مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۲ (۵۶-۵۱)

مقایسه روش‌های c-ELISA و RT-PCR در تشخیص طاعون نشخوارکنندگان کوچک از نمونه‌های بالینی مرحله اولیه بیماری در گله‌های گوسفند و بز استان کرمانشاه

آزاده فروغی[۱]*، برومند چهارآیین[۲]، عبدالغفار اونق[۳]، کریم مردانی[۴]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ۲. استادیار ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی استان کرمانشاه، ۳. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ۴. دانشیار گروه بهداشت و کنترل‌کیفی موادغذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۰، تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۲۳)

چکیده

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) بیماری عمومی و مسری گوسفند و بز است. عامل بیماری (PPRvirus) در جنس موربیلی‌ویروس (Morbillivirus) از خانواده پارامیکسوویریده (Paramyxoviridae) قراردارد. جداسازی ویروس علاوه بر زمان‌بر بودن، نیازمند تجهیزات مربوطه است. الایزای رقابتی (Competitive ELISA) برای تشخیص این ویروس، دارای حساسیت و ویژگی بالایی است. اما بطورکلی، تکنیک PCR مناسب‌تر و با حساسیت بالا گزارش شده است. ازآنجاکه این بیماری در ایران اندمیک بوده و غرب کشور و بخصوص استان کرمانشاه دارای کانون‌های متعدد این بیماری است؛ لذا در این مطالعه، نشخوارکنندگان کوچک استان کرمانشاه از نظر بیماری PPR به روش الایزای رقابتی و نیز روش PCR با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) مورد بررسی قرارگرفتند و میزان حساسیت دو روش فوق در تشخیص بیماری در مرحله اولیه، بویژه پیش از ظهور اسهال مقایسه گردید. در RT-PCR، از تعداد۳۰ نمونه،۲۳ نمونه منفی و هفت نمونه مثبت شدند (۲۳/۳۳٪ مثبت). دو نمونه از نمونه‌های سرم خون مربوط به این هفت حیوان، در الایزا منفی شده و پنج مورد باقیمانده، در الایزا هم مثبت شدند. بنابراین درصد همپوشانی این دو روش ۷۱/۴۲٪ است. علاوه بر آن، حساسیت PCR ۶/۷۰٪ بیشتر از c-ELISA است. علی‌رغم هزینه بیشتر RT-PCR نسبت به الایزا، دقت و سرعت تشخیص بیماری، مزیت ویژه RT-PCR است که می‌تواند جایگزین جداسازی ویروس و الایزای رقابتی برای کنترل و مبارزه با بیماری شود. با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری در جهت بررسی شیوع و ریسک‌فاکتورهای وقوع این بیماری در مناطق مختلف ایران صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: طاعون نشخوارکنندگان کوچک، الایزای رقابتی، RT-PCR، کرمانشاه

* نویسنده مسئول: آزاده فروغی Email: dr.a.foroughi@gmail.com

Comparison of c-ELISA and RT-PCR Methods in Detection of Peste Des Petits Ruminants in Early Stage from Clinical Specimens in Goats and Sheep in Kermanshah Province

A. Foroughi[1]*, B. Chaharaein[2], A. Ownagh[3], K. Mardani[4]

1. Resident of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University
2. Assiatant professor of Virology, Agriculture and Natural Resources Research Centre of Kermanshah Province
3. Assiatant professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, 4. Associate professor of Molecular Epidemiology, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University

(Received: Sep. 14, 2013; Accepted:May 10, 2013)

Abstract

Peste des petits ruminants are a systemic and highly contagious disease in goats and sheep. Causing agent (Peste des petits ruminants virus) is a Morbillivirus in Paramyxoviridae. The disease is enzootic in Iran and the west of Iran especially Kermanshah province has a lot of serious problems in this case. Therefore, in this study domestic small livestock were investigated by both serological (Competitive ELISA) and molecular (RT-PCR) methods in Kermanshah. The aim was comparison of sensitivity of these methods in diagnosis of PPR in early stage especially before diarrhea onset. By RT-PCR assay, 23 from 30 samples turned out negative and 7 has become positive (23.33% positive). 2 samples from sera related to those 7 animals were negative in ELISA test and the other 5 sera were positive. So, overlapping percent of the assays is 71.42. Moreover, sensitivity of PCR is 6.70% more than cELISA. In spite of more costs of the PCR than ELISA, accuracy and speed of PCR is a specific advantage which suggests virus isolation and competitive ELISA can be substituted by PCR to control and prevention of the illness. Regarding to the results, it is suggested to do more investigations on the prevalence of the disease in Iran to gain clear information about prevalence and risk factors of the infection in different parts of the country.

Keywords: Peste des petits ruminants, PPR, c-ELISA, RT-PCR, Kermanshah

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (Peste des petits ruminants) بیماری عمومی و فوق‌العاده مسری گوسفند و بز است. بیماری با تب بالا، ترشحات چشمی و بینی، تورم دهانی زخم‌دار، التهاب ملتحمه، نکروز و زخم‌شدن غشاء مخاطی دستگاه گوارش منجر به اسهال شدید (گاستروانتریت) و پنومونی مشخص می‌شود. ویروس عامل بیماری (PPRV) در جنس موربیلی‌ویروس (*Morbillivirus*) است که در خانواده پارامیکسوویریده (Paramyxoviridae) قرار دارد. بیماری خسارات اقتصادی قابل‌توجهی به کشاورزان و دامداران وارد می‌کند. مرگ‌ومیر و واگیری می‌تواند تا ۹۵ درصد باشد (Gul *et al*., 2001). در ایران برای نخستین‌بار، بیماری PPR توسط بازرگانی و همکاران در ایلام گزارش و خسارات اقتصادی ناشی از بیماری شامل از بین‌رفتن بره و بزغاله، کاهش شیر، هزینه های دارو و واکسن، ۱/۵ میلیون دلار برآورد شد. این بیماری در ۲۸ استان ایران گزارش شده است (Bazargani *et al*., 2006). از آنجا که علایم این بیماری شبیه به بیماری‌های دیگر مانند زبان‌آبی، اکتیمای واگیردار، پاستورولوز و ... می‌باشد، تأیید آزمایشگاهی جهت تشخیص قطعی بیماری لازم است (Munir *et al*., 2009). تشخیص PPR عمدتاً بر اساس جداسازی ویروس و روش‌های سرولوژیک مانند آگار ژل ایمنودیفیوژن، کانترایمنو الکتروفورزیس و الیزا است، اما روش‌های مذکور، به‌طور گسترده‌ای در حال جایگزینی با روش‌های تشخیص بر پایه ژنوم مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آنزیم رونوشت‌برداری معکوس (RT-PCR) و هیبریداسیون اسیدنوکلئیک هستند؛ زیرا این روش‌ها از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردارند (Raj *et al*., 2008). برای جداسازی ویروس PPR، به‌طور معمول از سلول‌های Vero استفاده می‌شود. این ویروس بر روی سلول‌های B95a به‌سادگی رشد نمی‌کند. برای کشت این ویروس، می‌توان از کشت اولیه سلول‌های کلیه و پوست گوسفند و بز استفاده کرد. در هرحال جداسازی دست‌کم نیازمند چندین (۳-۲) پاساژ برای دیده‌شدن CPE اختصاصی ویروس است (Saliki *et al*., 1993). بنابراین جداسازی ویروس علاوه بر آنکه زمان‌بر است، نیازمند تجهیزات مربوط به کشت سلول بوده که در اغلب کشورهای درحال توسعه دسترسی به آنها با محدودیت‌های زیادی همراه است. سنجش ELISA در تشخیص PPRV، از جداسازی ویروس، حساس‌تر گزارش شده است (Saliki *et al*., 1993). الایزای رقابتی (Competitive ELISA) علاوه بر اینکه زمان لازم برای تشخیص ویروس PPR را کاهش می‌دهد، دارای حساسیت و ویژگی بسیار بالایی در تشخیص این ویروس است (Couacy-Hymann *et al*., 2007). به‌طور کلی، در میان تکنیک‌های متنوع ابداع‌شده برای تشخیص ویروس PPR، تکنیک PCR مناسب‌تر و با حساسیت بالا گزارش شده است و علاوه بر آن، درکنار حساسیت، این تکنیک می‌تواند در تشخیص توالی متغیر PPRV جداشده از نواحی جغرافیایی مختلف استفاده شود (Forsyth and Barret, 1995). از آنجا که این بیماری در ایران اندمیک بوده و غرب کشور و به‌خصوص استان کرمانشاه دارای کانون‌های متعدد این بیماری می‌باشد؛ در این مطالعه، دام‌های اهلی کوچک استان کرمانشاه از نظر بیماری PPR به روش سرولوژیک (c-ELISA) و نیز روش مولکولی (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. هدف این مطالعه مقایسه میزان حساسیت دو روش یادشده در تشخیص بیماری در مرحله اولیه بیماری به ویژه پیش از ظهور اسهال است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

فهرست کانون‌های آلوده از اداره کل دامپزشکی کرمانشاه اخذ و به محض دریافت گزارش بروز بیماری، به کانون مورد نظر مراجعه و پس از تکمیل پرسشنامه حاوی پرسش‌هایی از جمله سن، جنس، گونه، وضعیت ظاهری دام، علایم بالینی مشخص، تعداد دام‌های گله، تعداد دام های مبتلا، زمان ابتلا و ...، از دام‌های بیمار و مشکوک (گوسفند و بز) که علایم بالینی مرحله نخست بیماری ازجمله تب بالا را نشان می‌دادند، نمونه‌های لازم – خون در لوله‌های آزمایش و سواب‌های چشم و بینی در محیط‌های انتقالی (PBS حاوی پنی‌سیلین، جنتامایسین، استرپتومایسین و آمفوتریسین B)– اخذ و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، از نمونه‌های خون، سرم تهیه شد و سرم‌ها و سواب‌های قرارگرفته در محیط انتقالی، تا استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه‌سانتیگراد نگهداری شدند.

تست الایزا

جهت انجام الایزای رقابتی (Competitive ELISA)، نمونه‌های سرم خون با استفاده از کیت الایزای رقابتی (ID VET, France) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از خواندن OD نمونه‌ها در دستگاه

Archive of SID

www.SID.ir

ELISA Reader و در طول موج ۴۵۰nm، برای هر نمونه درصد رقابت (Competition%) طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{NC = Competition\%= } \frac{\text{OD sample}}{\text{OD NC}} \times ۱۰۰ \text{ کنترل منفی}$$

نمونه با OD کمتر یا مساوی ۵۰٪ مثبت، بیشتر از ۵۰٪ و کمتر یا مساوی ۶۰٪ مشکوک و بیشتر از ۶۰٪ منفی در نظر گرفته شدند.

استخراج RNA

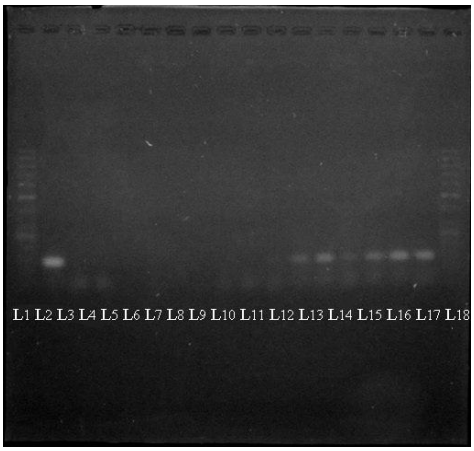
استخراج RNA از سواب‌های چشم و بینی با استفاده از کیت (BIONEER, Korea) انجام شد. RNA استخراج‌شده جهت استفاده بعدی در واکنش RT-PCR، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

RT-PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آنزیم رونوشت‌برداری معکوس به‌صورت تک‌مرحله‌ای(One-step) و با استفاده از PreMixهای تجاری (BIONEER, Korea)، و پرایمرهای forward primer (5-AGAGTTCAATATGTTRTTAGCCTCCAT-3) و reverse primer (5-TTCCCCARTCACTCTYCTTTGT-3) بر اساس توالی قسمتی از ژن N که کدکننده‌ی پروتئین نوکلئوکپسید است (Batten *et al*., 2011)، در دستگاه ترمال سایکلر (BIORAD, USA) طبق برنامه‌ی زیر انجام گرفت: برای سنتز cDNA دمای ۵۰°C به‌مدت ۱۵ دقیقه و ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و سپس جهت تکثیر آن، دمای ۹۵°C برای دناتوره‌شدن (Denaturing) به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰°C برای اتصال (Annealing) به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲°C برای امتداد (Extension) به‌مدت ۴۵ ثانیه و به تعداد ۳۵ سیکل انجام شد. برای مرحله امتداد نهایی (Final extension) دمای ۷۲°C به‌مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد (Batten *et al*., 2011). در تمامی واکنش‌های PCR کنترل مثبت و کنترل منفی لحاظ شد. محصول نهایی PCR (Amplicon) با اندازه ۱۴۱ bp در ژل آگارز ۲٪ حاوی Safe view الکتروفورزشده و زیرUV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت و از آن عکس تهیه شد.

نتایج

در انجام تست RT-PCR از تعداد ۳۰ نمونه، ۲۳ نمونه منفی و هفت نمونه مثبت شدند (۲۳/۳۳٪ مثبت). دو نمونه از نمونه‌های سرم خون مربوط به این هفت حیوان، در تست الایزا منفی شده و پنج مورد باقیمانده، در الایزا هم مثبت شدند. این نتایج نشان می‌دهد که حساسیت آزمایش PCR در اوایل بیماری، ۶/۷۰ درصد بیشتر از الایزای رقابتی است.



شکل ۱. نتایج RT-PCR بر اساس توالی قسمتی از ژن N کدکننده پروتئین نوکلئوکپسید (اندازه محصول bp ۱۴۱ است).
L1 وL18: مارکر ۵۰bp
L2: کنترل مثبت (نمونه ویروس تهیه‌شده از موسسه تحقیقات و سرم‌سازی رازی)
L3: کنترل منفی (PreMix + پرایمرهای reverse و forward + آب‌مقطر)
L4-L10: نمونه‌های منفی
L11-L17: نمونه‌های مثبت

نتیجه‌گیری و بحث

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (Peste des Petits Ruminants)، بیماری حاد نشخوارکنندگان کوچک است که سبب کاهش بازدهی و خسارات اقتصادی فراوان در بسیاری از کشورها می‌شود (Abbas *et al*., 2012). این بیماری، در ایران برای اولین‌بار در سال ۱۳۷۳ هجری‌شمسی (۱۹۹۴ میلادی) و بعد از آن از اکثر نقاط ایران گزارش شده است (Barani *et al*., 2008). Zahur et al. (2011) در بررسی سرواپیدمیولوژی بیماری PPR در پاکستان، ۴۵/۵٪ نشخوارکنندگان کوچک اهلی (گوسفند و بز) را از نظر آنتی‌بادی بر علیه این بیماری مثبت یافتند و این بیماری را در این کشور اندمیک اعلام کردند و آن را تهدید جدی برای امنیت غذا و اقتصاد دامپروری دانستند (Zahur *et al*., 2011). Ingle *et al*. (2008) میزان شیوع سرمی PPR را در بزهای منطقه‌ای از هند ۲۶/۱۳٪ گزارش کردند. در مطالعه‌ای مشابه، Chavan *et al*. (2009) شیوع سرمی PPR را در بزهای یک ناحیه واقع در ایالت ماهاراشترای هند، به‌طور متوسط ۴۶/۰۱٪ گزارش کردند و تفاوت اندک بین

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌های خود و مطالعات مشابه پیشین در آن منطقه را ناشی از تفاوت در تعداد نمونه، سن، اعمال مدیریتی بهتر، رطوبت و فصل ذکر کردند. شیوع سرمی ویروس PPR در گوسفند، بز و گاوهای نگهداری‌شده در انستیتو تحقیقاتی محصولات دامی پاکستان بررسی و میزان آن، به‌ترتیب ۲۸/۷۵٪، ۸۲/۷۲٪ و ۸٪ گزارش شد (Rashid *et al*., 2008). Khan *et al*. (2007)، شیوع این ویروس را در گوسفندان و بزهای استان پنجاب پاکستان ۴۳/۳۳٪ اعلام کرده که موارد مثبت سرمی (Seropositive) به‌طور معنی‌داری در گوسفندان بیشتر از بزها بود (۵۱/۲۹٪ در برابر ۳۹/۰۲٪). در مطالعه‌ای در ایالت ماهاراشترای هند، شیوع سرمی PPR را ۶۴/۳۱٪ گزارش کردند (Bhaskar *et al*., 2009). Hilan *et al*. (2006) در بررسی سرمی این بیماری، حضور آنتی‌بادی ضد PPR را در گله‌های بز ۶۲/۵٪ و در گله‌های گوسفند ۷۳/۸٪ گزارش نمودند. در جریان شیوع PPR در سال ۲۰۱۱ در تانزانیا، ۵۶/۷٪ گوسفندان و بزهای مورد بررسی با روش RT-PCR مثبت اعلام شدند (Muse *et al*., 2012). Kwiatek *et al*. (2007)، دریک شیوع بیماری PPR، از تعداد ۲۱ نمونه شامل سواب‌های رکتال، بینی و دهانی و نیز مایع پریکارد، در نه نمونه ویروس را به روش RT-PCR تشخیص دادند. در سال ۲۰۰۷، در ۷۷٪ بزها و ۲۹٪ گوسفندان در تبت چین، این ویروس به روش RT-PCR تشخیص داده شد (Wang *et al*., 2009).

ویرمی ۳-۲ روز پس از وقوع عفونت و ۲-۱ روز قبل از بروز اولین علائم بالینی رخ می‌دهد. به‌دنبال ویرمی، انتشار ویروس به طحال، مغزاستخوان و مخاط دستگاه گوارش و تنفس اتفاق می‌افتد (Aslam *et al*., 2009)، اما تولید آنتی‌بادی از نوع IgG که سبب محافظت در برابر عفونت مجدد می‌شود و با تست‌های سرولوژیک قابل تشخیص است، از ۷-۶ روز پس از وقوع عفونت آغاز می‌شود. به‌طور معمول، تشخیص ویروس PPR در نمونه‌های کلینیکی از طریق تست‌های سرولوژیک و یا جداسازی ویروس است که علاوه بر حساسیت کمتر و دارای زحمت بودن، غالباً تفسیر آنها نیز مشکل است؛ اما روش‌های تشخیصی مبتنی بر اسیدنوکلئیک مانند RT-PCR بر این محدودیت‌ها فائق آمده و به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص ویروس به‌کار برده شده‌اند (Durrani *et al*., 2010). RT-PCR روش استاندارد برای تشخیص ویروس PPR در سراسر جهان است و حساسیت و سرعت انجام آن از روش‌های جداسازی ویروس و الایزا بیشتر است (Li *et al*., 2010).

در این مطالعه، از تعداد ۳۰ نمونه سواب چشم و بینی، ۲۳ مورد در RT-PCR منفی شده و هفت مورد مثبت شد. نمونه‌های سرم خون مربوط به این حیوانات با روش الایزا از نظر وجود آنتی‌بادی‌های ضد PPR، در پنج مورد مثبت شده و در دو مورد دیگر منفی شدند. پس می‌توان گفت درصد همپوشانی (Overlapping) این دو روش ۷۱/۴۲٪ است و علاوه بر آن، حساسیت روش PCR ۶/۷۰ درصد بیشتر از روش c-ELISA است. با اینکه هزینه‌های RT-PCR و الایزا به‌ازای هر رأس حیوان به‌ترتیب حدود ۱۵۰۰۰۰ و ۳۰۰۰۰ ریال است، اما دقت و سرعت تشخیص بیماری، مزیت ویژه روش RT-PCR است که می‌تواند جایگزین روش‌های جداسازی ویروس و الایزای رقابتی برای کنترل و مبارزه با بیماری گردد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه‌ی حاضر، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری در جهت بررسی شیوع این بیماری در استان کرمانشاه و نیز در استان‌های دیگر ایران صورت گیرد تا وضعیت روشنی از میزان شیوع این بیماری و ریسک‌فاکتورهای وقوع آن در مناطق مختلف ایران به‌دست آید. همچنین لازم است که در مطالعات بعدی، ویروس‌های جداشده، از نظر ژنتیکی بررسی‌شده و با ژنوم ویروس‌های گزارش شده در ایران و سایر نقاط دنیا به‌ویژه کشورهای همجوار مقایسه شوند.

REFERENCES

Abbas F, Ullah A, Awan MA, Tariq MM., Ali M, Khan FA, Bajwa MA, Ahmad Z, Rashid N, Wadood A (2012) Production of Tissue Culture Based Peste Des Petits Ruminants (PPR) Vaccine at CASVAB, Quetta, Pakistan. Pak j life and social Sci, 10(1): 80-83.

Aslam M, Abubakar M, Anjum R, Saleha S, Ali Q (2009) Prevalence of Peste Des Petits Ruminants Virus (PPRV) in Mardan, Hangu and Kohat District of Pakistan; Comparative Analysis of PPRV Suspected serum samples using Competitive ELISA (cELISA) and Agar Gel Immunodiffusion (AGID). Vet. World, 2(3): 89-92.

Barani S, Torabi G, Bahonar M (2008) An investigation on ten years outbreak of PPR (Peste des petits ruminants) … 15th Iranian Veterinary Congress [In Persian].

Batten CA, Banyard AC, King DP, Henstock MR, Edwards L, Sanders A, Buczkowski

Archive of SID

www.SID.ir

H, Oura CCL, Barret T (2011) A real time RT-PCR assay for the specific detection of Peste des petits ruminants virus. J. of Virol. Methods, 171(2): 401-404.

Bazarghani TT, Charkhkar S, Doroudi J, BaniHassan E (2006) A Review on peste des petits ruminants (PPR) with special reference to PPR in Iran. J. of Vet. Med, 53, Supplement 1, 17-18.

Bhaskar SR, Deshmukh VV, Chopade NA, Rautmare SS (2009) Seroprevalence of peste des petits ruminants in Maharashtra. Indian J. of Animal Res, 43(4): 285-287.

Chavan VV, Digraskar SU, Dhonde SN, Bedarkar SN (2009) Seromonitoring of Peste Des Petits ruminants (PPR) in goats (*Capra hircus*) of Parbhani region of Maharashtra. Vet. World, 2(8): 299-300.

Couacy-Hymann E, Bodjo SC, Tounkara K, Koffi YM, Ohui AH, Danho T, Bronsvoort BMD (2007) Comparison of two competitive ELISAs for the detection of specific peste-des-petits-ruminant antibodies in sheep and cattle populations. African J. of Biotech, 6(6): 732-736.

Durrani AZ, Kamal N, Mehmood N, Shakoori AR (2010) Prevalence of Peste des Petits Ruminants (KATA) in Sheep and Goats of Punjab. Pakistan J. of Zool, 42(3): 211-216.

Forsyth M, Barrett T (1995) Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. Research, (39): 151-163.

Gul Y, Dabak M, Issi M, Basbug O (2001) Elazig'da 1999 yilinda koyun ve kecilerde gozlenen peste des petits ruminants olgulari (Peste des petits ruminants cases observed in sheep and goats at 1999 year in Elazıg province of Turkey). Fırat Üniv. Sag. Bil. Derg, (15): 35–38.

Hilan C, Daccache L, Khazaal K, Beaino T, Massoud E, Louis F (2006) Sero-surveillance of "peste des petits ruminants" PPR in Lebanon. Lebanese Sci. J, 7(1).

Ingle VC, Sivakumar P, Kalorey DR, Pote DE, DhamannaPatil PS, Vanjari SS, Chavhan SK (2008) Seroprevalence of blue tongue and pestes des petits ruminants among goats in Nagpur district of Vidarbha region. Tamil Nadu J. of Vet. & Animal Sci, 4(4): 142-145.

Khan HA, Siddique M, Arshad MJ, Khan QM, Rehman SU (2007) Sero-prevalence of peste des petits ruminants (PPR) virus in sheep and goats in Punjab province of Pakistan. Pakistan Vet. J, 27(3): 109-112.

Kwiatek O, Minet C, Grillet C, Hurard C, Carlsson E, Karimov B, Albina E, Diallo A, Libeau G (2007) Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan. J. of Compar. Pathol, (136): 111-119.

Li L, Bao J, Wu X, Wang Z, Wang J, Gong M, Liu C, Li J (2010) Rapid detection of peste des petits ruminants virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. J. of Virol. Methods, (170): 37–41.

Munir M, Abubakar M, Khan MT, Abro SH (2009) Comparative efficacy of single radial haemolysis test and countercurrent immunoelectroosmo-phoresis with monoclonal antibodies-based competitive ELISA for the serology of peste des petits ruminants in sheep and goats. Bulgarian J. of Vet. Med, 12(4): 246−253.

Muse EA, Matondo RB, Karimuribo ED, Misinzo G, Albano MO, Gitao GC (2012) Clinico-pathological findings of the 2011 outbreak of Peste des Petits Ruminants (PPR) in Tandahimba district, southern Tanzania. Res. Opin. In Animal and Vet. Sci, 2(4): 256-262.

Raj GD, Rajanathan TMC, Kumar CS, Ramathilagam G, Hiremath G, Shaila MS (2008) Detection of peste des petits ruminants virus antigen using immunofiltration and antigen-competition ELISA methods. Vet. Microbiol, (129): 246–251.

Rashid A, Asim M, Hussain A (2008) Seroprevalence of peste des petits ruminants (PPR) virus in goats, sheep and cattle at Livestock Production Research Institute Bahadurnagar Okara. J. of Animal Pl. Sci, 18(4).

Saliki JT, Libeau G, House JA, Mebus CA, Dubovi EJ (1993) Monoclonal antibody based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific

Archive of SID

www.SID.ir

detection and titration of peste-des-petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera. J. of Clin. Microbiol, 31(5): 1075-1082.

Wang Z, Bao J, Wu X, Liu Y, Li L, Liu C, Suo L, Xie Z, Zhao W, Zhang W, Yang N, Li J, Wang S, Wang J (2009) Peste des Petits Ruminants Virus in Tibet, China. Emer. Infec. Dis.www.cdc.gov/eid, 15(2).

Zahur AB, Ullah A, Hussain M, Irshad H, Hameed A, Jahangir M, Farooq MS (2011) Sero-epidemiology of peste des petits ruminants (PPR) in Pakistan. Preven. Vet. Med, (102): 87– 92.

Archive of SID

www.SID.ir