

## مقارنة مستوى الأضداد الجسمية لبرامج تلقيح مختلفة ضد مرض النيوكاسل في فروج اللحم

قصي عارف قاسم\* و طارق سالم قبيع\*\*

\* قطاع خاص، \*\* فرع الأمراض، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

### الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة قياس مستوى المناعة في أفراخ فروج اللحم الملقحة بعدة طرق وعترات مختلفة من لقاح فيروس مرض نيوكاسل والمتبعة فعليا في حقول فروج اللحم في منطقة قره قوش لمعرفة أجود برنامج تلقيحي. تم إجراء مقارنة لثلاثة برامج تلقيحية ضد مرض نيوكاسل في حقول فروج اللحم عرق هابرد وعرق كوب. وأثبتت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي Haemagglutination inhibition test (HI) وجود الأجسام المضادة المتخصصة للمرض في أمصال جميع الأفراخ الملقحة وبمستويات مختلفة. ففي البرنامج الأول كان أعلى مستوى أضداد حيث بلغ  $\text{Log}_2(0.86)$  في أمصال الطيور الملقحة عن طريق ماء الشرب وبعمر 20 يوماً وبدون فرق معنوي عن بقية التلقيحات الأخرى  $P<0.05$ ، وفي البرنامج الثاني أعطى أعلى مستوى للأضداد حيث بلغ  $\text{Log}_2(0.76)$  في أمصال الطيور الملقحة بماء الشرب وبعمر 18 يوماً وبفرق معنوي عن بقية التلقيحات الأخرى  $P<0.05$ ، وأما في البرنامج الثالث كان أعلى مستوى للأضداد حيث بلغ  $\text{Log}_2(0.76)$  في أمصال الطيور الملقحة بماء الشرب وبعمر 25 يوماً وبدون فرق معنوي عن بقية التلقيحات الأخرى  $P<0.05$ .

## Comparative study of antibodies level using different programs against Newcastle disease in broilers

Q. A. Kassim\* and T. S. Qubih\*\*

\*Private sector, \*\*Department of Pathology and Poultry Diseases, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mousl, Iraq

### Abstract

This study was design to determine the level of Immunity in brioler that vaccinated with different methods and strains of Newcastle virus vaccine in Brioler farms in Kurakosh region to know which one is the best. Acomparison was made between three farms programs vaccinated against Newcastle disease in briolers breeds hubbard and cobb. The result of Haemagglutination inhibition test (HI) shows presence of specific Antibodies in the sera of all birds vaccinated at different levels, The Programe (one) show highest antibodies titer in the sera of birds vaccinated by drinking water (DW) at 20 days post vaccination  $\text{Log}_2(0.86)$  with out significant difference than other vaccinations  $P<0.05$ . Program (two) show highest antibodies titer in the sera of birds vaccinated by D.W. at 18 day  $\text{Log}_2(0.76)$  with significant difference than other vaccinations  $P<0.05$ . Program (three) show highest antibodies titer in the sera of birds vaccinated by DW at 25 days  $\text{Log}_2(0.76)$  with out significant difference than other vaccinations  $P<0.05$ .

Available online at <http://www.vetmedmosul.org/ijvs>

مؤديا إلى حدوث هلاكات وخسائر اقتصادية كبيرة (1) وهو من الأمراض المنتشرة عالميا (2) وقد سجلت حالات في قارات آسيا وأفريقيا وأمريكا الجنوبية (3) وكذلك يُعدُّ من الأمراض المستوطنة في البلدان النامية (4) ومرض

### المقدمة

يُعدُّ مرض نيوكاسل من الأمراض الفيروسية المعدية والذي يصيب الدواجن وبعض الأنواع الأخرى من الطيور

الثلاث (واطنة و متوسطة وعالية) وكان حجم الكرات المائية (50) مايكرون وتم استخدام الماء المقطر في هذه العملية. وطريقة الحقن تم حقن الأفراخ تحت الجلد خلف الرقبة وبجرعة لقاحية بحجم (0,1 مل) وتم استخدام هذه الطريقة في حالة استخدام اللقاح الزيتي المقطول.

تم أخذ نماذج الدم في المرة الأولى بعمر يوم واحد عن طريق قطع الرأس وأما في المدد اللاحقة فقد تم أخذ الدم من الوريد الجناحي. وكان عدد العينات التي تم أخذها 15 عينة وبصورة عشوائية قبل إجراء عملية التلقيح التالية لغرض فحصها والكشف عن المستوى المناعي للتلقيح الذي سبقه وهكذا وأما في حالة التلقيح الأخير فإن العينات تم أخذها بعد عملية التلقيح بعشرة أيام.

وتم إجراء اختبار التلازن الدموي وحساب (4HAU) حيث اعتمدت طريقة (9). واستعملت أربعة وحدات تلازن و استعمال 1% كريات دم حمراء.

تم إجراء التحليل الاحصائي باستخدام برنامج SPSS1996 وباستخدام طريقة التحليل الوحيدة للفرق ANOVA (one way analysis of variance) (10). وكما تم حساب geomatric mean ولو غارتم Log2 باستخدام طريقة (11).

#### النتائج

يتضح من جدول رقم (2) للبرنامج الأول أن هنالك زيادة غير معنوية في Log2 لمعيار الأجسام المضادة لمرض نيوكاسل عن مستوى المناعة الأمية التي كانت Log2 (0.56) عند تلقيح الأفراخ بعنزة LaSota (شركة انترفيت الهولندية) عن طريق ماء الشرب بعمر 10 أيام ليصل المعيار إلى Log2 (0.69)، واستمر هذا الارتفاع في معيار الأجسام المضادة عند التلقيح بعمر 20 يوم عن طريق ماء الشرب أيضا بلقاح عنزة LaSota (شركة انترفيت الهولندية) ليصل المعيار إلى Log2 (0.86) وأما التلقيح الثالث الذي استخدم فيه لقاح عنزة LaSota (شركة انترفيت الهولندية) عن طريق الرش بعمر 33 يوم فقد أعطى نتيجة مقاربة عن المعيار الذي سبقه إلا أنه لم يستمر بالزيادة بل انخفض قليلا حيث وصل إلى Log2 (0.83). ولكن الاتجاه العام في معيار الأجسام المضادة لمرض نيوكاسل في التلقيحات الثلاثة كان بزيادة عن مستواه في المناعة الأمية حيث بلغ معامل الارتباط  $R^2=0.838$ .

ويتضح من جدول رقم (2) أيضا أن نتائج التلقيح في البرنامج الثاني تشبه إلى حد كبير تلك التي تم الحصول عليها بالمناعة الأمية التي كانت Log2 (0,44) حيث وصل معيار الأجسام المضادة إلى Log2 (0,46) عند التلقيح بلقاح عنزة Clone30 (شركة انترفيت الهولندية) بعمر 7 يوم عن طريق ماء الشرب ولم تكن هذه الزيادة معنوية. وارتفع المعيار بصورة معنوية ( $P<0.05$ ) في معيار الأضداد في التلقيح الثاني الذي استخدم فيه لقاح عنزة LaSota (شركة انترفيت الهولندية) وبمعمر

نيوكاسل يعد واحد من اكبر المعوقات في صناعة الدواجن في العالم (5) حيث يؤدي إلى ظهور أعراض مرضية مختلفة وحسب العترات وهو يصيب الطيور الأليفة والبرية على حد سواء مسببا حالات مرضية قد تكون هضمية أو تنفسية أو حتى عصبية (6) ويؤدي حدوثه إلى هلاكات في القطيع المصاب تصل إلى نسبة 90% وقد تصل النسبة إلى 100% (6) وقد يؤدي إلى الموت المفاجي في الحالات فوق الحادة في الطيور المصابة (7) و إلى خسائر اقتصادية بسبب المبالغ الكبيرة التي تصرف على الأدوية واللقاحات المستعملة في السيطرة على المرض وانتشاره وكذلك الهلاكات التي يسببها هذا المرض (8) ونظرا لاختلاف برامج التلقيح المتبعة في حقول فروج اللحم في هذه المنطقة الموبوءة وكذلك اجتهاد العديد من الأطباء البيطريين وأصحاب حقول الدواجن في تطبيق برامج تلقيحية عشوائية غير علمية ولعدم وجود برنامج مقنع وناجح. لذلك ارتأينا أن يكون هدف الدراسة هو تقييم بعض البرامج التلقيحية المعدة ضد مرض نيوكاسل مناعيا والمستخدمة في الوقت الحاضر في حقول فروج اللحم في منطقة قره قوش والتي على أثرها قد يتم تحديد برنامج لقاحي كفوء.

#### المواد و طرائق العمل

تم إجراء التجربة في الفترة ما بين شهر حزيران وشهر تشرين الأول سنة 2008م. استخدمت في هذه الدراسة أفراخ فروج اللحم من عرق كوب Cobb 308 في الحقلين الأول والثاني وأما في الحقل الثالث فقد استخدم فروج اللحم من عرق هابرد Hubbard وتم لحصول على الأفراخ (من قبل أصحاب الحقول) من شركة الشمال/طقق/محافظة أربيل بالنسبة لعرق كوب Cobb ومن شركة لأمين/الشلالات/محافظة نينوى بالنسبة لعرق هابرد Hubbard، وكان عدد الأفراخ في الحقل الأول والثاني والثالث 10000 فرخه في كل حقل تم تربية الأفراخ في أماكن مختلفة من منطقة قره قوش وكانت التربية أرضية وقدم العلف والماء بشكل حر وحسب تعليمات الشركات المجهزة.

استعملت ثلاثة لقاحات عنزة لاسوتا وعنزة كلون 30 من شركة انترفيت الهولندية وهما من اللقاحات الحية المضعفة اما اللقاح الثالث فهو زيتي مبطل وهو من شركة سيفا المجرية.

تمت دراسة ثلاثة نماذج من البرامج اللقاحية المستعملة في حقول منطقة قره قوش وكما مدرج في جدول رقم (1). حيث استخدمت طريقة ماء الشرب تم تلقيح الأفراخ بهذه الطريقة وبأعمار مختلفة واستخدم فيها ماء الإسالة الصافي وتم تسخينه ثم تبريده ثم استخدامه في عملية التلقيح وكذلك تمت إضافة حليب الفرز (2,5 غم/لتر ماء) في بعض التلقيحات بعد تعطيش الأفراخ لمدة 2-3 ساعات. وطريقة الرش تم استخدام جهاز الرش الأمريكي الصنع. Model No.1026 BG Atomist. 220 Volts AC/DC.50/60 cycle.Amps 3.5 K.L.Corporation.LOWELL Mishigen 49331. Made in USA ذي الخرطوم وذو السرعة

بعمر 3 أيام بلقاح عترة Clone30 (شركة انترفيت الهولندية) ثم استمر معيار الأجسام المضادة بالارتفاع عند تلقيح الأفراخ ثانية بعمر ٥ أيام بلقاح بالعترة المتوسطة الضراوة (لقاح زيتي) عن طريق الحقن تحت الجلد حيث وصل معيار الأجسام المضادة إلى Log2 (0.66) وقد عزز التلقيح لمرّة ثالثة وباستخدام لقاح عترة LaSota (شركة سيفا المجرية) وبعمر 25 يوم عن طريق ماء الشرب هذا المعيار المتصاعد للأجسام المضادة ليصل إلى Log2 (0.76) وانعكس هذا الارتفاع المتناسق بقيمة R2 والتي بلغت 0.948.

18 يوم عن طريق ماء الشرب ليصل المعيار إلى Log2 (0.76). وأما التلقيح الثالث حيث وصل المعيار إلى Log2 (0.63) عند تلقيح الأفراخ بعمر 30 يوم بلقاح عترة LaSota (شركة انترفيت الهولندية) عن طريق الرش. وكان ذلك واضحا في قيمة معامل الارتباط R2 والتي بلغت =0.551. كذلك فان جدول رقم (2) يوضح الزيادة في معايير الأجسام المضادة في البرنامج الثالث والتي اتصفت بالزيادة المضطربة مع كل تلقيح عن مستوى معيار المناعة الأمية التي كانت Log2 (0.39)، حيث ارتفع المعيار إلى Log2 (0.59) عند تلقيح الأفراخ

جدول رقم (١) يبين عمر الافراخ ونوع العترة وطريقة التلقيح للبرامج المستخدمة في عملية التلقيح.

عدد مرات التلقيح	البرنامج الاول			البرنامج الثاني			البرنامج الثالث		
	العمر بالايام	الفترة	طريقة التلقيح	العمر بالايام	الفترة	طريقة التلقيح	العمر بالايام	الفترة	طريقة التلقيح
التلقيح الاول	١٠	لاسوتا	ماء الشرب	Clone 30	Clone 30	ماء الشرب	٣	Clone 30	ماء الشرب
التلقيح الثاني	٢٠	لاسوتا	ماء الشرب	لاسوتا	لاسوتا	ماء الشرب	٥	زيتي	تحت الجلد
التلقيح الثالث	٣٣	لاسوتا	ماء الشرب	لاسوتا	لاسوتا	ماء الشرب	٢٥	لاسوتا	ماء الشرب

جدول رقم (٢) يبين المستوى المناعي ومعامل الارتباط للبرامج المستخدمة في عملية التلقيح.

المعيار المناعي	البرنامج الاول	البرنامج الثاني	البرنامج الثالث
المناعة الامية	0.56	0.44	0.39
التلقيح الاول	0.69	0.46	0.59
التلقيح الثاني	0.86	0.76	0.66
التلقيح الثالث	0.83	0.63	0.76
معامل الارتباط	0.828	0.55	0.948

\*الارقام تمثل لو غارتم ٢ لمعيار اضداد مرض النيوكاسل.

#### المناقشة

إن الهدف من إعطاء اللقاح هو توليد استجابة مناعية كافية لمنع حدوث المرض. إن التلقيح بفيروس مرض نيوكاسل في بعض الحالات يؤدي إلى توليد مستوى مناعي غير كافٍ لحماية الأفراخ من خطر الإصابة لمدة معينة ولهذا السبب يلجأ الأطباء البيطريون إلى تكرار عملية التلقيح ولعدة مرات ومن المعروف أن المناعة المتولدة من جراء اللقاحات الحية المضعفة تعتمد على فوعة عترة ذلك اللقاح فمثلا العترة الضعيفة B1 تنتج مناعة ضعيفة في حين أن تعريض قطعان أمهات فروج اللحم لعدة جرعات من اللقاح الحي المضعف وبفترات قياسية ينتج عنه مناعة كافية لحمايتها من خطر التعرض للإصابة الحقلية.

في دراستنا هذه تم الكشف عن المستوى المناعي لثلاثة برامج فروج لحم اثنان منها عرق كوب و واحد عرق هابرد من عمر يوماً وحتى عمر 42 يوم وتم قياس المناعة بوساطة استخدام اختبار تثبيط التلازن الدموي HI بعد كل عملية تلقيح في تلك الحقول الثلاثة ذوات البرامج اللقاحية المختلفة، حيث كان مستوى المناعة المكتسبة من الأمهات (المناعة الأمية) في البرنامج الأول Log2 (0.56) وفي البرنامج الثاني Log2 (0.44) وفي البرنامج الثالث Log2 (0.39). وبالمقارنة يلاحظ أن الفارق بسيط وغير معنوي إحصائياً إذ تراوحت الأرقام بين Log2 (0.39) و Log2 (0.56).

وهذا متوقع لأن الأفراخ الناتجة من هذه الأمهات سبق أن تم تلقيحها ولعدة مرات خلال مدة الإنتاج سواء عن طريق ماء الشرب أو الرش أو الحقن واستعملت عترة مختلفة في التلقيح منها ضعيفة حية مثل B1, LaSota ومنها عترات متوسطة الضراوة. وهذا يتفق مع الباحث (12) الذي ذكر انه خلال فترة الإنتاج يتم إعطاء أمهات البيض عدة جرعات من اللقاحات المختلفة وبعده طرق. ويلاحظ أن هنالك ارتفاعاً ملحوظاً في كل الحقول بالمستوى المناعي بعد التلقيح الأول فالبرنامج الأول كان المستوى المناعي فيه بعد التلقيح الأول Log2 (0.69) وفي البرنامج الثاني Log2 (0.46) وأما في البرنامج الثالث فكان المستوى المناعي بعد التلقيح الأول Log2 (0.59).

وفي البرنامج الثالث كانت بلقاح عترة Clone30 وبعمر 3 أيام عن طريق ماء الشرب وهنا نلاحظ أن هنالك عدة عوامل تتداخل مع المناعة المتولدة أو وجود المناعة المكتسبة من الأمهات التي تعادل قسم من اللقاح وهذا يتفق مع الباحثين (13) وكذلك فإن المستوى المناعي الناتج من استخدام عترة مختلفة

الثاني) فيلاحظ أن نتائج المستوى المناعي للأفراخ عند استخدام طريقة الرش كان أقل من الطريقة الأخرى في البرنامج الثالث في مستوى المناعة المتكونة إلا أن هذه الحقول قاومت وبقيت بدون إصابة وقد يكون السبب هو تكوين مناعة موضعية عن طريق قناة الدم وغدة الهرديريان أو القناة الهضمية وهذا يتفق مع الباحث (19).

إن استعمال برنامج مكثف من التلقيحات في المناطق الموبوءة مثل منطقة قره قوش ضروري جدا من أجل بقاء مناعة قوية وهذا يتفق مع الباحث (20). وعلى أي حال فإن السلطات البيطرية يفترض أن تضع برنامجا لقاحيا يقي الأفراخ في جميع الحقول التي في الخدمة من أجل الإبقاء على اقتصاد غذائي جيد في العراق. ومن ملاحظة المستوى المناعي يلاحظ أن تأخير التلقيح في الأيام الأولى يعطي مستوى مناعيا أفضل وخصوصا في اليوم السابع أو الثامن ويعود ذلك إلى أن إعطاء اللقاح في الأيام الأولى يؤدي إلى معادلة قسم من اللقاح مع المناعة الأمامية وهذا يتفق مع الباحث (18).

ومن النتائج يتضح أن إعطاء اللقاح الحي المضعف عن طريق الرش بعد عمر 4 أسابيع يكون أفضل لأنه يولد مناعة كافية لمنع حدوث المرض بسبب تكوين مناعة موضعية في جسم الأفراخ وهذا يتفق مع الباحث (18). في حين أن إعطاء لقاح مقتول بعمر 3 و 5 أيام وكذلك إعادة التلقيح في الأيام الواردة في البرنامج الثالث يولد مناعة غير عالية وغير متجانسة وأما إعطاؤه عن طريق ماء الشرب وإعادة التلقيح بطريقة بالرش فقد كانت نتائجها أفضل وهذا استنادا على أنه لم تحصل إصابة في الحقلين الأول والثاني ولكنها حدثت في الحقل الثالث في الأسبوعين الأخيرين من فترة التربية.

#### المصادر

1. Jan Mast CM, Mireille DT, Benedicte IB, Bernard C, Guy M, Thierry VB. Vaccination of chicken embryos with escape mutants of laSota Newcastle disease virus induces a protective immune response. Vaccine. 2000;24:1756-1765.
2. Oladele SB, Abdu P, Nok AJ, Esievo KAN. Survey for serum neuraminidase, free and erythrocyte surface sialic acid from chickens vaccinated against Newcastle disease and the unvaccinated chickens reared under semi-intensive management system. Inter J Poult Sci. 2007;6:933-936.
3. Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). Avian pathology. 2001;30:117-128.
4. Thekisoe MM, Mbatia PA, Bisschop SP. Different approaches to the vaccination of free ranging village chickens against Newcastle disease in Qwa-Qwa, South Africa. Vet Microbiol. 2004;101:23-30.
5. Said UL, Abdu P, Teck dek LB, Umoh JU, Usman M, Oladele SB. Newcastle disease in Nigeria. Nig Vet J. 2006;27:23-32.
6. OIE, Office International Epizootic Disease Information, 5 August 2005;18(31). <http://www.oie.int/eng/info/hebdof/>.
7. Brown C, King DJ, Seal BS. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. Vet Pathol. 1999;36:125-132.
8. Alexander D. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly

يكون مختلفا وهذا يتفق مع الباحثين (14) وهذا التداخل واضح وخصوصا في حالة كون المدد متقاربة أي بعد ثلاثة أيام أو غيرها ويلاحظ أن أعلى مستوى كان عند التلقيح بعشرة أيام وهذا لا يتفق مع ما ورد في بحث (15) حيث ورد فيه أن أعلى مستوى للمناعة يكون بعد التلقيح بعمر سبعة أيام. ويلاحظ أن التلقيح الثاني في البرنامجين الأول والثاني كان عن طريق ماء الشرب وبلقاح عترة LaSota وبالعمريين 20 يوما (البرنامج الأول) و 18 يوما (البرنامج الثاني) وإن المستوى المناعي كان في البرنامج الأول بعد التلقيح الثاني  $\log_2(0.86)$  وكان في البرنامج الثاني  $\log_2(0.76)$  وهو ارتفاع ملحوظ وواضح ومعنوي في الحقل الثاني وهذا يتفق مع الباحث (15) وأما بالنسبة للبرنامج الثالث فقد كان المستوى المناعي بعد التلقيح الثاني  $\log_2(0.66)$  ويعزى السبب في ذلك إلى التقارب الحاصل بين مدد التلقيح مما أدى إلى تعادل قسم من اللقاح مع المناعة المكتسبة من الأمهات وهذا يتفق مع ما ورد في بحث (16) واللدان ذكرا أنه المناعة المكتسبة من الأمهات في الأفراخ قد تؤثر على فعالية اللقاح عند إعطائه أول 4 أسابيع من العمر.

والملاحظ في التلقيح الثالث وفي البرامج الثلاثة استعملت نفس العترة وهي عترة LaSota ولكن طرق التلقيح كانت مختلفة وكذلك الأعمار. ففي البرنامجين الأول والثاني استعملت طريقة الرش وبأعمار مختلفة وهي 33 يوما في (البرنامج الأول) و 30 يوما في (البرنامج الثاني) وأما في البرنامج الثالث فقد استعمل ماء الشرب وبعمر 25 يوما وكان المستوى المناعي للبرامج الثلاثة على النحو الآتي: البرنامج الأول  $\log_2(0.83)$  البرنامج الثاني  $\log_2(0.63)$  والحقل الثالث  $\log_2(0.76)$ .

إن طريقة الرش في البرنامج الأول أعطت مستوى عاليا من المناعة أكثر من البرنامج الثاني ويبدو أن هنالك خطأ في التلقيح أو اللقاح نفسه فالبرنامج الأول يتفق مع ما ورد عند الباحث (17).

وفي البرنامج الثالث التلقيح الثالث استمر المستوى المناعي بالصعود ليصل إلى أعلى مستوى له بعد تلقيح الأفراخ بعمر 25 يوم بلقاح عترة لاسوتا ولكنه لم يحمي الأفراخ من خطر الإصابة وهذا يتفق مع الباحث (18).

إن قابلية تكوين مناعة جيدة في المجموعات المختلفة تعتمد على نوع اللقاح المستعمل وطريقة التلقيح فقد استخدمت عترات مختلفة حيث أن عترة LaSota استخدمت في جميع البرامج التلقيحية الثلاثة ولكن طرق إعطائها اختلفت مابين ماء الشرب والرش وقد استخدمت طريقة الحقن في الأيام الأولى من العمر في البرنامج الثالث وهذا الجمع بين طريقة الحقن والطرق الأخرى والتي غالبا ما تستخدم في منطقة موبوءة مثل منطقة قره قوش وهي منطقة مكتظة بالحقول التي يربى فيها دجاج فروج اللحم وكانت النتائج جيدة وهذا يتفق مع ما ورد في دراسة (19).

وبالنسبة للبرنامجين الأول والثاني والذين لقحا بطريقة الرش وبالأعمار 33 يوما (البرنامج الأول) و 30 يوما (البرنامج

15. Giambrone JJ. Laboratory evaluation of the immune response of young broiler chicken vaccinated against Newcastle disease under field conditions. *Poult Sci.* 1981;60:1204-1208.
16. Gangopadhyay PK, Mallick BB. Studies on Newcastle (Ranikhat) disease 2. Immunity developed after vaccination with F strain of chick hatched from eggs of Immunized hens. *Indian Vet J.* 1971;48:6-12.
17. Bacallao A, Pilar H, Viamontes O. Statistical evaluation of the results of haemagglutination inhibition test in broiler vaccinated against Newcastle disease by aerosol or through drinking water. *Revista Cubana de Ciencia Avicola.* 1988;15:59-65.
18. Ahmad M, Mamoon C, Muhammad F, Hamad B. RASHID. Evaluation of Two Vaccination Schemes Using Live Vaccines against Newcastle Disease in Chickens. *Turk J Vet Anim Sci.* 2007;31(3): 165-169.
19. Osman E, Ucan US. Evaluation of three different vaccination regimes against Newcastle disease in central Anatolia. *Turk J Vet Anim Sci.* 2007;27:1065-1069.
20. Van Boven M, Annemarie B, Teun HF, Leo H, Guus K. Herd Immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian pathology.* 2008;37(1):1-5.
9. Gould EA, Clegg JCS. Growth, Titration and purification of Alphavirus and flavi virusis. In: *Virology. A practical approach* Mahy BW, editors. Press.Oxford.1987.65-67p.
10. SPSS<sup>®</sup> 7.5 for windows. Computer software 10.00, SPSS Inc. Head quantens. wachen Prive, Chicage, illiaois 60606, USA 1996.
11. Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, William JE. Isolation and Identification of Avian pathologists. Creative printing company Inc. 2011 East Main street, Endwell New York.1980;13760.155 p.
12. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: Calneck BW, editors. *Disease of poultry* 10<sup>th</sup> ed. Ames, IA: Iowa state University press. 1997;541-569p.
13. Wyeth PJ, Chettle NJ. Use of infectious bursal disease vaccine in chickens with maternally derived antibodies. *Vet Record.* 1990;126: 577-578.
14. Borland LJ, Allan WH. Development of the AG68L strain of Newcastle disease vaccine by modification of the existing AG68L vaccine by clone purification and its subsequent testing. *Avian Path.* 1980;9:257-267.