42o. dia de idade das aves) visto na Tabela 2, estudos concernentes aos subsequentes períodos pós-vacinais não merecem menção distinta, deixando portanto de ser enfocados.

Na Tabela 3, os resultados da análise estatística com referência aos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI), para as vias de aplicação indicaram, pelo teste de Tukey, diferenças significativas entre o aerosol e os métodos ocular e oral, ao nível de 5% de probabilidade, entretanto, sem diferenças significativas entre os métodos ocular e oral.

O resultado do desafio com o vírus velogênico viscerotrópico da doença de Newcastle no 35o. dia de idade das aves, é apresentado na Tabela 4.

Na Tabela 5, os resultados da análise estatística com referência as médias de porcentagem de proteção ao desafio, demonstraram pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, haver diferenças significativas entre os métodos aerosol e oral; contudo, sem diferenças significativas entre os métodos aerosol e ocular e entre o ocular e o oral.

Em suma, os coeficientes de variação dos testes realizados no presente experimento, utilizados como critério para avaliação dos objetivos inicialmente propostos, não foram muito altos, indicando uma boa precisão nos resultados obtidos.

TABELA 1 – Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros das aves experimentais em período pré-vacinal (expressas em logaritmo de base 2) nos diferentes tratamentos.

| Grupo | Método de Administração e Amostra Vacinal | Médias geométricas dos títulos de HI (Log ₂) | | |
|-------|---|--|------|------|
| | | Período pré-vacinal (idades das aves - Dias) | | |
| | | 1 | 6 | 13 |
| 1 | Aerosol B ₁ | 5.90 | 5.42 | 3.58 |
| 2 | Ocular B ₁ | 5.83 | 5.42 | 3.00 |
| 3 | Oral B ₁ | 5.64 | 4.90 | 2.58 |
| 4 | Testemunha | 5.90 | 5.00 | 3.00 |

TABELA 2 – Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros das aves experimentais em período pós-vacinal (expressas em logaritmo de base 2) nos diferentes tratamentos.

| Grupo | Método de Administração e Amostra Vacinal | Médias geométricas dos títulos de HI (Log ₂) | | | | | | |
|-------|---|--|------|------|------|------|------|------|
| | | Período pós-vacinal (idades das aves - Dias) | | | | | | |
| | | 21 | 28 | 35 | 42 | 49 | 56 | 63 |
| 1 | Aerosol B ₁ | 4.64 | 5.49 | 6.49 | 6.22 | 5.90 | 5.32 | 4.32 |
| 2 | Ocular B ₁ | 3.70 | 4.64 | 5.49 | 5.32 | 5.24 | 4.58 | 3.58 |
| 3 | Oral B ₁ | 2.80 | 3.90 | 4.45 | 4.39 | 4.32 | 3.80 | 3.00 |
| 4 | Testemunha | —* | — | — | — | — | — | — |

* sem título

TABELA 3 – Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI), teste F e de Tukey para as vias de aplicação com a estirpe vacinal B₁.

| Vias de Aplicação | Período pós-vacinal (idades das aves - dias) | | | |
|-------------------|--|---------|---------|---------|
| | 21 | 28 | 35 | 42 |
| Aerosol | 25,33 a ¹ | 45,33 a | 90,66 a | 74,66 a |
| Ocular | 13,33 b | 25,33 b | 44,66 b | 40,00 b |
| Oral | 7,33 b | 15,33 b | 22,66 b | 21,33 b |
| F | 11,34** | 7,44** | 14,96** | 15,12** |
| dms (5% Tukey) | 10,26 | 21,10 | 38,82 | 26,23 |

¹ Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 4 – Resultado do desafio com vírus velogênico viscerotrópico da doença de Newcastle, em aves tipo corte, no 35o. dia de vida (4 grupos), primovacinaados aos 14 dias de idade.

| Grupo | Amostra Vacinal | Idade Vacinal (dias) | Método de Administração | No. de aves Testadas | % de aves Testadas de cada Tratamento | Mortalidade | | | % de proteção à morte | | | % Total de proteção à Morte | |
|-------|-----------------|----------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| | | | | | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Total | R ₁ | R ₂ | | R ₃ |
| 1 | B ₁ | 14o. | Aerosol | 12 | 13,50 | 0/4 | 1/4 | 1/4 | 2/12 | 100 | 75 | 75 | 83,3 |
| 2 | B ₁ | 14o. | Ocular | 12 | 13,50 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 3/12 | 75 | 75 | 75 | 75,0 |
| 3 | B ₁ | 14o. | Oral | 12 | 13,50 | 2/4 | 2/4 | 2/4 | 6/12 | 50 | 50 | 50 | 50,0 |
| 4 | TESTEMUNHA | | | 12 | 13,50 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 12/12 | 0 | 0 | 0 | 0,0 |

Obs.: R₁, R₂ e R₃ = Repetições.

TABELA 5 — Médias de porcentagem de proteção ao desafio, com vírus velogênico viscerotrópico da doença de Newcastle no 35o. dia de vida das aves, teste F e teste de Tukey para as vias de aplicação.

| Vias de Aplicação | % de Proteção |
|-------------------|---------------------|
| Aerosol | 87,5 a ¹ |
| Ocular | 79,16 ab |
| Oral | 54,16 b |
| F | 7,15** |
| dms (5% Tukey) | 27,73 |

¹ Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

DISCUSSÃO

A determinação da duração da imunidade passiva é importante do ponto de vista prático, em áreas que estão contaminadas com estirpes velogênicas do vírus da enfermidade de Newcastle, já que na dependência desse tipo de imunidade é possível determinar a época obrigatória para a realização da primovacinação.

As aves deste experimento, procedentes de matrizes imunizadas contra a moléstia de Newcastle apresentaram, com um dia de idade, títulos médios de anticorpos inibidores da hemaglutinação da ordem de log₂ 5.82 (Tabela 1), os quais, declinaram verticalmente com o aumento da idade dos pintos, variando de grupo para grupo de aves, deixando de circular os anticorpos maternos entre o 14o. e 21o. dia de idade. Muito embora esse achado não encontre apoio nos estudos realizados por KREIMER¹¹ (1969), KALETA¹⁰ (1972) e MIYAMOTO e cols¹⁴ (1977), que verificaram que os anticorpos maternos duravam aproximadamente, em média, 28 dias, em pintos procedentes de matrizes imunizadas concorda amplamente com as normas inseridas em "IMMUNITÉ"⁹ (1973), que preconizam que qualquer que seja a taxa de anticorpos maternos transmitida, há um rápido declínio dos anticorpos inibidores da hemaglutinação, com os anticorpos de origem materna deixando de circular ao redor do 16o. dia de idade dos pintos, e também com as observa-

ções de DURISIC e cols⁶ (1973) e de DEVOS e cols⁵ (1975) que, utilizando-se da reação de inibição da hemaglutinação, evidenciaram no soro de pintos oriundos de reprodutoras vacinadas, anticorpos maternos até o 14o. dia de idade. Atribui-se, possivelmente, esta inexatidão de resultados, aos diferentes esquemas de vacinação, via de administração, dose e tipos de vacina empregados na imunização das reprodutoras contra a doença de Newcastle, assim como, ao intervalo entre a última vacinação e a postura, o que resulta nos diferentes graus de imunidade humoral nas matrizes mães, com a conseqüente variabilidade na intensidade de anticorpos passivamente transmitidos do organismo materno a sua descendência.

O incremento contínuo do uso de vacinas vivas preparadas com estirpes lentogênicas do vírus da doença de Newcastle, tem dado às vias de administração, maior importância, no que concerne, a sua influência sobre a eficiência da vacina.

A esse respeito, os resultados da análise estatística referentes aos dados de anticorpos inibidores da hemaglutinação, para as vias de aplicação com a estirpe vacinal B₁ (Tabela 3), demonstraram, pelos contrastes conduzidos através do método de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, a superioridade do método aerosol em relação aos métodos ocular e oral. Entretanto, sem diferenças significativas entre os dois últimos, apresentando-se o oral com a menor média.

Tais resultados estão de acordo com os achados de PAGNINI e cols¹⁵ (1970), LADGRAF e VIELITZ¹² (1972), BONDARENKO e cols³ (1973), ROEPKE²⁰ (1973), com os critérios estabelecidos em "MÉTHODES DE VACCINATION"¹³ (1973), unânimes em apontar a supremacia do método aerosol em relação ao oral, referente ao estímulo de anticorpos inibidores da hemaglutinação e ainda encontrando apoio nos estudos conduzidos por EIDSON e KLEVEN⁷ (1976), que verificaram a superioridade do sistema aerosol comparativamente ao ocular na indução de maiores títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação.

Títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, foram obtidos aos 21 dias após a vacinação (Tabela 2), independentemente dos métodos utilizados. Entretanto, a melhor média registrada \log_2 6.49 foi obtida, no 21º dia após a vacinação com o método aerosol, demonstrando efetivamente a influência da via de administração de vacina na resposta imunológica.

Na Tabela 5, os contrastes conduzidos pelo método de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, demonstraram a supremacia do método aerosol em relação ao oral, entretanto, sem apresentar diferenças significativas entre os métodos aerosol e ocular. O oral, foi o que se apresentou, com a menor média de porcentagem de proteção ao desafio, porém, não diferindo estatisticamente do ocular.

Neste aspecto, os resultados da presente pesquisa estão confirmados nos trabalhos de PAGNINI e cols¹⁵ (1970), BONDARENKO e cols³ (1973), ROEPKE²⁰ (1973), STONENESCU e cols²¹ (1977), PARTADIRENJA e cols¹⁶ (1979), e de acordo com os critérios estabelecidos em "MÉTHODES DE VACCINATION"¹³ (1973), que preconizam a maior eficiência do método aerosol em relação ao oral, relativo aos níveis de proteção ao desafio, concordes parcialmente com os resultados inseridos nos trabalhos de LADGRAF e VIELITZ¹² (1972) e de GOUGH e ALEXANDER⁸ (1973), que evidenciaram a maior eficácia do método aerosol em comparação aos métodos ocular e oral, no que concerna à resistência ao desafio. Todavia, estão incompatíveis com as conclusões obtidas por BEARD e EASTERDAY² (1967) e EIDSON e KLEVEN⁷ (1976), que demonstraram que o método aerosol comparativamente ao ocular induziu superior proteção ao desafio, discordando ainda dos

resultados obtidos por ALMASSY e cols¹ (1979), que em termos de proteção ao desafio, comprovaram que as vacinas, quando administradas pela via ocular, dão melhores resultados do que as aplicadas pela via oral.

De fato, significativamente, a melhor média de porcentagem de proteção obtida, no teste de resistência ao desafio (Tabela 4), se deve à marcada penetração do vírus vacinal no trato respiratório, com o uso do método aerosol.

Com relação ao método de vacinação na água de bebida por maior que seja a atenção dispensada à operação, este não se constitui em uma técnica confiável, em razão dos inúmeros fatores influentes sobre a dose vacinal, embora no teste de proteção ao desafio não difira estatisticamente do ocular.

O método ocular se constitui em uma técnica perfeitamente reprodutível, apresentando-se sem diferenças significativas e interposto com os métodos aerosol e oral, no teste de proteção ao desafio.

É importante observar que 100% das aves controles sucumbiram na prova de desafio, apresentando à necropsia lesões patognômicas da doença de Newcastle (forma velogênica – viscerotrópica), o que demonstra, que o vírus utilizado na prova de desafio foi adequado e confirma a validade dos resultados obtidos.

PAULILLO, A.C.; PINTO, A.A.; ARIKI, J.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PENARIOL, W. Newcastle disease. II. A comparative study among different administration routes of B₁ vaccine strain. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 19(1): 45-51, 1982.

SUMMARY: The influence of different methods of application of a vaccines prepared with B₁ strain of Newcastle virus were studied in young birds obtained from immune matrixes. Their response was evaluated both by haemagglutination-inhibition test (HI) and by the protection against a challenge test. Young birds, 14 days old, were primary vaccinated through aerosol, eye drop instillation or oral routes. Results showed that the aerosol method induced the most effective response on HI test ($P < 0,05$). No differences were found between the eye drop instillation and the aerosol methods concerning protection against the challenge test. Further it was also observed that maternally derived antibodies declined quickly after birth being not detected in animals between 14 and 21 days old.

UNITERMS: Newcastle disease* ; Haemagglutination* ; Vaccines, administration*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 – ALMASSY, K.; BARHOUMA, N.; EL-SABBAGH, A.; IBRAHIM, S.N.; BOKTOR, N.; KHASHABA, E. GAWAD, S.A. Comparative immunization experiments with lentogenic Newcastle disease vaccine strains. *J. Egypt. vet. med. Ass.*, Cairo, 35(4): 95-104, 1979.

2 – BEARD, C.W. & EASTERDAY, B.C. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. *J. infect. Dis.*, 117:55-70, 1967.

3 – BONDARENKO, I.M.; BURISEV, V.I.; CHERNY-SHEV, V.V.; LAGUTKIN, N.A.; KUSHNIR, A.

- T. [Effectiveness of immunization against Newcastle disease (by inhalation, nasal and oral routes using La Sota and B₁ strains)]. *Veterinariya*, Moscow, 8:61-3, 1973.
- 4 – CUNNINGHAM, C.H. *Virologia practica*. 6.ed. Zaragoza, Acribia, 1971. 260p.
- 5 – DEVOS, A.H.; VIAENE, N.J.; SPANOGHE, L.; DEBRUYCKER, R.M. Maladie de Newcastle. Evolution et signification des anticorps inhibiteurs. *Ann.Rech.vet.*, Belgium, 6:73-82, 1975.
- 6 – DURISIC, S.; KOSOVAC, A.; VELHNER, M.; VISACKI, M. Newcastle disease in fowls: persistence of maternal antibody in the serum of chicks hatched from eggs of immune hens. *Vet.Glas.*, Yugoslavia, 27:881-4, 1973.
- 7 – EIDSON, C.S. & KLEVEN, S.A. A comparison of various routes of Newcastle disease vaccination at one day of age. *Poult.Sci.*, 55:1778-87, 1976.
- 8 – GOUGH, R.E. & ALEXANDER, D.J. The speed of resistance to challenge induced in chickens vaccinated by different routes with a B₁ strain of live N.D.V. *Vet.Rec.*, 92:563-4, 1973.
- 9 – IMMUNITÉ parentale et vaccination contre la maladie Newcastle. *Bull.Off.int.Épizoot.*, Paris, 79: 65-73, 1973.
- 10 – KALETA, E.F. Kinetics of Newcastle disease antibodies in fowls. III. Elimination of maternal antibodies in chicks. *Dtsch.Tierarztl.Wschr.*, Hannover, 79:184-7, 1972.
- 11 – KREIMER, Yu. Kh. Immunity in chicks inoculated with freeze-dried virus vaccine of the La Sota strains. *Veterinariya*, Moscow, 7:47-9, 1969.
- 12 – LANDGRAF, H. & VIELITZ, E. Experiments on the immunization of chicks against Newcastle disease. *Dtsch.Tierarztl.Wschr.*, Hannover, 79: 493-500, 1972.
- 13 – MÉTHODES de vaccination des volailles en France. *Bull.Off.int.Épizoot.*, Paris, 79:59-63, 1973.
- 14 – MIYAMOTO, T.; SAMEJIMA, T.; HIRAI, S.; NAKAMURA, J. Influence of maternal immunity upon immune response of chicks to inactivated Newcastle disease vaccine. *Bull.Biol.Res.*, Tokyo, 9: 71-82, 1977.
- 15 – PAGNINI, P.; MARTONE, F.; COMPAGNUCCI, M. Ricerche sperimentali e pratiche sulla immunizzazione dei polli contro la Pseudo-Peste con vaccino attenuato monovalente (Pseudo-Peste) o bivalente (Pseudo-Peste-Bronchite Infettiva) per aerosol. *Acta Med.Vet.*, Napoli, 16:233-50, 1970.
- 16 – PARTADIREDDA, M.; EIDSON, C.S.; KLEVEN, S.H. A comparison of immune responses of broiler chickens to different methods of vaccination against Newcastle disease. *Avian Dis.*, 23:623-33, 1979.
- 17 – PAULILLO, A.C.; PINTO, A.A.; ARIKI, J.; BERCHIERI Jr., A. Doença de Newcastle. I. Estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B₁ e La Sota. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S. Paulo*, 19(1):
- 18 – PHILLIPS, J.M. Vaccination against Newcastle disease: an assesment of haemagglutination inhibition titres obtained from field samples. *Vet.Rec.*, 93: 577-83, 1973.
- 19 – REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating percent and points. *Amer.J.Hyg.*, 27: 493-7, 1938.
- 20 – ROEPKE, W.J. The control of Newcastle disease in the Netherland. *Bull.Off.int.Épizzot.*, Paris, 79: 43-50, 1973.
- 21 – STOENESCU, V.; NICULESCU, E.; POPESCU, E.; SANDULESCU, S. Comparison of drinking water and aerosol methods of administration of La Sota Newcastle disease vaccine to broiler and layer chicks. *Lucr.Inst.Cerc.Vet.Biopreparate "Pasteur"*, Bucharest, 13:127-33, 1977.

Recebido para publicação em: 06-05-81.
Aprovado para publicação em: 11-02-82.