در
امور دام و آبزیان شماره ۷۹ تابستان ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

تهیه سرم هیپرایمیون طاعون گاوی با استفاده از ویروس تخفیف حدت یافته و عادت داده شده به سلول پرایمری کلیه خرگوش و بکارگیری آن در تست‌های ژل دیفیوژن و خنثی سازی سرم

● **منیژه یقینی**
کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
● **روزبه فلاحی**
استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
● **روحانی کارگر موخر**
استاد پژوهش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
● **کمال الدین خدمتی**
مربی پژوهش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۸۶
Email: r.fallahi@rvsri.ir

چکیده

سرم‌های هیپرایمیون کاربرد فراوانی در آزمایشگاه‌های تشخیصی دارند. از آنجا که خرید نمونه‌های خارجی، هزینه زیادی در برداشته و همیشه امکان‌پذیر نمی‌باشد، لذا تهیه آن با کیفیت بالا، در داخل کشور حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق آنتی‌سرم هیپرایمیون طاعون گاوی به منظور استفاده در تست آگار ژل دیفیوژن[1](AGID) با استفاده از کشت سلولی پرایمری خرگوش تهیه گردید. در مرحله اول سلول پرایمری کلیه نوزاد خرگوش بروش هضم آنزیمی[2]، تهیه و در مرحله بعد سوش واکسن طاعون گاوی (Plowright) به سلول فوق تلقیح گردید. ایجاد ضایعات سلولی[3] (CPE) در پاساژ کور هفتم، مشاهده و عیار مورد نظر (۵-۱۰) در پاساژ ۱۸ بدست آمد. بعد از تزریق به خرگوش، آنتی سرم مورد نظر تهیه و در تست ژل دیفیوژن خطوط رسوبی واضحی ایجاد نمود. در آزمایش خنثی سازی سرم[4](SN)، تیتر ۶۴ : ۱ در ۱۰۰TCID۵۰، توانست ویروس RP[5] را خنثی نماید. در بررسی حساسیت و ویژگی، به ترتیب مقادیر ۱۰۰٪ و ۸۰٪ بدست آمد که بسیار مناسب می‌باشد. نهایتاً ویروس عادت داده شده به سلول خرگوش و نیز سرم هیپرایمیون تهیه شده به صورت لیوفیلیزه در آورده و نگه داری گردید. سرم تهیه شده قابل ارائه به مراکز و آزمایشگاههای تشخیصی می‌باشد.

کلمات کلیدی: سرم هیپرایمیون، ویروس طاعون گاوی، سلول کلیه خرگوش، آزمایش آگار ژل ایمنودیفیوژن، آزمایش خنثی سازی سرم

Pajouhsh & Sazandegi No 79 pp: 17-22

Preparation of hyperimmune serum against adaptated plowright rinderpest virus to primary rabbit kidney cell and using in serum neutralization and agar gel immunodiffusion tests

By: M. Yaghini, R. Fallahi, R. Kargar Moakhar and K. Khedmati, Razi Vaccine and Serum Research Institiute

Hyperimmune sera are used in diagnostic laboratories abundantly. Because of the imported antisera are expensive, the internal preparation with high quality, is very important. In this study, the hyperimmune serum against adaptated plowright rinderpest virus to primary rabbit kidney cell prepared and used in agar gel immunodiffusion test and serum neutralization test. Primary cell, prepared with enzymatic disaggregation method. The attenuated virus was inoculated and the cytopathic effect was seen in 7th blind passage and it's ideal assay (10^{-5}) obtained in 18th passage. The antiserum prepared after injection to rabbit and created clear precipitation lines in agar immunodiffusion test. In SN, the 1 : 64 titer in 100 TCID50 could neutralized the RPV. The sensitivity and specificity of this antiserum was 100% and 80% , that is suitable. At the end, the adaptated virus and hyperimmune serum lyophilized. This serum kept to delivering to the diagnostic laboratories

Key words: Hyperimmune serum, Rinder pest virus, Rabbit kidney cell, Agar Gel Immunodiffusion Test, Serum Neutralization Test

مقدمه

طاعون گاوی بیماری حاد ویروسی است که توسط موربیلی ویروس که از خانواده پارامیکسوویریده می‌باشد ایجاد می‌گردد. میزان ابتلا و تلفات در آن بسیار بالا می‌باشد (۱،۱۱،۱۴). شیوع این بیماری بطور گسترده در اروپا، آفریقا و آسیا و اخیراً فقط در آفریقا و آسیا گزارش گردیده است (۲، ۷، ۸، ۹، ۱۰). علائم بالینی بیماری شامل تب، بی اشتهایی، زخم‌های سطحی در لب‌ها، لثه‌ها و پرزهای زبان، ترشحات سروزی و موکوسی چرکی در چشم‌ها و بینی و اسهال می‌باشد که نهایتاً باعث مرگ حیوان می‌گردد (۱،۱۱،۱۴). تشخیص آزمایشگاهی بر اساس جداسازی ویروس با استفاده از سلول‌های حساس، مشاهده ویروس جدا شده زیر میکروسکوپ الکترونی و استفاده از یکی از روش‌های سرولوژی نظیر الایزا با استفاده از پادتن‌های مونوکلونال اختصاصی، صورت می‌گیرد (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۸). از روش ایمنوهیستوشیمی[۶] و تست‌های رسوبی نظیر AGID نیز می‌توان استفاده کرد (۴،۵،۷،۱۱،۱۲،۱۵). جهت تفکیک ویروس بیماری فوق از ویروس طاعون نشخوار کنندگان کوچک[۷](PpR) از روش‌های مولکولار نظیر[۸] RT-PCR استفاده می‌گردد. از مزایای تست‌های رسوبی، سادگی و سرعت عمل آن بوده که در کمتر از ۱۲ ساعت می‌توان بیماری را تشخیص داد. از آنجا که در تشخیص بیماری طاعون گاوی، از تست‌های رسوبی به صورت متداول استفاده می‌گردد و چون سرم خرگوش هیپرایمیون طاعون گاوی وارداتی با هزینه بسیار بالا خریداری می‌گردد، در این تحقیق با تلقیح سوش واکسن طاعون گاوی به سلول‌های پرایمری کلیه نوزاد خرگوش، ضمن عادت دادن ویروس به سلول فوق الذکر اقدام به ازدیاد ویروس کرده و عیار مورد نظر (10^{-5}) از آنرا جهت تهیه آنتی سرم به خرگوش‌های آزمایشگاهی تزریق کرده بعد از مدت زمان تعیین شده بر طبق دستورالعمل استاندارد اقدام به خونگیری نموده و آنتی سرم تهیه شده از آن در تست ژل دیفیوژن استفاده شده و با نمونه وارداتی آن مقایسه می‌گردد. با انجام آزمایش خنثی سازی سرم، تیتر خنثی کنندگی ویروس، تعیین و نهایتاً حساسیت و ویژگی آن محاسبه خواهد گردید.

مواد و روش کار

تهیه کشت سلولی پرایمری خرگوش

بر طبق شرایط استاندارد از کلیه‌های نوزادان خرگوش، بعد از آماده سازی بروش هضم آنزیمی(استفاده از تریپسین ۰/۲٪، تهیه شده با PBS)[۹] کشت سلولی پرایمری تهیه گردید.

جهت شمارش سلول‌ها از لام هموسایتومتر۱۳ و رنگ تریپان بلو (۰/۵-۰/۱ درصد تهیه شده با PBS) استفاده گردید. در صورت مناسب بودن تعداد سلول‌های زنده که به صورت بی رنگ دیده می‌شوند محیط کشت به آنها اضافه می‌گردید. پس از رسیدن سلول‌ها به سطح پوششی[۱۰] کامل، پاساژ سلولهای مونولایر با استفاده از مخلوط تریپسین + ورسین (۰/۴٪ + ۰/۰۳۸٪ ، تهیه شده با PBS) صورت می‌گرفت. نسبت پاساژ ۱:۲ بود (سوسپانسیون سلولی یک فلاسک در دو فلاسک تقسیم می‌شد).

از پاساژهای اول و دوم جهت تلقیح[۱۱] ویروس استفاده می‌گردید. زمان تلقیح، بلافاصله بعد از ترپسینه کردن سلولها بود که همزمان محیط جدید به آنها اضافه می‌گردید (۴،۱۱،۱۲).

تلقیح ویروس تخفیف حدت یافته طاعون گاوی به سلول‌های پرایمری کلیه نوزاد خرگوش

مقدار ۱ میلی لیتر از ویروس لیوفیلیزه شده مورد استفاده در تهیه واکسن طاعون گاوی (Plowright) بعد از آماده سازی، در فلاسک حاوی سلول‌های کلیه خرگوش ریخته و همزمان به آن محیط کشت اضافه و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و به مدت یک هفته مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت مشاهده CPE ، جهت بررسی میزان حدت ویروسی، تعیین تیتر صورت می‌گرفت و در صورت عدم مشاهده ضایعات سلولی، پاساژ کور از آن به عمل می‌آمد و این کار تا مشاهده CPE در هر پاساژ ممکنه ادامه می‌یافت (۴،۱۱،۱۲).

تهیه آنتی سرم طاعون گاوی

۵ سر خرگوش نر ۶ ماهه (نژاد Dutch) برای اینکار انتخاب گردید. به خرگوش‌های شماره ۱ و ۲ مقدار ۲ میلی لیتر از ویروس تهیه شده در رقت مناسب، به طریق داخل ورید گوش، تزریق صورت گرفت. به خرگوش‌های شماره ۳ و ۴ همان مقدار سوسپاسیون صاف شده کلیه نوزاد خرگوش تزریق شد. به خرگوش شماره ۵ هم بعنوان شاهد سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. بعد از ۲ هفته از خرگوش‌ها خونگیری بعمل آمد و سرم آنها جمع آوری گردید. در طول مدت ۱۰ روز و روز قبل از تزریق، دمای بدن خرگوش‌ها به صورت روزانه اندازه گیری می‌شد. پس از غیر فعال کردن سرمها در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت، آماده برای انجام تست ژل دیفیوژن شدند. سرمها با نمونه مثبت طاعون مورد آزمایش قرار گرفته و از لحاظ ایجاد خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از این مرحله سرمها مورد آزمایش SN قرار گرفته و سپس تیتراژ شدند (۱۷،۱۵،۱۱).

انجام تست آگار ژل دیفیوژن با استفاده از آنتی سرم تهیه شده

در هر یک از چاهک‌های اطراف، پادگن استاندارد و یا نمونه‌های مثبت طاعون گاوی، ریخته و در چاهک وسط آنتی سرم تهیه شده هیپرایمیون خرگوشی ریخته می‌شد. در یک سری مشابه نیز از آنتی سرم وارداتی Rinderpest Hyperimmune Rabbit Serum I.A.D.R Pirbright, England) (استفاده گردید. ۱۲ ساعت پس از قرار گرفتن در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد جهت مشاهده خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵،۱۱،۷).

انجام تست خنثی سازی سرم با استفاده از آنتی سرم تهیه شده

از آنتی سرم تهیه شده، رقت‌های مختلف ۱:۲ تا ۱:۱۲۸ تهیه و هم حجم آنها ویروس طاعون گاوی با TCID۵۰ ۱۰۰ اضافه کرده و به مدت ۲-۱ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت خنثی سازی آنتی بادی قرار گرفتند. سپس کمپلکس ویروس- آنتی سرم را روی سلول حساس BK[۱۲] برده و بعد از یک ساعت جهت عمل چسبندگی[۱۳] ویروس، مقدار ۲ میلی لیتر محیط کشت به هر یک از لوله‌های حاوی کشت سلولی اضافه کرده و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته از روز چهارم به بعد جهت احتمال ظهور CPE، مورد بررسی قرار گرفتند.

همچنین برای شاهد سلول، یک لوله بدون آنتی سرم و ویروس، برای شاهد آنتی سرم، یک لوله بدون ویروس و برای شاهد ویروس یک لوله با سرم گوساله در نظر گرفته شد (۱۵،۱۱). بررسی حساسیت[۱۴] و ویژگی[۱۵] آنتی سرم تهیه شده برطبق روش استاندارد و با استفاده از ۵۰ نمونه غده مشکوک به طاعون گاوی، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج تهیه کشت سلولی پرایمری خرگوش

نتیجه تهیه کشت سلولی پرایمری از کلیه نوزادان خرگوش با روش هضم آنزیمی‌بسیار قابل توجه بود. سلولهای تهیه شده اکثراً بعد از ۷- ۵ روز به سطح پوششی کامل می‌رسیدند و از آنها پاساژ تهیه می‌گردید. نتایج کشت پاساژهای آنها نیز قابل توجه بود. (شکل ۱)

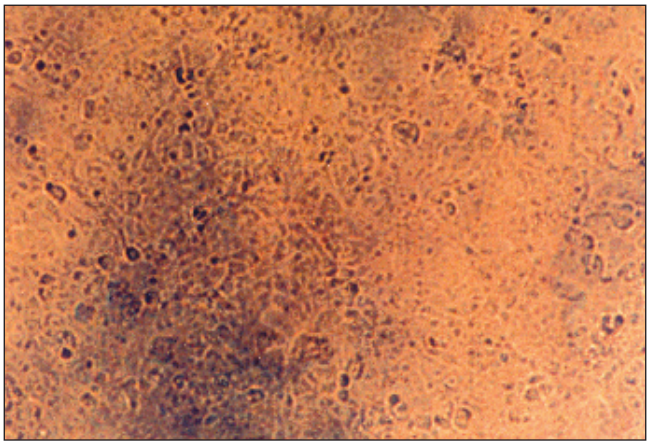
نتایج حاصل از تلقیح ویروس تخفیف حدت یافته طاعون گاوی بر روی سلول‌های پرایمری کلیه نوزاد خرگوش

ظهور ضایعات سلولی (CPE) از پاساژ کور هفتم مشاهده گردید. (شکل۲ و شکل ۳)

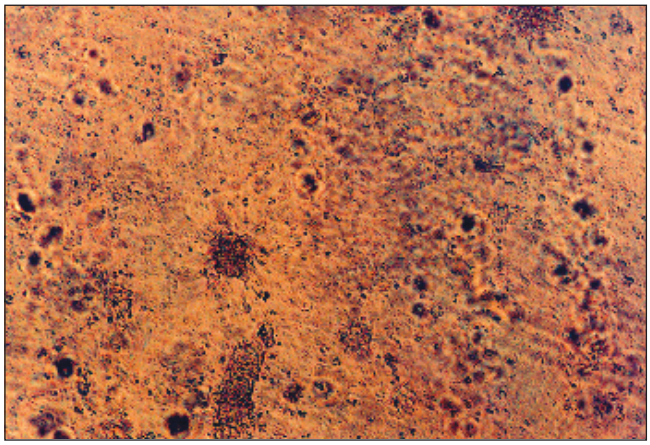
از آنجا که تیتر بررسی شده در این مرحله $۱۰^{-۱}$ بود جهت افزایش تیتر با ادامه پاساژهای مکرر و تلقیح ویروس به آنها، نهایتاً تیتر $۱۰^{-۵}$ در پاساژ ۱۸ مشاهده گردید که از آن برای تزریق به خرگوش‌ها استفاده گردید. (شکل۴)

نتایج تست ژل دیفیوژن با استفاده از آنتی سرم تهیه شده

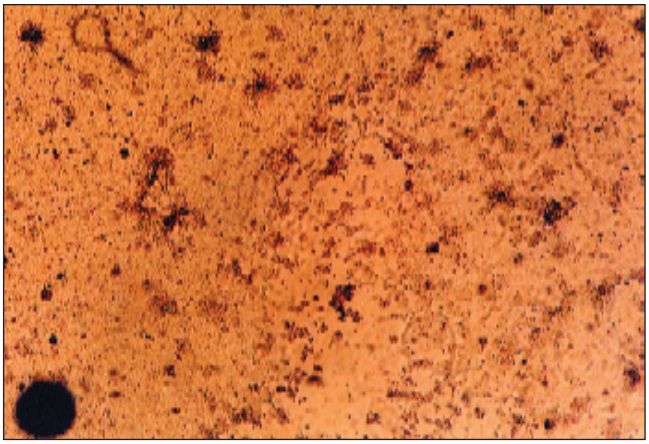
نمونه‌های مربوط به خرگوش شماره ۱ و ۲ خط رسوبی واضحی با نمونه مثبت طاعون ایجاد کردند نتایج تست خنثی سازی سرم با استفاده از آنتی سرم تهیه شده:



شکل - ۱ : سلولهای پرایمری کلیه نوزاد خرگوش تهیه شده با روش هضم آنزیمی(بزرگنمایی : ۶۳ x).

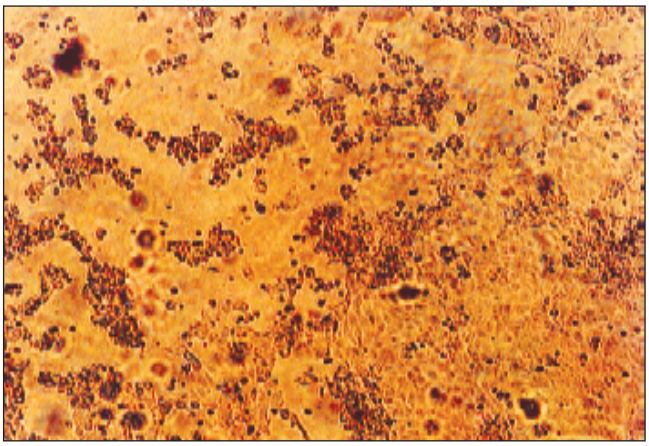


شکل - ۲ : ضایعات سلولی (CPE) ایجاد شده در سلولهای پرایمری کلیه خرگوش در پاساژ کور هفتم ۷۲ ساعت پس از تلقیح (بزرگنمایی : ۲۵ x).

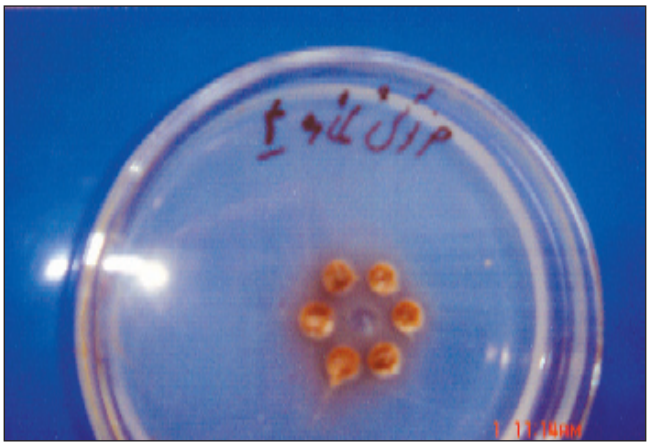


شکل – ۳ : ضایعات سلولی (CPE) ایجاد شده در سلولهای پرایمری کلیه خرگوش در پاساژ کور هفتم ۵ روز پس از تلقیح (بزرگنمایی : ۲۵x).

شکل – ۵ : خط رسوبی کامل در تست ژل دیفیوژن مربوط به نمونه‌های خرگوش ۱ و ۲



شکل – ۴ : ضایعات سلولی (CPE) ایجاد شده در سلولهای پرایمری کلیه خرگوش در پاساژ هجدهم ۷ روز پس از تلقیح (بزرگنمایی ۶۳x).



شکل – ۶: عدم تشکیل خط رسوبی در نمونه‌های ۳ ، ۴ و ۵

در تست SN، در سرم خرگوشهای ۳، ۴ و ۵ هیچگونه تیتری ایجاد نگردید ولی سرم خرگوش شماره ۱ تیتر ۳۲ : ۱ و سرم خرگوش شماره ۲ تیتر ۶۴ : ۱ ایجاد نمود. این دو سرم توانستند ۱۰۰ TCID۵۰ ویروس طاعون گاوی را خنثی نمایند.

جمع	منفی	مثبت	خارجی / داخلی
۴۶	۱	۴۵	مثبت
۴	۴	۰	منفی
۵۰	۵	۴۵	جمع

$$\text{حساسیت (Sensitivity)} = \frac{\text{مثبت واقعی}}{\text{مثبت واقعی + منفی کاذب}} \times 100 = \frac{45}{45+0} \times 100 = \%100$$

$$\text{ویژگی (Specificity)} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{منفی حقیقی + مثبت کاذب}} \times 100 = \frac{4}{4+1} \times 100 = \%80$$

نتایج بررسی حساسیت و ویژگی آنتی سرم تهیه شده

آنتی سرم تهیه شده با ۵۰ نمونه غده مشکوک به طاعون گاوی در تست ژل دیفیوژن بررسی شد که مقدار حساسیت و ویژگی آن در ذیل ارائه گردیده است. طبق این محاسبات حساسیت آنتی سرم تولیدی ۱۰۰٪ و ویژگی آن ۸۰٪ می‌باشد که بسیار قابل توجه است.

بحث

بـه دلیـل آنکـه هنـگام بـروز بیمـاری طاعـون گاوی در یـک مـکان، سـریعاً مناطـق وسـیعی را در بـر خواهد گرفـت، اگـر جمعیت گاوهـای یـک کشـور در مقابـل ایـن بیمـاری ایمن نباشـند، ویـروس مذکـور در مـدت زمان کوتاهـی تمامی‌گله‌هـای کشـور را آلوده کـرده و بـا توجه به میزان شـیوع و مـرگ و میر ۱۰۰- ۹۹٪ ، تلفات سـنگینی بـر جا خواهد گذاشـت (۱، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۶). با وجـود اینکه گله‌های گاو کشـورمان با واکسیناسـیون علیه این بیماری مصون می‌باشند، اما به علت آنکه بیماری در خاورمیانه به صورت اندمیک وجود داشـته و کشـورهای همسـایه ایـران نظیر پاکسـتان و عـراق از مناطق آلـوده می‌باشـند (۷) هـر از چند گاهی بیماری به داخل کشـور نفوذ کـرده و در مناطقی که واکسیناسـیون گاوها بخوبی انجام نگرفته باشـد امکان بروز بیماری وجود دارد (۷). شناسـایی سـریع و پاکسـازی مناطق مذکور از اهمیت ویژه ای برخوردار اسـت. شـیوع این بیماری در سـال‌های ۶۱ و ۶۶ و آلودگی‌های انفرادی سال‌های ۶۸ و ۶۹ دلیلی بر تأیید این قضیه

می‌باشـد. اسـتفاده از تسـت آگار ژل ایمنودیفیوژن یکی از روش‌های تشخیص سـریع برای این بیماری می‌باشد که طی سالیان متمادی توسط محققین کشـورهای مختلف توصیه گردیده است. با این روش می‌توان هر چه سـریعتر نسبت به ایزوله کردن یا از بین بردن دام‌های مشکوک و آلوده اقدام نمود (۷، ۱۰، ۱۱، ۱۵).

در این تحقیق نتایج کشت سلولی پرایمری کلیه نوزاد خرگوش و تلقیح ویـروس تخفیف حدت یافته طاعـون گاوی بر روی آن قابل توجه بوده و با نتایج محققین دیگر کشورها مطابقت دارد (۴، ۸، ۹، ۱۲).

بـه منظـور هر چه سـریع‌تر و کم هزینه تر شـدن مراحل تشـخیص و انجـام تسـت مذکـور، تهیـه سـرم هیپرایمیـون ویـروس طاعـون گاوی در ایـن پژوهـش مـد نظر قـرار گرفته اسـت. کـم شـدن هزینه تشـخیص و در دسـترس بودن آنتی سـرم مورد نیـاز موجب راه انـدازی تسـت آگار ژل ایمنـو دیفیـوژن در مراکـز درمانـی، تشـخیصی دامـی می‌گردد که در زمان کوتاه‌تری احتمال آلودگی مشخص گردد.

نتایج بدست آمده از سرم هیپرایمیون تولید شده در تست ژل دیفیوژن در مقایسه با نتایج محققین سایر کشورها بسیار قابل توجه می‌باشد. در حد استاندارد تیتر آنتی سرم در تست SN، کمتر از ۱:۸ به عنوان منفی و بیشتر از آن مثبت تلقی می‌شود (۶، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۵).

آنتی سـرم تولید شده در خرگوش شـماره ۱ دارای تیتر ۳۲ : ۱ و در خرگوش شـماره ۲ دارای تیتر ۶۴ : ۱ می‌باشـد که بسیار مناسب می‌باشد. این آنتی سـرم جهت استفاده در آزمایشگاههای تشخیصی دامی‌به صورت لیوفیلیزه در آمده و نگه داری شـدند. همچنین ویروس عادت داده شده به سلول خرگوش نیز به صورت لیوفیلیزه در آمد. از مزایای دیگر این محصول عدم اسـتفاده از پادگن‌های آلوده به پروتئین‌های گاوی اسـت بنابر این در تسـت ژل دیفیوژن نتایج مثبت کاذب ایجاد نمی‌شود. در دیگر کشورها نیز عـادت دادن ویروس بر روی سـلول‌های خرگوش به منظور تهیه واکسـن طاعون گاوی صورت می‌گیرد (۳). تیتر ویروس عادت داده شـده به سـلول خرگوش 10^{-5} می‌باشـد که با چند تزریق متوالی به خرگوش و جمع آوری آنتی سـرم منجر به تولید سرم هیپرایمیون می‌گردد. در بررسی حساسیت و ویژگی این محصول، میزان حساسـیت ۱۰۰٪ تعیین گردید. یعنی اینکه تمام نمونه‌ها منفی می‌باشـد. از چهار نمونه منفی یک نمونه را مثبت نشان داده بنابراین ویژگی آن ۸۰ ٪ می‌باشد که بسیار مناسب است.

پاورقی‌ها

1- Agar Gel Immundiffusion Test
2- Enzymatic Disaggregation
3- Cytopathic Effect
4- Serum Neutralization
5- Rinder Pest
6- Immunohistochemistry
7- Peste des Petits Ruminants
8- Reverse – Transcription Polymerase Chain Reaction
9- Confluency
10- Trypsin + Versene
11- Inoculation
12- Bovine Kidney
13- Attachment
14- Sensitivity
15- Specificity

منابع مورد استفاده

1– Anderson, I., Barrett T. and Scorr G.R, 1966; Manual on the diagnosis of rinderpest. Second Edition. FAO Animal Health Manual No 1 Food and Agriculture Organisation of the United Nation (FAO),Rome , Italy, 143 pp.

2– Barrett, T., Forsyth M., Inui K ., Wamwayi H.M., Kock R ., Mwanzia J. and Rossiter P.B., 1998; Rediscovery of the second African Lineage of rinderpest virus: Its epidemiological significance. Vet . Rec., 142: 669- 671.

3- Barett, T., Parida S ., Walsh P ., Anderson J . and Baron M., 2003; New rinderpest vaccines: Marker genes for the plowright vaccine. Proceedings of the Global Rinderpest Eradication Programme (GREP) Technical consultation 2002, Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy.

4- Brown, C.C., 1997; A review of three pathology-based techniques for retrospective diagnosis of rinderpest, with comparison to virus isolation. R. Vet. Sci., 63: 103-106.

5- Bruning, A., Bellamy K., Talbot D. and Anderson J., 1999; A rapid chromatographic test for the pen-side diagnosis of rinderpest virus. J. Virol. Methods, 81: 143-154.

6- Foreman, A.J., Rowe L.W. and Taylor W.P., 1983; The detection of rinderpest antigen by agar gel diffusion and counterimmunoelec trophoresis. Trop. Anim. Health Prod., 15: 83-85.

7- Hussain, M., Iqbal M., Taylor W.P. and Roeder P.L., 2001; Pen-side test for the diagnosis of rinderpest in Pakistan. Vet. Rec., 149:

300-302.
8- Kock, R.A., Wambua J.M., Mwanzia J., Wamwayi H., Ndungu E.K., Barrett T., Kock N.D. and Rossiter P.B., 1999; Rinderpest epidemic in wild ruminants in Kenya 1993-1997. Vet. Rec., 145: 275-283.
9- Mariner, J.C. and Roeder P.L., 2003; Use of participatory epidemiology in studies of the persistence of lineage 2 rinderpest virus in East Africa. Vet. Rec., 152: 641-647.
10- Oau-Ibar-Pace (Organization of African Unity-Interafrican Bureau for Animal Resourses-Pan-African Programme for The Control of Epizootics), 2002; Report on the Eastern African Regional Workshop on Mild Rinderpest. Nairobi, Kenya, 17-19 June 2002.
11- O.I.E, 2004, Terrestrial Manual.
12- Ploright, W. and Ferris R.D., 1961; Studies with rinderpest virus in cell culture. III. The stability of cultured virus and its use in neutralization tests. Arch. Gesamte Virusforsch., 11: 516-533.
13- Roeder, P.L., 2003; Grep status. Proceedings of the Global Rinderpest Eradication Programme (GREP) Technical Consultation 2002, Food and Agriculture Organisation of the United Nation (FAO), Rome, Italy.
14- Roeder, P.L. and Taylor W.P., 2002; Rinderpest . Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 18: 515-547.
15- Taylor, W.P. and Rome L.W., 1984; A microneutralisation test for the detection of rinderpest virus antibodies. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop., 37: 155-159.
16- Taylor, W.P., Roeder P.L., Rweyemamu M.M., Melewas J.N, Mauva P., Kmaro R.T., Mollel J.N., Mtel B.J., Wambura P., Anderson J., Rossiter P.B., Kock R., Melengeya T. and Van Den Ende R., 2002, The control of rinderpest in Tanzania between 1997 and 1998; Trop. Anim Health Prod , 34: 471-487.
17- Yilma, T., Aziz F., Ahmad S., Jones L., Ngotho R., Wamwayi H., Beyene B., Yesus M., Egziabher B., Diop M., Sarr J., and Vlradi P., 2003; Global eradication of rinderpest with recombinant vaccines and rapid diagnostic kits produced in Africa under the auspices of AU IBAR (African Union Interafrican Bureau for Animal Resources) Proceedings of the Global Rinderpest Eradication Programme (GREP) Technical Consultation 2002, Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) , Rome, Italy.
18- Yilma, T., Aziz F., Ahmad S., Jones., Ngotho R., Wamwayi H., Beyene B., Yesus M., Egziabher B., Diop M., Sarr J. and Verardi P., 2003; Inexpensive vaccines and rapid diagnostic kits tailor-made for the global eradication of rinderpest, and technology transfer to Africa and Asia. Dev. Biol. (Basel), 114: 99-111.