

KOYUN VE KEÇİ VEBASI (PPR-Peste des petits ruminants) VİRUS İZOLASYONU, PATOJENİTESİ VE VERO HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ATTENÜASYONU ÇALIŞMALARI

Veli GÜLYAZ, Nesrin ÇELEN
Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İstanbul

Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet : Bu çalışmada PPR (peste des petits ruminants) hastalığı belirtileri gösteren koyundan PPR virusu vero hücre kültüründe 2. pasajda izole edildi. SN testi ve RT-PCR ile virusun identifikasyonu (PPR(P)VG) yapıldı. Virusun attenüasyonu amacıyla vero hücre kültüründe 40 seri pasajları yapıldı. Koyunlarda yapılan patojenite çalışmalarında epruvasyonu takiben 5. günde koyunlarda vücut ısılarının 40-41.5 °C dereceye yükseldiği, ısı artışlarının 4-5 gün sürdüğü, klinik bulgular olarak koyunlarda göz yaşı ve burun akıntısı, öksürük, ağız mukozasında hiperemi olduğu, yapılan otopside akciğerlerin apikal loplarında lezyonlar olduğu gözlemlendi. 10.,20.,30. ve 40. pasajlarda yapılan patojenite çalışmalarında virusun koyunlar için patojen olduğu saptandı.

Anahtar sözcükler : Koyun ve keçi vebası, PPR, izolasyon, adaptasyon, attenüasyon, patojenite

The isolation of PPR virus and pathogenicity and attenüation studies on vero cell culture

Summary : In this study, PPR virus was isolated on vero cell culture at the 2 nd pasage level from infected sheep. PPR virus (PPR(P)VG) was identified by SNT and RT-PCR methods. In the patojenicity study, temperatures of epruvated sheep were determined as between 40 and 41 °C. As clinical signs, catarrhal ocular and nasal discharges, coughing and hyperemia in the oral cavity were found. The lesions at the post mortem examination were pneumonia in the apical lops. In order to attenüate the virus, virus were passaged on vero cell culture 40th times. The virus was pathogen for sheep At the 10.,20.,30. and 40.th passage levels.

Key words : PPR (peste des petits ruminants),isolation, adaptation, attenuation, pathogenicity

GİRİŞ

Koyun ve keçi vebası (Peste Des Petits Ruminants = PPR) morbilli virusu tarafından oluşturulan akut seyirli viral bir enfeksiyondur. Hastalık etkeni sığır vebası virusu, distemper virusu ve measles virusu ile yakın antijenik ilişki içinde olup Paramyxoviridae familyasında yer almaktadır. Virus pH 4.0 ile 10 arasında stabildir. Hastalığa koyunlar ve özellikle keçiler duyarlıdır. Hayvanlar arasında bulaşma direkt kontakt temasla olur (6,7,8,9).

PPR hastalığı Afrika, Arabistan yarımadası, Orta doğuda ve ülkemizde yaygın şekilde görülmektedir (5,11,14). Hastalık hayvanlar arasında hava yolu ile bulaşmaktadır. Hastalığın inkubasyon periyodu 4-6 gündür. Fakat bu süre 3-10 gün arasında değişebilir. Klinik belirtiler 41 °C ye çıkan ateş ile başlar ve ateş 3-5 gün sürer. Hayvanlarda iştahsızlık, solunum güçlüğü görülür. Seröz burun ve göz yaşı akıntısı oluşur. Ateş yükselmesinin başlangıcından itibaren 4 gün içinde hayvanlarda ağız boşluğunda damaklarda hiperemi, eroziv lezyonlar ve salya akıntısı görülür. Hastalığın ileri devrelerinde kanlı ishal ortaya çıkar, solunum güçlüğü, pnömoni, öksürük, abdominal solunum tipik belirtilerdir. Morbidite %100, şiddetli salgınlarda mortalite %100 e çıkar. Orta şiddetle salgınlarda mortalite %50 yi bulmaz (1,2,11,15).

Bu çalışmanın amacı ,enfekte koyundan PPR virusunun izolasyonu, koyunlarda deneysel hastalık olgusunun klinik ve patolojik olarak incelenmesi, izole edilen virusun vero hücre kültürüne adaptasyonu ve attenüasyonu ile yerel bir aşı suşu hazırlanmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Deneme hayvanları: PPR virusunun koyunlardaki patojenitesinin incelenmesi amacıyla, 1 yaşlı kıvrıcık ırkı 8 adet koyunun eprüvasyon öncesi kanları alındı ve kan serumlarında PPR virusuna karşı antikor varlığı serum nötralizasyon (SN) testi ile araştırıldı.

Standart PPR virusu : Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere standart PPR virusu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölüm Başkanlığı'ndan temin edildi.

Pozitif PPR Antiserumu : PPR hiperimmün serumu Office International Des Epizooties (OIE) manual'de bildirilen metot kullanılarak hazırlandı.

Hücre Kültürü : Virus izolasyonu, identifikasyonu ve attenüasyonunda Vero hücre kültürü kullanıldı.

Virus izolasyon materyali : Klinik olarak koyun vebası hastalığı belirtileri gösteren koyunların ağızlarında oluşan erozyonlardan alınan doku döküntüleri kullanıldı. Ağız içinde oluşan lezyonlarından bistürü ile kazındı ve kazıntı örnekleri 1 ml Phosphate Buffer saline (PBS) içine konuldu.

Metot

Virus izolasyonu : Klinik olarak PPR belirtisi gösteren hayvanların ağız lezyonlarından alınan kazıntı örneklerinden monolayer oluşturmuş Vero hücre

kültürü bulunan flaslara adsorbsiyona bağlı ekimleri yapıldı. 1 saat 37 °C derecede inkubasyona bırakılan hücre kültürlerinin yüzeyleri PBS ile 3 kez yıkandı ve hücre kültürlerine %2 fetal buzağı serumu (FCS) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) eklendi. Hücre kültürleri 14 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon periyodunda her 2 günde bir hücre kültürlerinin vasatları değiştirilerek 14 gün boyunca hücre kültüründe Cytopathic effect (CPE) oluşumu incelendi. Pozitif kontrol olarak Standart PPR virusu Vero hücre kültürüne aynı metotla inokule edildi ve inkubasyona bırakıldı (1,2,11,16).

Üreyen virusun identifikasyonu : Vero hücre kültüründe CPE oluşturarak üreyen virusun identifikasyonu amacıyla OIE manuel de belirtilen Serum Nötralizasyon Testi ve RT-PCR testi yapıldı (9,11,12).

Virus titrasyonu : Virusun 10 katlı dilüsyonu yapıldı ve mikro titrasyon testi ile titresi Spearman-Karber metodu ile saptandı (11,12).

PPR virusunun vero hücre kültüründe attenüasyonu : Vero hücre kültüründe izole edilen virusun 40 pasajı yapıldı. Bu amaçla 25 cm² lik flaslarda monolayer vero hücre kültürü hazırlandı. %90 oranda monolayer oluşturan hücre kültürlerinin vasatı döküldü ve hücre yüzeyleri PBS ile 3 kez yıkandı. Bir önceki pasajda elde edilen virus DKID₅₀ 10⁴ /0.1 ml oranında hazırlanarak bir sonraki hücre kültürüne 0.2 ml ilave edildi ve 37°C de 1 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda %2 FCS içeren DMEM vasatından 7.5 ml eklendi ve 37 °C de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon periyodu boyunca her 2 günde bir %2 FCS' lu DMEM vasatla besi yeri değişimi yapıldı. İnkubasyon periyodu sonunda her pasajda elde edilen virus süspansiyonu 3 kez – 70 °C de dondurulup çözdürüldü ve santrifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırılan virus süspansiyonu -70 °C de muhafaza edildi (16). Vero hücre kültüründe üretilen virusun 10.,20.,30. ve 40. pasajlarından koyunlara verilerek virusun attenüe olup olmadığı araştırıldı (11).

Koyunların eprüvasyonu ve histopatolojik incelenmeleri : Titrasyonu yapılan virus süspansiyonu DKID₅₀ 10³/ml olacak şekilde sulandırıldı. Deneme öncesi 32 adet koyunun kan serumları PPR antikorlarının varlığı yönünden incelendi. PPR antikor taşımadıkları saptanan koyunlardan 4'lü gruplar oluşturuldu ve PPR izolatının 10., 20., 30. ve 40. pasaj seviyelerinden 1 ml deri altı yolla verildi. Koyunlar arasında kontakt bulaşmanın ortaya konulması için her gruba 2'şer adet koyun eprüve edilen koyunların arasına konuldu. Her bir pasaj seviyesi için 2'şer adet koyun ise ayrı bir barınakta kontrol olarak muhafaza edildi. Eprüvasyon öncesi ve eprüvasyondan sonra her gün koyunların vücut ısıları ölçüldü ve PPR hastalığı yönünden klinik muayeneleri yapıldı. 21 günlük süre sonunda tüm koyunların kanları alındı ve otopsileri yapıldı. Organlardan virus izolasyonu ve histopatolojik muayeneler için doku parçaları alındı (2,10,11,13).

BULGULAR

Virus izolasyonu : Hasta hayvanlara ait eroziv ağız lezyonlarından yapılan ekimlerde 2. pasajda virus üremesine bağlı hücre yuvarlaklaşması ve syncytia oluşumu ile karakterize CPE odakları inkubasyonun 9. gününde başladı ve 12. günde %80 seviyeye ulaştı. CPE odakları 3. ,4. ve 5. pasajlarındaki hücre kültürlerinde 5. günde başlarken, 7. pasajdan itibaren ise 3. günde görülmeye başladı. 10. pasajda klinik olarak PPR hastalığı belirtileri gösteren 4 koyunun ağız içindeki ülseratif lezyonlardan alınan numunelerin hepsinden virus izolasyonu yapıldı.

Virus izolatlarının identifikasyonu : Vero hücre kültüründe CPE odakları oluşturarak üreyen 4 adet virusun titreleri sırasıyla $DKID_{50} 10^{-5}$ $10^{-5.2}$ 10^{-6} 10^{-5} / 0.1ml olduğu belirlendi. Virusun identifikasyonu için SN testi ve RT-PCR testi yapıldı. SN testi ile üreyen virusun PPR antiserumu ile nötralize olduğu saptandı. RT-PCR testi ile üreyen virusların PPR virusu olduğu doğrulandı.

PPR virusunun vero hücre kültüründe attenüasyonu : 4 ayrı koyundan İzole edilen 4 adet virus izolatından en yüksek titreye sahip olan ($DKID_{50} 10^{-6}$ / 0.1 ml) bir adeti aşı suşu geliştirmek amacıyla attenüasyon işlemleri için seçildi ve PPR(P)VG suşu olarak isimlendirildi. Vero hücre kültüründe izole edilen ve PPR(P)VG suşu olarak isimlendirilen virusun 40 pasajı yapıldı. Bu amaçla 25 cm² lik flasklarda monolayer vero hücre kültürü hazırlandı. %90 oranda monolayer oluşturan hücre kültürlerinin vasatı döküldü ve hücre yüzeyleri PBS ile 3 kez yıkandı. Bir önceki pasajda elde edilen virus $DKID_{50} 10^4$ /0.1 ml oranında hazırlanarak bir sonraki hücre kültürüne 0.2 ml ilave edildi ve 37°C de 1 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda %2 FCS içeren DMEM vasatından 7.5 ml eklendi ve 37 °C de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon periyodu boyunca her 2 günde bir %2 FCS' lu DMEM vasatla besi yeri değişimi yapıldı. İnkubasyon periyodu sonunda her pasajda elde edilen virus süspansiyonu 3 kez – 70 °C de dondurulup çözdürüldü ve santrifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırılan virus süspansiyonu -70 °C de muhafaza edildi (16). Vero hücre kültüründe üretilen virusun 10.,20.,30. ve 40. pasajlarından koyunlara verilerek virusun attenüe olup olmadığı araştırıldı (11).

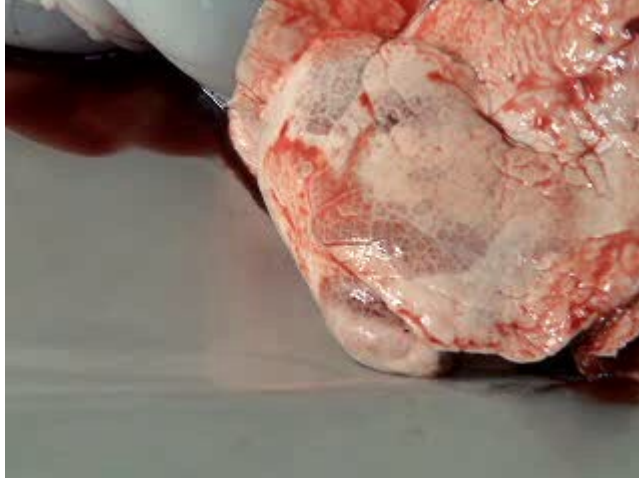
Koyunların eprüvasyonu : SN testi ile deneme koyunlarının PPR virusuna karşı antikor taşımadıkları saptandı. Vero hücre kültüründe üretilen PPR virusunun 10.,20.,30.ve 40. pasajları ile eprüve edilen koyunlar ile kontrol koyunların vücut ısıları her gün ölçüldü. Kontrol olarak ayrılan koyunların 21 gün süreyle vücut ısılarında artış saptanamadı. 10.,20.,30. pasajlardaki PPR virusu inokule edilen koyunların vücut ısılarının eprüvasyonu takiben 5. günde 40.5-41.5°C dereceler arasında olduğu saptandı. Hayvanların 5 gün süreyle devam eden ateşleri 10. günde normal seviye ye indiği (39-39.8°C) saptandı. Her pasaj seviyesi için eprüve edilen 4 koyunun yanına kontakt bulaşma için konan 2 koyunun vücut ısıları eprüvasyonun 11. gününde 40.5 °C dereceye çıktığı ve hayvanlarda görülen ateşin 40.5-41 °C dereceler arasında 5 gün sürdüğü ve 16. gün vücut ısılarının normal seviyeye indiği saptandı. 40. pasajdaki PPR virusu ile eprüve edilen koyunların yalnız 2 adedinde yukarıdaki belirtiler görülürken 2

adet koyunda ise klinik olarak herhangi bir belirti görülmedi. Eprüve edilen ve kontakt temasta bırakılan koyunlarda klinik belirtiler olarak gözyaşı ve burun akıntısı, öksürük, hafif ishal, ağız mukazasında hiperemi, iç bakıda ise akciğerlerde anterior ve kardiak loplarda hepatize sahalar ,sindirim sistemi mukozalarında ödem ve konjesyon ile mediastinal ve intestinal lenf düğümlerinin ödematöz görünümde olduğu tespit edildi. Mikroskopik bulgular olarak, akciğerlerde bazı alveolar loplarda düzensiz kalınlaşmaların, sinsitiyal hücre oluşumlarının bulunduğu bronkointersitisyel pnömoni tespit edildi.

Koyunların ağızlarında hiperemi dışında eroziv lezyonlar ve kanlı ishal görülmedi. Ağızdaki hiperemik bölgelerden yapılan histopatolojik muayenelerde mukoza epitellerinde intrasitoplazmik eosinofilik inkluzyon cisimcikleri ile sinsitiyal dev hücrelerinin bulunduğu görüldü. Koyunların burun akıntılarında PPR virusu izole ve identifiye edildi. Hasta hayvanlardan eprüvasyonun 21 gününde alınan kan serumlarında PPR virusuna karşı antikor varlığı saptandı. Vero hücre kültüründe üretilen PPR virusunun 20. ve 30. pasajlarında yapılan patojenite çalışmaları sonucu PPR virusunun 10. pasajda yapılan patojenite çalışmasında elde edilen bulgular ile benzer klinik ve patolojik bulgular gösterdiği saptanırken 40. pasajdan yapılan eprüvasyon çalışmalarında yalnız iki koyunda ateş ve burun akıntısı görüldü. Diğer 2 adet koyunda ise gerek ateş yükselmesi gerekse burun akıntısı görülmedi. Hayvanların hiç birinde ölüm görülmedi. Bu grubtaki koyunların yapılan otopsilerinde makroskopik lezyonlar olarak ateşi yükselen 2 koyunda tipik akciğer lezyonlarının yanında akciğer ve bağırsak lenf yumrularında büyüme belirlendi. Hastalık belirleri göstermeyen koyunlarda ise yalnız akciğer ve bağırsak lenf yumrularında büyümeler saptandı. Hayvanların kan serumlarında SN testi ile 1/180 -1/360 oranlarında PPR'a karşı antikor titreleri belirlendi. Sonuç olarak PPR virusunun 40. pasajda virulensinin azaldığı ancak tam olarak attenüe olmadığı belirlendi.

PPR virusunun Vero hücre kültüründeki 10., 20. ve 30. pasajlardan yapılan eprüvasyon çalışmalarında, hayvanların otopsilerinde, ince bağırsaklarda dış bakıda kanama ve lezyonlar görülmedi. Akciğerlerde anterior ve kardiak loplarda pnömoni, lenf yumrularında büyüme saptandı (Resim1,2 ve 3). Histopatolojik incelemelerde, akciğerlerin lezyonlu kısımlarından alınan doku örneklerinin Heamatoksilen X Eozin ile yapılan boyamalarda bağırsak epitellerinde dejenerasyon ve nekrozlar, akciğerlerde bronkointersitisyel değişiklikler ile sinsitiyal hücrelerin bulunduğu intersitisyel pnömoni ve intersitisyel pnömoninin komplike olarak seröfibrinöz bronkopnömoniyi oluşturduğu tespit edildi.

Resim 1 ; 10. pasaj seviyesinde epre edilen koyunun akciğer lezyonları



Resim 2 ; 10. pasaj seviyesinde kontakt temasta bırakılan koyunun akciğer lezyonları



Resim 3 ; 10. pasaj seviyesinde epre edilen koyunun akcięerinde oluşan lezyonları



Tartışma ve sonuç

PPR hastalığı koyun ve keçilerde genellikle şiddetli ve ölümcül olarak seyretmesine karşın sığırlarda hastalık subklinik seyreder ve bu hayvanlar sığır vebası hastalığına karşı dirençli olurlar (2,5).

Adu ve ark (1), PPR 75/1 virus izolatının vero hücre kültüründe yaptıkları attenüasyon çalışmalarında monolayer vero hücre kültürüne 0.2 ml virus süspansiyonu ekerek 60 pasaj gerçekleştirmişler ve virusun 55.pasajda attenüe olarak koyunlar ve keçiler için zararsız olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada virus izolasyonu ve pasajları için vero hücre kültürüne benzer şekilde 0.2 ml virus süspansiyonu inokule edilerek 40 kez pasajı yapılmıştır. Her 10 pasajda yapılan patojenite çalışmalarında virusun 40 kez pasajı sonunda vero hücre kültüründe attenüe olmadığı saptanmıştır.

Brindha ve ark (5), yaptıkları çalışmada PPR virus izolasyonu için vero hücre kültürüne PPR ile infekte hayvanların lenf yumrusu, dalak ve akciğer süspansiyonlarını inokule ettiklerini ve iki kör pasajdan sonra 3. pasajda vero hücre kültüründe CPE oluştuğunu saptamışlar, virus identifikasyonunu RT-PCR, Nested- PCR ve immunofloresan ile yaptıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ekim materyali olarak ağız içinden kazıma ile alınan eroziv dokular kullanıldı. Ağız içi epitel döküntülerinden vero hücre kültüründe 2. pasajda virus izolasyonu yapıldı.

Özkul ve ark (12), klinik olarak PPR belirtisi gösteren koyunların nazal sıvablarından vero hücre kültüründe PPR virusunu izole etmişler, virusun identifikasyonunu RT-PCR ile yapmışlardır. Bu çalışmada ise izole edilen virusun identifikasyonu serum nötralizasyon testi ve RT-PCR ile yapılmıştır.

Nanda ve ark (10), Hindistan'da PPR hastalığı belirtileri gösteren kuzu ve oğlaklardan PPR virus izolasyonu için akciğer ve bağırsak lenf yumrularından hazırladıkları 1'er ml inokulumları monolayer vero hücre kültürüne inokule ettiklerini, oda ısısında 1 saatlik inkubasyonu takiben %5 FCS'lu MEM vasatı ekleyerek hücre kültürlerini 37°C' de inkube ettiklerini, 48 saatte bir vasat değişimi yaparak 3. pasajda virus üremesine bağlı CPE odaklarının oluştuğunu bildirmişlerdir. Virus izolasyonunu takiben RT- PCR ve immunocapture ELISA ile PPR virusunu identifiye ettiklerini bildirmişler, PPR virusunun vero hücre kültüründeki düşük pasajı ile koyun, keçi ve sığırlarda yaptıkları patojenite çalışmasında iki koyun ve iki keçiyi deri altı yolla eprüve etmişlerdir. Keçilerde inkubasyon periyodu sonunda ağız mukozasında üst ve alt dudakların birleştiği bölgede hiperemi ve nekrozis oluştuğunu, koyunlarda ise eprüvasyonun 4-5. günlerinde vücut ısılarının yükseldiğini, 7 ve 9. günlerinde dudak damak ve diş etlerinde yüzeysel epitel kaybının yanında hayvanlarda konjunktivitis ve gözyaşı akıntısı olduğunu ve çalışma sonucunda hayvanların ölmediğini saptamışlardır. Sığırlar üzerinde yapılan çalışmada ise sığırlarda herhangi bir hastalık belirtisi görülmemiş ancak hayvanların kan serumlarında PPR antikorları saptamışlardır. Ali ve Taylor (2), SUD 72/1BK/6 ve SUD 72/BK/4 PPR virus izolatları ile koyunlarda yaptıkları eprüvasyon çalışmalarında inokulasyondan sonra 4. günde hayvanlarda ateş görüldüğünü ve ateşin 40 °C nin üzerine çıkmadığını, bir koyunda gözyaşı ve burun akıntısı, dudak, diş eti ve ağız mukozasında nekroz oluştuğunu, diğer iki koyunda ise herhangi bir hastalık belirtisi görülmediğini ve koyunların çalışma sonunda ölmediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, eprüvasyonu takiben koyunlarda vücut ısılarının 5. günde 40.5-41.5 °C arasında yükselmeye başladığı, koyunlarda burun akıntısı , öksürük, ağız mukozasında hiperemi oluştuğu, vücut ısılarının 10. günden itibaren düşmeye başladığı, eprüve edilen koyunların arasına konan kontakt kontrol hayvanlarda 11. günden itibaren vücut ısılarının artmaya başladığı ve eprüve edilen koyunlar ile benzer semptomların ortaya çıktığı gözlenmiştir. Hayvanların yapılan otopsisinde, anterior ve kardiak akciğer loplarında

lezyonların oluştuğu saptanmıştır.. Ayrıca koyunlarda çalışma sonucunda ölüm görülmemiştir. Diğer çalışmalarda (3,4,13,17), ağızda diş etlerinde bazı hayvanlarda alt dudağın iç yüzü, dilin serbest kısmı ile damakta süperfisyel nekrotik odaklara rastlandığı, dudaklarda mukoza ile derinin birleşme bölgesinde nonhemorajik erozyonlar olduğu, koyunlarda diş etlerinde kepek serpilmış tarzda kirli beyaz renkte psödomembranlar ile dudaklarda mukokutan bölgede nonhemorajik erozyonlar tesbit edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada diş etlerinde kepek serpilmış tarzda kirli beyaz renkte psödomembranlar ile kanlı ishal görülmemiştir. Elde edilen bu bulgular Nanda ve ark.(10) ile Ali ve Taylor (2)'un yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri gerek klinik bulguların gerekse histopatolojik bulgular ile benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, klinik olarak PPR belirtileri gösteren koyundan izole ve identifiye edilen ve PPR(P)VG olarak isimlendirilen PPR virusunun vero hücre kültüründe DKID₅₀ 10⁶/0.1ml titrede üreyen virusun vero hücre kültüründe 40. pasajda patojenitesinin azaldığı ancak tam olarak attenüe olmadığı, bundan dolayı virusun attenüasyonu amacıyla vero hücre kültüründe pasajlarına devam edilmesinin uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- 1- Adu F.D., Joannis T., Nwosuh E. and Abegunde A. (1990) Pathogenicity of attenuated peste des petits ruminant virus in sheep and goats. Rev Elev Med Vet Pays Trop. 43(1):23-6.
- 2- Ali Hag B.El. and Taylor W.P. (1984) Isolation of peste des petits ruminants virus from the sudan. Res.Vet. science.,36,1-4.
- 3- Anonim (1998). Peste des petit ruminants. Foreign Animal Diseases.Part. IV. s: 86-91
- 4-Anonim (1999).Peste des petit ruminants. FAO document
- 5- Brindha K., Raj G.D., Ganesan P.A., Thiagarajon V., Nainar A.M. and Nachimuthu K. (2001) Comparison of virus isolation and polymerase chain reaction for diagnosis of peste peste des petits ruminants. Acta Virol. 45(3), 169-72
- 6- Burgu İ. (2001) Prevalance, distribution and host range of peste des petits ruminants virus in Turkey. Project termination Report. April
- 7- Dhar P., Sreenivasa B.P., Barrett T., Corteyn M., Singh R.P. and Bandyopadhyay (2002) Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). Vet. Microbiol. 88 153-159.
- 8- Diallo A., Libeau G., Couacy- Hymann E. and Barbran M. (1995) Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. Vet. Microbiol. 44 307-317.
- 9- Haroun M., Hajer I., Mukhtar M. and Ali B.E. (2002) Detection of antibodies peste des petits ruminants virus in sera of cattle , camels, sheep and goats in Sudan. Vet. Res. Commun., 26,537-541.

- 10- Nanda Y.P., Charrejee A., Purohit A.K., Diallo A., Innui K., Sharma R.N., Libeau G., Thevasagayam J.A., Bruning A., Kitching R.P., Anderson J., Barrett T. and Taylor W.P. (1996) .The isolation of peste des petits ruminants virus from northern India. *Vet. Mic.*, 51: 207- 216.
- 11- Office international des Epizooties (OIE) (2002) OIE manual of standarts for diagnostic tests and vaccines.
- 12- Özkul A., Akça Y., Aklan F., Barrett T., Karaoğlu T., Dağalp S.B., Anderson J., Yeşilbağ K., Çokçalışkan C., Gençay A. and Burgu İ.(2002) Prevalance, Distribution and Host Range of Peste des petits ruminants virus, Turkey. *Emerg. Infect. Disease.* , 8 (7),708-711.
- 13- Öztürk, F.(1999). Küçük ruminant vebası. *Fırat Üniv.Sağ.Bilim.Derg.* 13 (2) : 201-204
- 14- Shaila M.S., David S., Morag A.F., Diallo A., Lynnette G., Kitching R.P. and Barrett T. (1996). Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants viruses. *Virus Research*, 43, 149-153.
- 15- Tatar N. (1998) Koyun ve keçilerde küçük ruminantların vebası ve sığır vebası enfeksiyonlarının serolojik ve virolojik olarak araştırılması. Ankara Üniversitesi , Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- 16- Taylor W.P. and Abegunde A. (1979). The isolation of peste des petits ruminants virus from Nigerian sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* , 26, 94-96.
- 17- Yener Z.,Sağlam Y.S.,Temur A. ve Keleş H. (2004). İmmunohistochemical detection of peste petit ruminants viral antigen in tissues from cases of naturally occurring pneumonia in goats. *Small Ruminant Research.*, 51, 273-277