مجله علمي - پژوهشي زيست شناسي جانوري تجربي

سال اول، شماره چهارم، بهار ۱۳۹۲ (۱۰-۱)

مقايسه روش‌های c-ELISA و RT-PCR در تشخيص طاعون نشخوارکنندگان کوچک از نمونه‌هاي باليني مرحله اوليه بيماري درگله‌های گوسفند و بز استان کرمانشاه

آزاده فروغی*، برومند چهارآيين[1]، عبدالغفار اونق[2]، کريم مردانی[3]

۱. استاديار ويروس‌شناسی، مرکز تحقيقات کشاورزی و منابع‌طبيعی استان کرمانشاه
۲. استاديار گروه ميکروبيولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
۳. دانشيار گروه بهداشت‌وکنترل‌کيفی موادغذايی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

چکيده

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) بيماری عمومی و مسری گوسفند و بز است. عامل بيماری (PPRvirus) در جنس موربيلی‌ويروس (Morbillivirus) از خانواده پاراميکسوويريده (Paramyxoviridae) قراردارد. جداسازي ويروس علاوه‌بر زمان‌بربودن، نيازمند تجهيزات مربوطه است. الايزاي رقابتي (Competitive ELISA) براي تشخيص اين ويروس، داراي حساسيت و ويژگي بالايي است. اما بطوركلی، تکنيک PCR مناسبتر و با حساسيت بالا گزارش شده است. ازآنجاکه اين بيماری در ايران اندميک بوده و غرب کشور و بخصوص استان کرمانشاه دارای کانون‌های متعدد اين بيماری است؛ لذا در اين مطالعه، نشخوارکنندگان کوچک استان کرمانشاه از نظر بيماری PPR به روش الايزای رقابتی و نيز روش PCR با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) مورد بررسی قرارگرفتند و ميزان حساسيت دو روش فوق در تشخيص بيماري در مرحله اوليه، بويژه پيش از ظهور اسهال مقايسه گرديد. 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 اين هفت حيوان، در الايزا منفی شده و پنج مورد باقيمانده، در الايزا هم مثبت شدند. بنابراين درصد همپوشانی اين دو روش ۷۱/۴۲% است. علاوه بر آن، حساسيت PCR ۶/۷۰% بيشتر از c-ELISA است. عليرغم هزينه بيشتر RT-PCR نسبت به الايزا، دقت و سرعت تشخيص بيماري، مزيت ويژه RT-PCR است که ميتواند جايگزين جداسازي ويروس و الايزاي رقابتي براي کنترل و مبارزه با بيماري شود. با توجه به نتايج بدست آمده در مطالعه حاضر، پيشنهاد می‌شود که مطالعات بيشتری در جهت بررسی شيوع و ريسک‌فاکتورهای وقوع اين بيماری در مناطق مختلف ايران صورت گيرد.

واژه‌های کليدی: طاعون نشخوارکنندگان کوچک، الايزای رقابتی، RT-PCR، کرمانشاه

*نويسنده مسئول: آزاده فروغی، دانشجوی دکترای تخصصی ميکروبيولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
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*, B. Chaharaein, A. Ownagh, K. Mardani

ABSTRACT

Peste des petits ruminants is 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

مقدمه

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (Peste des petits ruminants) بیماری عمومی و فوق-العاده مسری گوسفند و بز است. بیماری با تب بالا، ترشحات چشمي و بيني، تورم دهاني زخم‌دار، التهاب ملتحمه، نکروز و زخم‌شدن غشاء مخاطي دستگاه گوارش منجر به اسهال شديد (گاستروانتريت) و پنومونی مشخص مي‌شود. ويروس عامل بيماری (*PPRV*) در جنس موربيلی‌ويروس (*Morbillivirus*) است که در خانواده پارامیکسوویریده (Paramyxoviridae) قرار دارد. بيماري خسارات اقتصادي قابل‌توجهي به کشاورزان و دامداران وارد مي‌کند. مرگ‌ومير و واگيري مي‌تواند تا ۹۵ درصد باشد (Gul *et al.*, 2001). در ايران براي نخستين‌بار، بيماري PPR توسط بازرگاني و همکاران در ايلام گزارش و خسارات اقتصادي ناشي از بيماري شامل از بين‌رفتن بره و بزغاله، کاهش شير، هزينه هاي دارو و واکسن، ۱/۵ ميليون دلار برآورد شد. اين بيماري در ۲۸ استان ايران 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 عمدتا" بر اساس جداسازي ويروس و روش‌های سرولوژیک مانند آگار ژل ایمنودیفیوژن، کانترایمنوالکتروفورزیس 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 هیبرید اسیدنوکلئیک هستند؛ زیرا این روش‌ها از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردارند (Raj *et al.*, 2008). براي جداسازي ويروس PPR، به‌طور معمول از سلول‌هاي Vero استفاده مي‌شود. اين ويروس بر روي سلول‌هاي B95a به‌سادگي رشد نمي‌کند. براي کشت اين ويروس، مي‌توان از کشت اوليه سلول‌هاي کليه و پوست گوسفند و بز استفاده کرد. در هرحال جداسازي دستکم نيازمند چندين (۳-۲) پاساژ براي ديده‌شدن CPE اختصاصي

ویروس است (Saliki *et al.*, 1993). بنابراین جداسازي ویروس علاوه بر آنکه زمان‌بر است، نیازمند تجهیزات مربوط به کشت سلول بوده که در اغلب کشورهاي درحال توسعه دسترسي به آنها با محدودیت‌هاي زیادي همراه است. سنجش ELISA در تشخیص PPRV، از جداسازي ویروس، حساس‌تر گزارش شده است (Saliki *et al.*, 1993). الایزاي رقابتي (Competitive ELISA) علاوه بر اینکه زمان لازم براي تشخیص ویروس PPR را کاهش مي‌دهد، داراي حساسیت و ویژگي بسیار بالایي در تشخیص این ویروس است (Couacy-Hymann *et al.*, 2007). به‌طور کلی، در میان تکنیک‌هاي متنوع ابداع‌شده براي تشخیص ویروس PPR، تکنیک PCR مناسبتر و با حساسیت بالا گزارش شده است و علاوه بر آن، درکنار حساسیت، این تکنیک مي‌تواند در تشخیص توالي متغیر PPRV جداشده از نواحي جغرافیایي 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 بیماري در مرحله اولیه بیماري بویژه پیش از ظهور اسهال است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

فهرست کانون‌هاي آلوده از اداره کل دامپزشکي کرمانشاه اخذ و به محض دریافت گزارش بروز بیماری، به کانون مورد نظر مراجعه و پس از تکمیل پرسشنامه حاوي پرسش‌هایی از جمله سن، جنس، گونه، وضعیت ظاهري دام، علایم بالیني مشخص، تعداد دام‌های گله، تعداد دام هاي مبتلا، زمان ابتلا و ...، از دام‌های بیمار و مشکوک (گوسفند و بز) که علایم بالیني مرحله نخست بیماري ازجمله تب بالا را نشان مي دادند، نمونه‌هاي لازم - خون در لوله‌های آزمایش و سواب‌های چشم و

بینی در محیط‌های انتقالی (PBS حاوی پنی‌سیلین، جنتامایسین، استرپتومایسین و آمفوتریسینB)- 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- درجه-سانتیگراد 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 ELISA Reader و در طول موج nm ۴۵۰، برای هر نمونه درصد رقابت (Competition%) طبق فرمول زیر محاسبه شد:

Competition% = ——— × 100

کنترل منفی= NC

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- درجه‌سانتیگراد نگهداری شد.

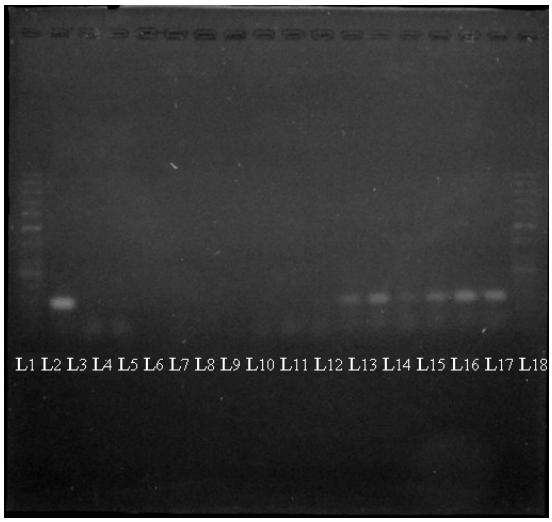
RT-PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آنزیم رونوشت‌برداری معکوس به-صورت تک‌مرحله‌ای (One-step) و با استفاده از PreMix های تجاری (BIONEER, Korea) و پرایمرهای forward primer (5-AGAGTTCAATATGTTRTTAGCCTC CAT-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 به-مدت 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 تمامي واکنش‌هاي PCR کنترل مثبت و کنترل منفي لحاظ شد. محصول نهايي PCR (Amplicon) با اندازه ۱۴۱ bp در ژل آگارز ۲% حاوي Safe view الکتروفورز شده و زیر UV 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 بیماري، ۶/۷۰ درصد بیشتر از الایزای رقابتي است.



شکل ۱. نتایج RT-PCR بر اساس توالی قسمتی از ژن N کدکننده پروتئین نوکلئوکپسید (اندازه محصول ۱۴۱ bp 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 و همکاران در بررسی سرواپیدمیولوژی بیماری PPR در پاکستان، ۴۵/۵% نشخوارکنندگان کوچک اهلی (گوسفند وبز) 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 و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان شیوع سرمی PPR را در بزهای منطقه‌ای از هند ۲۶/۱۳% گزارش کردند. در مطالعه‌ای مشابه، چاوان و همکاران در سال ۲۰۰۹ شیوع سرمی PPR را در بزهای یک ناحیه واقع در ایالت ماهاراشترای هند، به‌طور متوسط ۴۶/۰۱% گزارش کردند و تفاوت اندک بین 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). خان و همکاران در سال ۲۰۰۷، 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 ٦٤/۳۱% گزارش کردند (Bhaskar *et al.*, 2009). Hilan و همکاران (۲۰۰٦) در بررسی سرمی این بیماری، حضور آنتی‌بادی ضدPPR 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 و همکاران (۲۰۰۷)، 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، غالبا 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 بیماري، مزیت ویژه‌ی روش RT-PCR است که مي‌تواند جایگزین روش‌هاي جداسازي ویروس و الایزاي رقابتي براي کنترل و مبارزه با بیماري 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 and 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 and 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 and 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 H, Oura CCL and 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, and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 Elaz?g province of Turkey). F?rat Univ. Sag. Bil. Derg. (15): 35–38.

Hilan C, Daccache L, Khazaal K, Beaino T and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and Dubovi EJ (1993); Monoclonal antibody based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific 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 and Farooq MS (2011); Sero-epidemiology of peste des petits ruminants (PPR) in Pakistan. Preven. Vet. Med. (102): 87– 92.