

# Évaluation de la thermotolérance du vaccin V<sub>4</sub> lyophilisé contre la maladie de Newcastle

Nguyen-Ba-Vy <sup>1</sup>

NGUYEN-BA-VY. Évaluation de la thermotolérance du vaccin V<sub>4</sub> lyophilisé contre la maladie de Newcastle. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1992, 45 (3-4) : 235-240

Un vaccin lyophilisé contre la maladie de Newcastle a été fabriqué à partir d'un dérivé thermotolérant V<sub>4</sub>/276 de la souche de virus V<sub>4</sub> (UPM). Le titre moyen de chaque flacon est de 10<sup>10,4</sup> DIO<sub>50</sub> après 14 jours de conservation à +4 °C et de 10<sup>10</sup> DIO<sub>50</sub> après 126 jours. Lors d'une incubation à 45 °C pendant 7 et 14 jours, il s'est abaissé respectivement à 10<sup>8,5</sup> DIO<sub>50</sub> et 10<sup>8,2</sup> DIO<sub>50</sub>. Ce vaccin a été aussi exposé à la température ambiante à Ouagadougou (Burkina Faso) durant la première quinzaine du mois de juillet 1991, période au cours de laquelle la température oscille le plus souvent entre 25 et 32 °C sans jamais dépasser 35 °C ; après des séjours de 7 et 14 jours à l'extérieur, ce vaccin a gardé un titre moyen de 10<sup>9,3</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon. Il est destiné à l'enrobage de grains servant de nourriture aux volailles des villages africains. *Mots clés* : Poule - Maladie de Newcastle - Vaccin lyophilisé - Thermotolérance - Burkina Faso.

## INTRODUCTION

La maladie de Newcastle continue à causer d'importantes pertes économiques dans les pays chauds. La lutte contre cette maladie est pratiquement inexistante dans la majorité des villages africains. Les raisons les plus souvent invoquées sont le manque de moyens pour les vaccinateurs d'atteindre les petits élevages, le coût du vaccin et le besoin de froid pour sa conservation. L'usage du vaccin inactivé, qui est plus rustique, implique aussi de fastidieuses opérations de capture et d'immobilisation des volailles vivant habituellement en liberté dans le village. Il est donc judicieux de trouver un vaccin, non seulement efficace, mais aussi thermostable et susceptible d'être administré aux volailles par les éleveurs eux-mêmes. C'est dans le cadre de ce programme de recherche appliquée que notre laboratoire a été amené à examiner plusieurs vaccins, parmi lesquels le V<sub>4</sub> qui a été essayé par plusieurs auteurs avec des résultats plus ou moins probants (1-9 et 12-15). Cet article expose les résultats de nos études supplémentaires sur la thermotolérance du vaccin V<sub>4</sub> lyophilisé.

1. CIRAD-EMVT, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort cedex, France.

Reçu le 19.11.1992, accepté le 8.12.1992.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Souche de virus

La souche de virus V<sub>4</sub> (UPM) de la maladie de Newcastle a été offerte au laboratoire de pathologie tropicale du CIRAD-EMVT en 1989 par le Professeur A.L. IBRAHIM de l'Université Pertanian (Malaisie). C'est un dérivé de la souche V<sub>4</sub> isolée en 1967 par SIMMONS en Australie (14) et qui a été soumise par la suite à des traitements successifs à 56 °C aboutissant à l'obtention d'une variante relativement plus thermostable (1).

### Fabrication du vaccin

La suspension virale, diluée avec du milieu de culture 199, est inoculée à la dose de 0,10 ml dans le sac allantoïdien des œufs embryonnés de poules orthoxéniques de 9 jours. Après 4 jours d'incubation à 37 °C, ces œufs sont refroidis à 4 °C pendant une journée avant la récolte du liquide allantoïdien. Cette suspension virale est mélangée, à égal volume, avec le stabilisateur HLS qui est composé de 10 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine et de 5 p. 100 de saccharose, avant la répartition sous volume de 5 ml par flacon.

Ce vaccin a été lyophilisé dans un appareil à plateaux (FTS System Inc., New York, États-Unis) et les flacons sont bouchés sous vide.

### Titrage du virus

Le contenu de chaque flacon du vaccin lyophilisé est reconstitué avec de l'eau physiologique puis dilué avec du milieu 199 avant l'inoculation dans la cavité allantoïdienne des œufs embryonnés orthoxéniques, 0,10 ml/œuf et dans 5 œufs/dilution. Après 4 jours d'incubation à 37 °C, le liquide allantoïdien de chacun est soumis au test d'hémagglutination. Le titre viral est calculé selon la méthode de REED et MUENCH (11). Le titre moyen est établi selon la moyenne géométrique des titres de 3 ou 6 flacons du même lot afin de pondérer l'influence des titres les plus élevés, notamment en cas de distributions trop dissymétriques des valeurs.

## Sélection de dérivés thermotolérants du virus $V_4$

Le vaccin lyophilisé est conservé à 45 °C dans une étuve. A différentes périodes, 3 flacons sont reconstitués et titrés séparément sur des oeufs embryonnés. La suspension virale correspondant à la dernière dilution positive est récoltée, relyophilisée puis réincubée à 45 °C. La sélection s'opère ainsi de suite pour obtenir des dérivés survivant le plus longtemps possible à 45 °C.

## Exposition du vaccin lyophilisé à différentes températures

A Maisons-Alfort (France), des flacons du vaccin lyophilisé ont été conservés soit à + 4°C dans des boîtes en polystyrène, soit à + 45 °C dans des boîtes en carton placées dans une étuve.

A Ouagadougou, au Burkina Faso, des flacons du même lot de vaccin ont été envoyés de France par voie aérienne avant d'être entreposés soit dans une chambre froide à + 4°C, soit à température ambiante. Dans ce dernier cas, ils ont été enrobés de plusieurs couches de papier ouaté avant d'être conservés, soit dans une boîte en carton déposée dans un poulailler, soit dans une jarre en terre cuite remplie de sable mouillé et placée sous un arbre à l'abri du soleil dans un endroit aéré, afin de favoriser l'évaporation de l'eau et l'abaissement de la température interne. Après différentes périodes d'exposition en Afrique, ces flacons de vaccin ont été renvoyés en France pour être titrés.

## RÉSULTATS

### Sélection de dérivés thermotolérants

La méthode de pression thermique à 45 °C à longs termes sur la souche de virus  $V_4$  (UPM) de la maladie de Newcastle, a permis la sélection de plusieurs dérivés thermorésistants, notamment :

- le  $V_4/276$  qui a résisté sous forme lyophilisée à deux séjours de 84 jours et 192 jours à 45 °C ;
- le  $V_4/433$  qui a survécu à trois périodes de traitements de 37, 192 et 204 jours à 45 °C ;
- le  $V_4/467$  qui est resté vivant après 192 et 275 jours à 45 °C.

Le dérivé  $V_4/276$ , le premier disponible, a été utilisé pour la fabrication du vaccin expérimental.

### Conservation du vaccin $V_4/276$ à Maisons-Alfort

Les flacons du vaccin lyophilisé  $V_4/276$  qui ont été gardés à 4 °C, au CIRAD-EMVT à Maisons-Alfort, contiennent en moyenne  $10^{10,4}$  DIO<sub>50</sub> (dose infectant 50 p. 100 des

œufs) dans les 14 premiers jours de conservation avec un titre minimal de  $10^{10,2}$  DIO<sub>50</sub>/flacon (tabl. I). Au bout de 126 jours, le titre moyen est resté à un bon niveau de  $10^{10}$  DIO<sub>50</sub> avec un minimum de  $10^{9,8}$  DIO<sub>50</sub>/flacon.

L'incubation du vaccin à 45 °C a fait chuter son titre moyen à  $10^{8,5}$  et  $10^{8,25}$  DIO<sub>50</sub>/flacon respectivement au bout de 7 et 14 jours, avec un minimum de  $10^{8,2}$ . Après 42 jours chaque flacon ne renferme plus qu'en moyenne  $10^{7,9}$  DIO<sub>50</sub> avec un minimum de  $10^{7,4}$  DIO<sub>50</sub> (tabl. I, fig. 1).

TABLEAU I Titres du vaccin  $V_4/276$  conservé à Maisons-Alfort (France).

Conservation		Numéro du flacon	Titre viral (DIO <sub>50</sub> en log <sub>10</sub> )			
Durée (jours)	Température (°C)		Individuel /0,10 ml	Moyenne géométrique		Minimal /flacon de 5 ml
				/0,10 ml	/flacon de 5 ml	
14	4	1	8,50	8,7	10,4	10,2
		2	9			
		3	8,63			
126	4	4	8,38	8,29	10	9,8
		5	8,32			
		6	8,17			
7	45	7	6,68	6,85	8,54	8,2
		8	7,38			
		9	6,5			
14	45	10	6,68	6,56	8,25	8,2
		11	6,5			
		12	6,5			
42	45	13	6,38	6,21	7,9	7,4
		14	6,5			
		15	5,75			

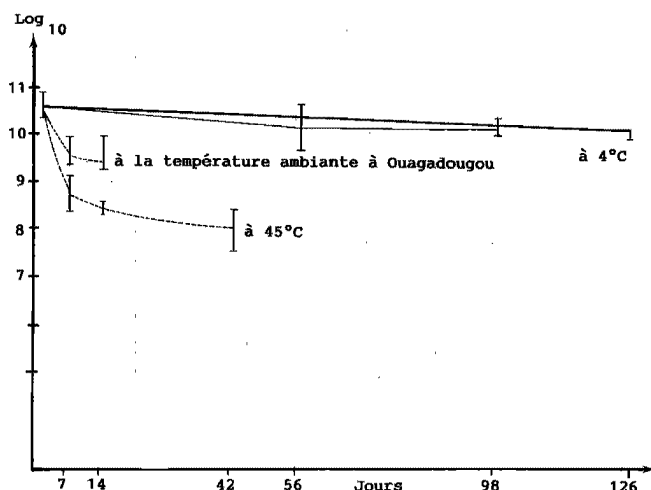


Fig. 1 : Courbes d'inactivation du vaccin  $V_4/276$  en fonction de la température et du temps de conservation.

## Conservation du vaccin V<sub>4</sub>/276 à 4°C à Ouagadougou

Malgré les tribulations du transport aérien (aller-retour) Paris-Ouagadougou où des ruptures de froid ont eu lieu, et une conservation à 4°C pendant 27 jours à Ouagadougou en plus de leur séjour allant de 29 à 71 jours dans la chambre froide à Maisons-Alfort, les flacons de vaccin ont gardé un titre élevé avec une moyenne de 10<sup>10</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon et un minimum de 10<sup>9,5</sup> (tabl. II, fig. 1).

**TABLEAU II Titres du vaccin V<sub>4</sub>/276 conservé à 4 °C à Ouagadougou (Burkina Faso).**

Conservation		Numéro du flacon	Titre viral (DIO <sub>50</sub> en log <sub>10</sub> )			
Durée (jours)	Température (°C)		Individuel /0,10 ml	Moyenne géométrique		Minimal /flacon de 5 ml
				/0,10 ml	/flacon de 5 ml	
27 jours à Ouagadougou + 29 jours à Maisons-Alfort	4	1	7,83			9,5
		2	8,83	8,34	10,03	
		3	8,38			
27 jours à Ouagadougou + 71 jours à Maisons-Alfort	4	4	8,17			9,87
		5	8,5	8,35	10,04	
		6	8,38			

## Conservation du vaccin V<sub>4</sub>/276 à la température ambiante à Ouagadougou

### Examen de la température ambiante

Au cours de la période des essais de conservation du vaccin V<sub>4</sub>/276, c'est-à-dire dans la première quinzaine de mois de juillet 1991, le temps était sec et ensoleillé avec seulement deux petites pluies ; la température a varié entre 24 et 35 °C (tabl. III).

La température nocturne a oscillé entre 24 et 32 °C, mais le plus souvent elle s'est confinée dans la tranche thermique 25-31 °C avec une fréquence cumulée de près de 90 p. 100 des cas. Plus de la moitié des relevés (54,16 p. 100 des cas) peut être classée dans la tranche 27-30 °C.

La température diurne a évolué entre 24 et 35 °C durant cette période, mais la plupart du temps, elle est restée

**TABLEAU III Température ambiante et temps à Ouagadougou.**

Date	Température minimale - maximale		Temps	Observations
	nocturne (°C)	diurne (°C)		
1.07.1991				Jour de mise en condition de 12 flacons de chaque lot
2.07.1991		32	sec	
3.07.1991	25-28	27-31	"	
4.07.1991	25-26	25-31	"	
5.07.1991	26-31	30-34	"	
6.07.1991	27-32	29-35	"	
7.07.1991	26-31	29-34	"	
8.07.1991	28-32	27-28	petite pluie	
				T° maximale : 35°C
				6 flacons de chaque lot sont remis à 4 °C
9.07.1991	24-26	26-31	sec	T° minimale : 24°C
10.07.1991	24-31	24-30	"	
11.07.1991	25-30	25-32	"	
12.07.1991	26-32	26-34	"	
13.07.1991	28-30	25-32	"	
14.07.1991	27-28	28-29	petite pluie	
15.07.1991	28-30			
				6 flacons de chaque lot sont remis à 4 °C

dans la tranche 26-32 °C avec une fréquence cumulée de 76,6 p. 100. Plus de la moitié des relevés (56,66 p. 100 des cas) sont compris dans la tranche 27-31 °C.

Les résultats des examens de températures à Ouagadougou durant la première quinzaine de juillet 1991 ont révélé que les différents lots du vaccin V<sub>4</sub>/276 au cours de leur séjour à l'extérieur, n'ont été soumis le plus souvent qu'à un effet thermique variant de 25 à 32 °C dans près de 89 p. 100 des cas (fig. 2). Leurs passages à des températures plus élevées sont relativement plus rares (7,4 p. 100 à 33-34 °C et 0,9 p. 100 à 35 °C). Ils n'ont été à aucun moment exposés à des températures supérieures à 35 °C. L'effet nuisible du soleil avec ses radiations ultraviolettes peut être considéré comme négligeable sur ces flacons de vaccin, grâce à leur emballage et à l'emplacement des récipients qui ont été gardés à l'ombre.

### Conservation du vaccin dans une boîte en carton à la température ambiante

Douze flacons de vaccin ont été conservés dans une boîte en carton placée dans un poulailler. Les titrages de 6 flacons ayant passé 7 jours à l'extérieur donnent une moyenne géométrique de 10<sup>9,4</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon avec un minimum de 10<sup>9,2</sup> (tabl. IV, fig. 1).

Après un séjour de 14 jours, les 6 autres flacons gardent encore un titre moyen de 10<sup>9,3</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon avec un minimum de 10<sup>9,2</sup>.

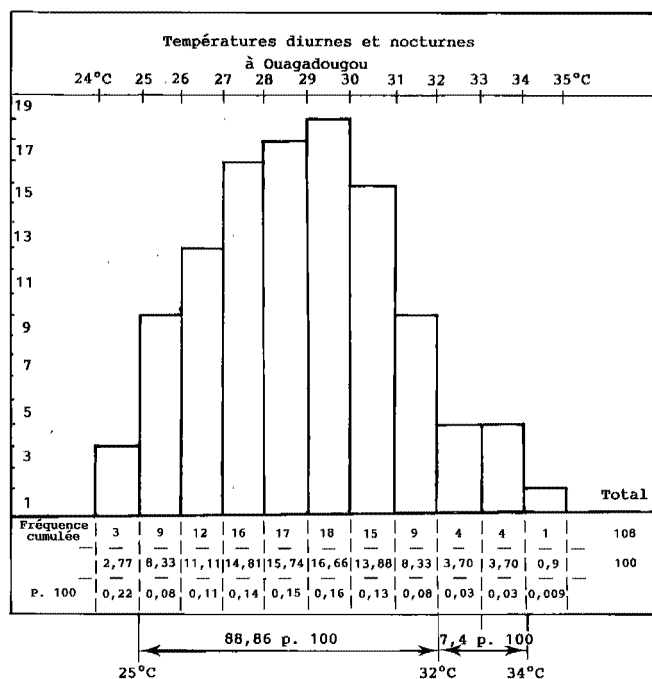


Fig. 2 : Histogramme des températures diurnes et nocturnes combinées à Ouagadougou (Burkina Faso) durant la première quinzaine du mois de juillet 1991.

TABLEAU IV Titres du vaccin V<sub>4</sub>/276 conservé dans un carton à la température ambiante d'Ouagadougou (Burkina Faso).

Durée (jours)	Température (°C)	Numéro du flacon	Titre viral (DIO <sub>50</sub> en log <sub>10</sub> )			
			Individuel /0,10 ml	Moyenne géométrique /0,10 ml	Minimal /flacon de 5 ml	
7	Température ambiante	1	7,83	7,76	9,45	
		2	7,83			
		3	7,63			
		4	7,5	7,77		9,46
		5	8			
		6	7,83			
14	Température ambiante	7	7,5	7,56	9,25	
		8	7,68			
		9	7,5			
		10	7,5	7,72		9,33
		11	8,17			
		12	7,5			

### Conservation du vaccin dans une jarre en terre cuite à la température ambiante

Douze flacons de vaccin lyophilisé ont été conservés dans une jarre en terre cuite remplie de sable mouillé et gardée sous un arbre.

Après 7 jours d'exposition, 6 flacons ont gardé un titre moyen de 10<sup>9,3</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon avec un minimum de 10<sup>9,2</sup> (tabl. V, fig. 1). Ce titre ne s'est pas abaissé après un séjour de 14 jours, au bout duquel la moyenne géométrique de 6 autres flacons est restée à 10<sup>9,37</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon avec un minimum de 10<sup>9,2</sup>.

TABLEAU V Titres du vaccin V<sub>4</sub>/276 conservé dans une jarre en terre cuite à la température ambiante d'Ouagadougou (Burkina Faso).

Durée (jours)	Température (°C)	Numéro du flacon	Titre viral (DIO <sub>50</sub> en log <sub>10</sub> )			
			Individuel /0,10 ml	Moyenne géométrique /0,10 ml	Minimal /flacon de 5 ml	
7	Température ambiante	1	7,5	7,58	9,27	
		2	7,63			
		3	7,63			
		4	7,68	7,66		9,35
		5	7,63			
		6	7,68			
14	Température ambiante	7	7,5	7,72	9,41	
		8	7,5			
		9	8,17			
		10	7,83	7,65		9,37
		11	7,63			
		12	7,5			

### DISCUSSION

Un vaccin vivant n'est pas conservable sous forme liquide à la température ambiante des pays chauds, car son titre viral tombe rapidement au-dessous du seuil d'efficacité. Par contre, sous forme lyophilisée, il peut résister pendant un certain temps aux rudes conditions climatiques. Les travaux de MARINER *et al* (10) sur un vaccin contre la peste bovine, ont montré l'importance de la qualité du stabilisateur et des différentes conditions de lyophilisation sur sa thermostabilité.

Le vaccin lyophilisé V<sub>4</sub>/276, conservé de façon continue à 4 °C à Maisons-Alfort, ou avec des ruptures de froid lors des transports aériens entre Paris et Ouagadougou, a gardé un titre élevé avec une moyenne de 10<sup>10</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon durant une centaine de jours. Sa courbe d'inactivation à 4 °C peut être assimilée à une droite en pente douce.

Son exposition à 45 °C avait des effets néfastes : il ne restait plus en moyenne que 10<sup>8,5</sup>, 10<sup>8,2</sup> et 10<sup>7,9</sup> DIO<sub>50</sub>/flacon, respectivement au bout de 7, 14 et 42 jours. La courbe d'inactivation est devenue biphasique avec une chute très forte durant les 7 premiers jours et une perte progressive plus lente dans les périodes suivantes (fig. 1).



Ce vaccin lyophilisé a prouvé sa thermotolérance dans le milieu ambiant à Ouagadougou, en gardant un titre moyen de  $10^{9.3}$  DIO<sub>50</sub>/flacon après 7 et 14 jours d'exposition à l'extérieur. Il s'est bien comporté parce que durant cette période d'observation (première quinzaine du mois de juillet 1991), la température oscillait le plus souvent entre 25 et 32 °C et elle n'a jamais dépassé 35 °C.

Lors de la distribution du vaccin lyophilisé aux éleveurs, certaines mesures sont susceptibles d'améliorer sa préservation : choix d'une saison fraîche pour lancer la campagne de vaccination ; transport et distribution effectués durant la nuit : les villageois, en recevant le vaccin aux points de rencontre, peuvent l'administrer aux volailles dès le lendemain, ils ont aussi la faculté de le conserver à l'abri du soleil pendant 1 à 2 semaines si la température ambiante ne dépasse pas 35 °C. Dans une région où la chaleur peut atteindre 45 °C à l'ombre, il est prudent d'utiliser ce vaccin dans un délai d'une semaine.

Comme les éleveurs doivent administrer eux-mêmes ce vaccin aux volailles vivant habituellement en liberté, il n'est pas raisonnable de préconiser des injections ou des

aérosols. L'usage de l'eau de boisson comme support du vaccin est possible (12, 15), mais elle n'est pas envisageable dans les villages africains à cause de sa mauvaise qualité durant la saison sèche et du refus des volailles de venir aux abreuvoirs pendant la saison des pluies. Il reste la méthode d'enrobage des grains alimentaires, juste avant leur distribution aux volailles. Elle serait moins coûteuse que l'emploi de l'aliment-vaccin qui est plus volumineux car il est tout préparé aux laboratoires avant le transport et la distribution aux éleveurs.

## REMERCIEMENTS

Nos plus vifs remerciements sont adressés au Professeur A.L. IBRAHIM qui nous a fourni gracieusement la souche de virus V<sub>4</sub> (UPM), ainsi qu'aux Docteurs C. TOUGE, G. COMBES et à leurs collaborateurs qui ont mis en œuvre des essais de conservation du vaccin à Ouagadougou.

NGUYEN-BA-VY. Evaluation of the heat tolerance of a freeze-dried V<sub>4</sub> vaccine against Newcastle's disease. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1992, 45 (3-4) : 235-240

A freeze-dried virus vaccine against Newcastle's disease was prepared using the heat tolerant derivative V<sub>4</sub>/276 of the virus strain V<sub>4</sub> (UPM). The viral mean titre was  $10^{10.4}$  EID<sub>50</sub> per vial after 14 days at + 4°C and  $10^{10}$  EID<sub>50</sub> after 126 days. Incubation at 45 °C for 7 and 14 days reduced the titre to  $10^{8.5}$  and  $10^{8.2}$  EID<sub>50</sub>, respectively. In addition, this preparation was exposed to ambient temperature at Ouagadougou (Burkina Faso) during the first fortnight of July 1991 when the temperature ranged from 25 to 32 °C, but never exceeded 35 °C. After 7 and 14 days of storage, the viral mean titre was  $10^{9.3}$  EID<sub>50</sub> per vial. This vaccine is intended to coat grains fed to African village chickens. *Key words* : Hen - Newcastle disease - Freeze-dried vaccine - Thermotolerance - Burkina Faso.

NGUYEN-BA-VY. Evaluación de la tolerancia térmica de vacuna V<sub>4</sub> liofilizada contra la enfermedad de Newcastle. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1992, 45 (3-4) : 235-240

Se fabricó una vacuna liofilizada contra la enfermedad de Newcastle a partir de un derivado termo-tolerante V<sub>4</sub>/276 de la cepa viral V<sub>4</sub> (UPM). La titulación promedio de cada tubo fue de  $10^{10.4}$  DIO<sub>50</sub> después de 14 días de conservación a + 4°C y de  $10^{10}$  DIO<sub>50</sub> después de 126 días. Mediante una incubación a 45 °C durante 7 y 14 días, el título bajo a  $10^{8.5}$  DIO<sub>50</sub> y  $10^{8.2}$  DIO<sub>50</sub> respectivamente. La vacuna fue también expuesta a la temperatura ambiente en Ouagadougou (Burkina Faso) durante la primera quincena del mes de julio de 1991, período durante el cual la temperatura ambiente oscila entre 25 y 32 °C, sin alcanzar nunca los 35 °C : después de 7 y 14 días al exterior, la vacuna mantuvo un título promedio de  $10^{9.3}$  DIO<sub>50</sub>/tubo. La vacuna sera utilizada como revestimiento de los granos destinados a la alimentación aviar en los pueblos africanos. *Palabras claves* : Gallina - Enfermedad de Newcastle - Vacuna liofilizada - Termotolerancia - Burkina Faso.

## BIBLIOGRAPHIE

- AINI (I.), IBRAHIM (A.L.), SPRADBROWN (P.B.), CH'NG (H.S.). Development of food pellet Newcastle disease vaccine. In : COPLAND (J.W.) Ed. Newcastle disease in poultry. A new food pellet vaccine. Canberra, Australia, ACIAR, 1987. P. 20 (Monograph n° 5)
- AINI (I.), IBRAHIM (A.L.), SPRADBROWN (P.B.). Vaccination of chicken against Newcastle disease with a food pellet vaccine. *Avian Path.*, 1990, 19 : 371-384.
- AINI (I.), IBRAHIM (A.L.). Field trials of a food-based vaccine to protect village chickens against Newcastle disease. *Res. vet. Sci.*, 1990, 49 : 216-219.
- BELL (I.G.), NICHOLLS (P.J.), NORMAN (C.), COOPER (K.), CROSS (G.M.). The serological responses of chickens to mass vaccination with a live V<sub>4</sub> Newcastle disease virus vaccine in the field and in the laboratory. 1. Meat chickens. 2. Layer pullets. *Aust. vet. J.*, 1991, 68 (3) : 85-89 ; 90-92.
- BELL (I.G.), NICHOLLS (P.J.), NORMAN (C.), AINI (I.), CROSS (G.M.). The resistance of meat chickens vaccinated by aerosol with a live V<sub>4</sub> Newcastle disease virus vaccine in the field to challenge with a velogenic Newcastle disease virus. *Aust. vet. J.*, 1991, 68 : 97-101.

6. FRENCH (E.L.), ST-GEORGE (T.D.), PERCY (J.J.). Experimental infection of domestic fowls with Australian Newcastle disease virus of low virulence and subsequent challenge with a virulent Newcastle disease virus. *Aust. vet. J.*, 1969, **45** : 481-485.
7. JAGNE (J.), AINI (I.), SCHAT (K.A.), FENNEL (A.), TOURAY (O.). Vaccination of village chickens in the Gambia against Newcastle disease using the heat-resistant food-pelleted V<sub>4</sub> vaccine. *Avian Path.*, 1991, **20** : 721-724.
8. JAYAWARDANE (G.W.L.), DE ALWIS (M.C.L.), BANDARA (D.). Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with V<sub>4</sub> vaccine delivered on processed rice grains. *Aust. vet. J.*, 1990, **67** : 364-366.
9. KIM (S.J.), SPRADBROW (P.B.). Administration of a vaccine prepared from the Australian V<sub>4</sub> strain of Newcastle disease virus by aerosol and drinking water. *Aust. vet. J.*, 1978, **54** : 486-489.
10. MARINER (J.C.), HOUSE (J.A.), SOLLOD (A.E.), STEM (C.), VAN DEN ENDE (M.C.), MEBUS (C.A.). Thermostability of a Vero cell adapted Rinderpest vaccine. In : AITVM Ed. "Livestock production and diseases in the tropics". Proc. 6th Intern. Conf. Inst. Trop. Vet. Med., Wageningen, The Netherlands, 28 August-1 September 1989. Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, 1990. Pp. 281-286.
11. REED (L.J.), MUENCH (H.). A simple method for estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, 1938, **27** : 493-497.
12. SAGILD (I.K.), HARESNAPÉ (J.M.). The status of Newcastle disease and the use of V<sub>4</sub> vaccine in Malawi. *Avian Path.*, 1987, **16** : 165-176.
13. SAMUEL (J.L.), SPRADBROW (P.B.). Selective oral vaccination against Newcastle disease by creep feeding young chicks in an open-range poultry flock. *Prev. vet. Med.*, 1991, **10** : 273-283.
14. SIMMONS (G.C.). The isolation of Newcastle disease virus in Queensland. *Aust. vet. J.*, 1967, **43** : 29-30.
15. SPRADBROW (P.B.), SAMUEL (J.L.). Oral Newcastle disease vaccination with V<sub>4</sub> virus in chickens : Comparison with other routes. *Aust. vet. J.*, 1991, **68** : 114-115.