بررسی عیار پادتن ضد هاری در سگان واکسینه و غیر واکسینه به روش الیزا در منطقه ارومیه

دکتر احمد مرشدی[1] دکتر الهام اصلانی[2]

هدف: ارزیابی عیار پادتن ضد هاری در سگهای خانگی واکسینه، در زمانهای مختلف بعد از دریافت واکسن و تعداد دوز دریافت شده و مقایسه آن با سگان خانگی غیر واکسینه (پادتن مادری) و سگان ولگرد.

طرح: مطالعه کهورت (هم‌گروهی) به روش گذشته نگر.

حیوانات: سگهای خانگی ولگرد.

روش: خونگیری از سگان و جدا نمودن سرم و اندازه گیری عیار پادتن ضد هاری با آزمون الیزا در سه دسته سگهای خانگی واکسینه، سگان خانگی غیر واکسینه (پادتن مادری) و سگان ولگرد و مقایسه میانگین آنها با یکدیگر به روش آماری.

تجزیه و تحلیل آماری: استفاده از آنالیز واریانس، آزمون "t" و آزمون دانکن.

نتایج: تعداد ۴۹ قلاده از ۶۰ قلاده سگ واکسینه شده (۸۱/۶ درصد) دارای تیتر پادتن محافظت کننده (بین ۲/۴۰ - ۰/۵ واحد در میلی‌لیتر) بودند. لیکن تمام سگان خانگی واکسن نگرفته و ولگرد فاقد عیار با ارزش آنتی بادی بودند. بالاترین عیار پادتن در سگان واکسن گرفته ۲/۴۰ واحد در میلی‌لیتر به دست آمد که ۶ مورد را شامل گردید و همگی سه دوز واکسن Rabigen سویه vibac, SA در فاصله ۲۱ روز دریافت کرده بودند. عیار پادتن مادری در ۶ توله سگ یک تا سه ماهه غیر واکسینه بین ۰/۲۹ تا ۰/۳۰ واحد پادتن در میلی‌لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش حاضر نشان داد که سگهای یکبار واکسینه شده فاقد عیار پادتن ضد هاری قابل قبول در سرم می‌باشند و لذا چند نوبت واکسیناسیون توصیه می‌گردد همچنین واکسینه کردن توله سگها از سن یک ماهگی توصیه می‌شود. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۴، ۶۸-۶۵.*

واژه‌های کلیدی: الیزای هاری، آنتی‌بادی ضد هاری، سگ.

Detection of antirabies Ab titre in vaccinated and nonvaccinated dogs by ELISA in Urmia

Morshedi, A.[1], Aslani, E.[2]

[1]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia – Iran. [2]Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia – Iran.

Objective: Evaluation of antirabies Ab titre in different time after vaccination and number of received dose in pet dogs and compare with nonvaccinated and stray dogs in Urmia.

Design: Cohort study by retrospective method.

Animals: Pet and stray dogs.

Procedure: Taking of blood, serum isolation and measurment of Ab titre by ELISA method in 3 groups of dogs (vaccinated, nonvaccinated pet dogs and stray dogs), determinig of mean titre in each group and compare with others by statistic tests.

Statistical analysis: Using ANOVA, t-test and Duncan's test.

Results: Out of 60 sera from vaccinated dogs, 49 cases (81.6%) had protective Ab titres between 0.5 to 2.40 UI/ml, but nonvaccinated pet dogs and stray dogs didn't show the valuable titre of Ab. The highest titre of Ab obtained in dogs was 2.40 UL/ml, with frequency of 6 samples, which have received 3 doses of rabies vaccines.

Clinical implications: The present study of Ab levels in vaccinated dogs indicated that a single injection dose of rabies vaccine often failed to result adequate protective Ab titre, and did not produce a lasting Ab titre in a significant group of dogs: It is suggested that in rabies endemic regions, dogs should be vaccinated from 3 months of age. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 4: 65-68, 2002.***

Key words: Dog, Antirabies antibody, ELISA.

بیماریهای ویروسی قابل انتقال از حیوانات به انسان بخش مهمی از بیماریهای مشترک را تشکیل می‌دهند. شاید یکی از مهمترین آنها، هاری باشد که از دیرباز شناخته شده است. در کشور ما هاری هنوز به عنوان یکی از معضلات بهداشتی، مطرح می‌باشد و هر ساله خسارات اقتصادی و حیوان گزیدگی انسان را با خود به همراه دارد (۴، ۳). در زنجیره اپی‌دمیولوژیک، سگ به عنوان اصلیترین عامل انتقال بیماری هاری به انسان و سایر حیوانات اصلی مطرح می‌باشد.

هر ساله سگهای هار، عامل ابتلا، ۷۵ هزار انسان به بیماری هاری در سرتاسر جهان می‌باشند (۷). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۸۷ در کشورهای در حال توسعه و جهان سوم، منشأ، بیماری را ۹۱ درصد سگ، ۲ درصد گربه، ۳ درصد سایر حیوانات اهلی، ۲ درصد خفاشها، و ۱ درصد روباه، و ۱ درصد حیوانات وحشی تشکیل می‌دهد. در ایران در سال ۱۳۷۷ از ۲۵۰ مورد هاری گزارش شده در حیوانات، ۳۸ مورد مربوط به سگ (۱۵/۲ درصد) بوده که از این تعداد ۲ مورد مربوط به استان آذربایجان غربی می‌باشد (۲). استفاده از روش الیزا برای تشخیص هاری بر پایه شناسایی نوکلئوکاپسید در بافت مغز (۱۰) و نیز جهت جستجوی آنتی‌بادی ضد هاری در سرم و تعیین واحد آن در میلی لیتر سرم گسترش پیدا کرده است (۱۱). هدف این تحقیق، تعیین تیتر آنتی‌بادی ضد هاری در سگان خانگی واکسینه و غیر واکسینه و همچنین سگان ولگرد و نیز مقایسه عیار آنتی‌بادی در این سه گروه می‌باشد.

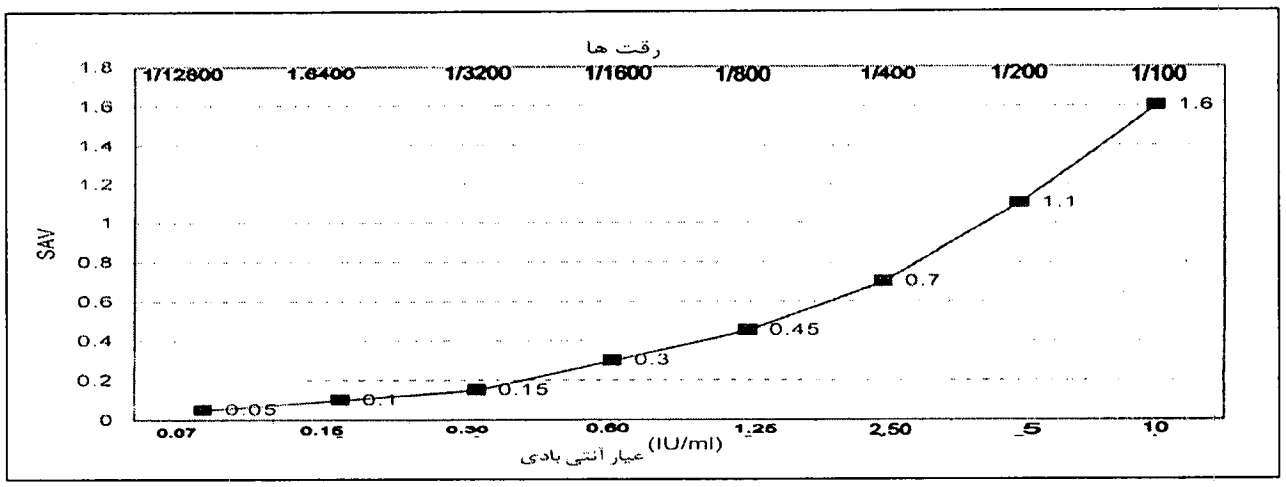
مواد و روش کار

نمونه‌گیری: خونگیری از ورید سفالیک دست با سر سوزن نمره ۲۱ به مقدار ۳ - ۲ میلی لیتر صورت می‌گرفت و پس از جدا شدن سرم در فریز ۲۰- درجه سانتیگراد تا هنگام آزمایش نگهداری می‌گردید.

برگه‌های نمونه برداری: تمام مشخصات سگان مورد آزمایش شامل سن، جنس، نژاد، نام صاحب دام، آدرس، تاریخ نمونه برداری و تاریخ نوبتهای واکسن زدن در برگه‌های شماره‌دار ثبت می‌شد. با جمع‌آوری اطلاعات از مراکز توزیع واکسن هاری در ارومیه مشخص شده نام واکسن به کار رفته Rabigen، سویه‌های ساخت (Virbac, S.A.0 6516 Carros) کشور فرانسه بوده که یک دوز آن حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر واکسن غیر فعال هاری می‌باشد. **کیت الیزای هاری:** از کیت تجارتی ساخت شرکت Pasteur diagnostic فرانسه به نام Platelia Rabies Kit استفاده شد. هر کیت شامل ۲ پلیت ۹۶ خانه پوشیده با آنتی ژن گلیکوپروتئینی ویروس هاری، بافر شوینده، بافر رقیق کننده

۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.



نمودار ۱- رسم منحنی استاندارد با استفاده از SAV های سرم کنترل مثبت از رقت ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰.

سرم، سرم شاهد منفی، سرم شاهد مثبت با عیار معلوم، کنژوگه پروکسیداز غیر ایمونوگلوبینی (پروتئین A استافیلوکوک طلایی نشان دار شده با پروکسیداز) بافر سوبسترا، کروموژن OPD (ارتوفنیلن دی آمین) و محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک ۴ نرمال) بود. سمپلرهای یک کاناله ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میکرولیتری و سمپلر ۸ کاناله ۱۰۰ میکرولیتری. **دستگاه خواندن الیزا:** شامل یک فتومتر دیژیتال همراه با چاپگر مدل Denly well - scan.

روش کار: ۱- تمام محلولها و معرفها نیم ساعت قبل از مصرف در حرارت آزمایشگاه قرار می‌گرفت. **۲**- از نمونه های سرم یک رقت ۱ درصد در بافر رقیق کننده آماده گردید و از هر نمونه به دو حفره متوالی میکروپلیت (به صورت Duplicate) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در حفره ریخته شد. **۳**- از سرم شاهد مثبت و شاهد منفی رقتهای متوالی دهگانه آماده و به ترتیب در ستونهای ۹ و ۱۰۰ ردیف A تا H شاهد مثبت و در ستونهای ۱۱ و ۱۲ A تا H شاهد منفی ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در حفره اضافه گردید. پلیت به مدت یکساعت در انکوباتور ۴۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد و پس از یکساعت محتویات پلیت را خالی کرده و با اضافه کردن ۰/۳۳ میلی لیتر بافر شوینده به هر حفره، سه بار شسته شد و بار آخر به منظور خشک شدن، پلیت روی کاغذ خشک کن برگردانده شد. **۴**- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه پروکسیداز که قبلاً به نسبت ۱/۱۰ رقیق شده بود در هر حفره ریخته شد و مدت یکساعت در انکوباتور ۴۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد. بعد از این مدت محتوی پلیت خالی گردید و ۴ بار برابر بند ۴ شسته شد. **۵**- یک قرص کرموژن OPD به ۱۰ میلی‌لیتر بافر سوبسترا که حاوی ۰/۳ درصد آب اکسیژنه بود اضافه گردید و پس از حل شدن کامل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کرموژن دور از نور مستقیم به هر حفره اضافه و مدت ۳۰ دقیقه آن را در زیر سرپوش تاریکی قرار دادیم تا واکنش تغییر رنگ کروموژن انجام گیرد، بلافاصله پس از تغییر رنگ (مشاهده رنگ زرد) ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر حفره اضافه گردید. **۶**- میکروپلیت آماده خواندن بود و SAV یا میزان جذب نوری حفرات با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد و توسط چاپگر متصل به دستگاه روی کاغذ ثبت گردید (برابر دستور سازنده کیت).

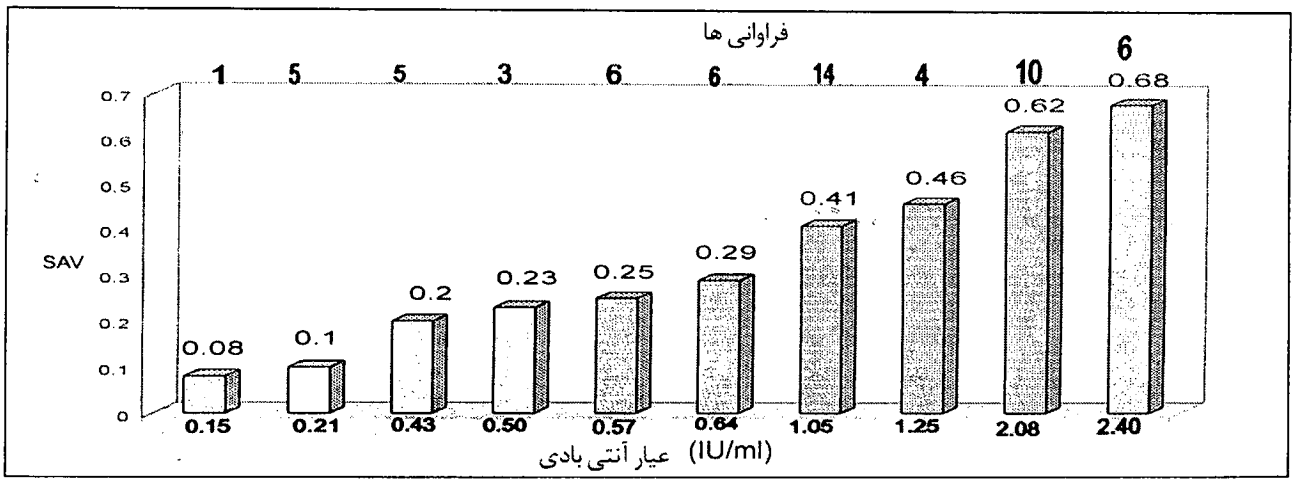
اصول آزمون الیزای هاری برای جستجوی پادتن ضد هاری در سرم: میکروپلیت‌ها با آنتی‌ژن گلیکوپروتئینی ویروس هاری پوششدار شده است. این آنتی‌ژن قادر است با پادتن مصونیت دهنده که همان پادتن خنثی کننده ویروس است واکنش نماید. برای به دست آوردن SAV خالص هر نمونه مورد آزمایش، عدد SAV حاصل از رقت ۱/۱۰۰ سرم شاهد منفی از عدد SAV نمونه کسر می‌گردید.

SAV خالص مربوط به سرم مثبت رفرنس در هر یک از رقتها نیز از تفریق عدد SAV سرم منفی رفرنس در همان رقت به دست می‌آید. سرم مثبت رفرنس در رقت ۱/۱۰۰ حاوی ۱۰ واحد بین‌المللی پادتن در میلی‌لیتر بود. از این رو در رقتهای ۱/۲۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰ به ترتیب حاوی ۵، ۲/۵ ... تا ۰/۰۷۵ واحد پادتن در میلی‌لیتر خواهد بود که با در دست داشتن SAV های حاصل از رقتهای سرم مثبت رفرنس، منحنی استاندارد رسم گردید (نمودار ۱). به این ترتیب که SAV های خالص روی محور عمودی و مقدار پادتن/ میلی لیتر روی محور افقی گذاشته شد. میزان واحد پادتن / میلی‌لیتر هر نمونه سرم مورد آزمایش با گذاردن عدد SAV خالص آن روی محور عمودی و پیدا کردن نقطه نظیر آن روی محور افقی تعیین گردید. حداقل عیار آنتی‌بادی محافظت کننده ۰/۵ واحد بین‌المللی پادتن/ میلی‌لیتر سرم می‌باشد (۹).

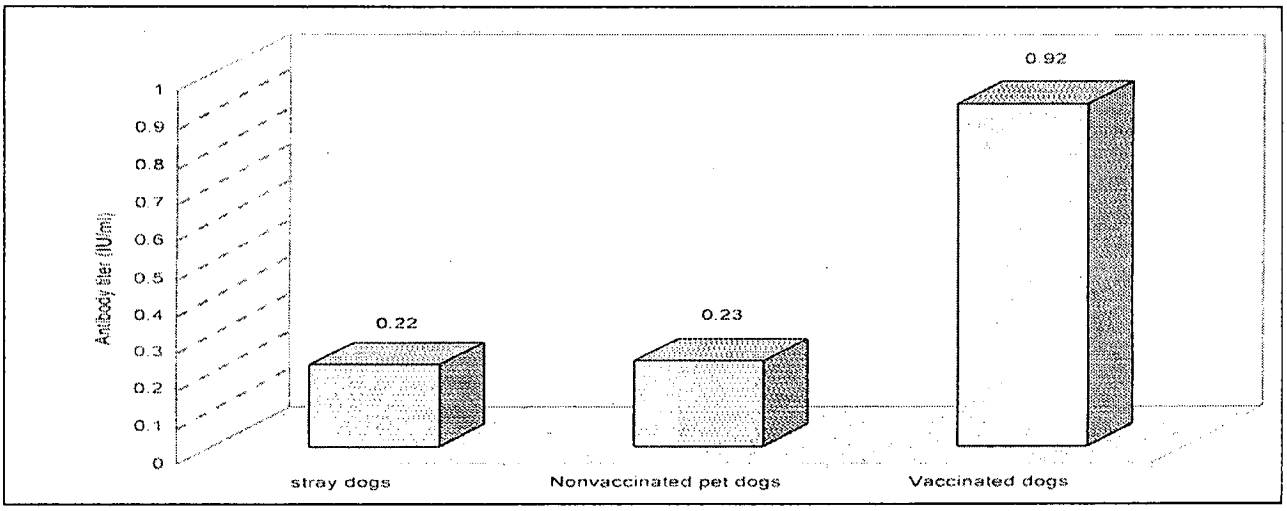
نتایج

در این بررسی تعداد ۱۰۰ نمونه سرم که ۶۰ نمونه آن مربوط به سگان خانگی واکسینه شده با واکسن غیر فعال و ۲۵ نمونه سگان خانگی غیر واکسینه و ۱۵ نمونه دیگر مربوط به سگان ولگرد بود. جهت تعیین عیار پادتن ضد هاری مورد آزمون به روش الیزا قرار گرفت. و از بین ۶۰ نمونه سگان واکسینه ۴۹ نمونه (۸۱/۶ درصد) دارای تیتر آنتی بادی ۰/۵IU/ml و بالاتر بودند به طوری که بین ۰/۵۰-۲/۴۰ واحد متغیر بود. و ۱۱ نمونه (۱۸/۲۲ درصد) عیار آنتی بادی کمتر از ۰/۵IU/ml داشتند که بین ۰/۱۵-۰/۴۳ واحد قرار داشت. حال آنکه تمام سگان خانگی غیر واکسینه و ولگرد فاقد عیار با ارزش پادتن در سرم بودند. حداکثر آنتی‌بادی در سگان واکسینه ۲/۴۰ IU/ml و کمترین آن ۰/۱۵ IU/ml به دست آمد که به ترتیب بزرگترین عدد SAV خالص ۰/۶۸ و کوچکترین عدد SAV خالص ۰/۰۸ را داشتند. فراوانترین عیار آنتی بادی در بین سگان واکسینه مربوط به عیار ۱/۰۵IU/ml بود که تعداد ۱۴ نمونه دارای عیار مذکور بودند (هیستوگرام ۱و ۲).

داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد و با انجام آزمون "t"، آنالیز واریانس و آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد)، نتایج زیر به دست آمد: ۱- بین میانگین تیتر آنتی‌بادی سگهای ولگرد و سگهای خانگی غیر واکسینه، تفاوت معناداری وجود ندارد. ۲- بین میانگین تیتر آنتی‌بادی سگهای خانگی واکسینه و



هیستوگرام ۱- فراوانی تیتر آنتی بادی ضد هاری موجود در سرم سگهای خانگی واکسینه.



هیستوگرام ۲- مقایسه میانگین تیتر آنتی بادی ضد هاری در سه گروه مورد بررسی.

سگهای ولگرد، تفاوت معناداری وجود دارد (P<۰/۰۵). ۳- بین میانگین تیتر آنتی بادی سگهای خانگی واکسینه و سگهای خانگی غیر واکسینه تفاوت معناداری وجود دارد (P<۰/۰۵).

برای روشن شدن ارتباط بین میانگین تیتر آنتی‌بادی در این سه جامعه، علاوه بر آزمون "t" از آنالیز واریانس هم استفاده شد و با احتمال P<۰/۰۵، ملاک F= ۱۶/۷۲۴۴ به دست آمد که نشان می‌دهد تفاوت معناداری بین میانگین تیتر آنتی‌بادی در این سه گروه وجود دارد. با توجه به آنالیز واریانس، برای مشخص شدن گروههای متفاوت از آزمون دانکن استفاده شد و مشخص گردید که بین میانگین تیتر آنتی‌بادی سگهای ولگرد و سگهای خانگی واکسن نگرفته با سگهای خانگی واکسینه، در سطح احتمال P<۰/۰۵ اختلاف معناداری وجود دارد، ولی بین میانگین تیتر آنتی بادی سگهای ولگرد و سگهای خانگی واکسن نگرفته، تفاوت معناداری وجود ندارد (جداول ۱ و ۲).

بحث

آزمون الیزا برای شناسایی آنتی‌ژن ویروس هاری در سگان و سایر حیوانات به استثنا گاو و اسب مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲). این آزمون در سنجش عیار آنتی بادی سگان واکسینه نیز به کار رفته است (۵).

Gangadhar و Raghavan در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که سن اولین واکسن گرفتن در روی تولید آنتی‌بادی بر ضد هاری تأثیری ندارد. Supakron و همکاران در سال ۱۹۹۶ آنتی‌بادی ضد هاری را در سرم تعدادی توله سگ قبل از اولین واکسن اندازه‌گیری کرده و نشان دادندکه تعدادی از آنها دارای آنتی‌بادی مادری می‌باشند (۱۳).

جدول ۱- جدول آنالیز واریانس در سطح اطمینان ۹۵ درصد (آزمون F).

منابع اختلاف	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	ملاک F
بین گروهها	۲	۳/۸۸۰۴	۱/۹۴۰۲	۱۶/۷۲۴۴
داخل گروهها	۴۷	۵/۴۵۲۵	۰/۱۱۶۰	
کل	۴۹	۹/۳۳۲۹		

جدول ۲- آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد.

نتیجه	میانگین ± SD	گروه
a	۰/۹۲۸۰±۰/۷۷۳	سگهای خانگی واکسینه
b	۰/۲۳۷۹±۱/۰۴۲	سگهای خانگی غیر واکسینه
c	۰/۲۲۲۵±۰/۰۴۹	سگهای ولگرد

انحراف معیار (SD: Standard Deviation). حروف مشابه، بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار در سطح احتمال P<۰/۰۵ می‌باشد.

عیار بالای آنتی‌بادی مادری تا سن ۲/۵ در توله سگان وجود دارد و بعد از ۲/۵ ماهگی در توله سگان وجود دارد و بعد از ۳/۵ ماهگی عیار آن سقوط می‌کند (۸).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که از بین ۲۵ نمونه غیر واکسینه خانگی، شش نمونه سرم که مربوط به توله‌های ۱ تا ۳ ماهه بودند تیتر آنتی بادی مادری پایینی بر ضد هاری داشتند که بین ۰/۲۹ تا ۰/۳۰ واحد پادتن / میلی لیتر بود. در بقیه موارد واکسینه نشده تیتر آنتی بادی بین IU/ml ۰/۲۷ - ۰/۱۵ بود. از بین ۶۰ مورد سگان واکسن گرفته، ۱۵ مورد که ۷ تا ۸ ماه از تاریخ واکسن آنها می‌گذشت تیتر آنتی بادی در آنها IU/ml ۰/۶۴ - ۰/۵۰ بود. ۲۸ نمونه سرمی مربوط به سگانی بود که ۳-۱ ماه قبل از خونگیری واکسن دریافت کرده بودند، و تیتر آنتی بادی هاری بین IU/ml ۲/۰۸ - ۱/۰۵ نشان دادند. در بین سگان واکسن گرفته، ۶ مورد نیز که همگی سه دوز واکسن دریافت کرده بودند، بالاترین تیتر یعنی IU/ml ۲/۴۰ را داشتند و در هنگام خونگیری حدود ۶-۴ ماه از تاریخ واکسن آنها می‌گذشت. ۱۱ نمونه از سگان واکسینه که بیش از ۹ ماه از واکسن گرفتن آنها می‌گذشت و تنها فقط یک دوز واکسن گرفته بودند از حداقل محافظت کننده هم پایینتر بود، به طوری که بین IU/ml ۰/۴۳ - ۰/۱۵ متغیر بود.

۱۵ نمونه سرمی که از سگان ولگرد گرفته شده بود تیتر خیلی پایینی از پادتن را نشان دادند که بین IU/ml ۰/۲۵ - ۰/۱۵ بوده و در معرض خطر ابتلا به هاری هستند. در این مطالعه همچنین نشان داده شد سگانی که فقط یک دوز واکسن دریافت کرده بودند عیار آنتی بادی پایینتری نسبت به سگانی که دو یا سه دوز واکسن دریافت کرده بودند، نشان دادند، به طوری که عیار پادتن ضد هاری در آنها بین ۰/۱۵ تا ۰/۶۴ واحد متغیر بود. نظر به اینکه عیار با ارزش (محافظت کننده) حداقل ۰/۵ واحد / میلی لیتر می‌باشد، از این‌رو ۴۲/۳ درصد (۱۱ از ۲۶ سگ) از سگان که فقط یکبار واکسن گرفته بودند فاقد عیار محافظت کننده پادتن بودند. با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون "t"، آنالیز واریانس و نیز با توجه به نکات ذکر شده، این نتیجه به دست می‌آید که بین میانگین تیتر پادتن سگان ولگرد و سگان خانگی غیر واکسینه، تفاوت معناداری وجود ندارد. نتیجه دیگر اینکه بین میانگین تیتر آنتی بادی سگان خانگی واکسن گرفته با سگان خانگی غیرواکسینه و سگان ولگرد، تفاوت معنادار آماری وجود دارد. با مرور کلی مطالب ذکر شده می‌توان گفت، سگان خانگی غیر واکسینه و سگان ولگرد که فاقد ایمنی در برابر هاری هستند بیش از سگان واکسن گرفته‌ای که تیتر پایینی از آنتی بادی دارند، در معرض خطر ابتلا به هاری قرار دارند. نادیده گرفتن جمعیت جوان سگان خانگی غیر واکسینه و نیز از بین نبردن سگان ولگرد از علل عدم موفقیت در برنامه ایمن سازان و ناتوانی در کنترل هاری می‌باشد. ایمن سازی سگان به موقع و طبق برنامه می‌تواند نقش مهمی را در پیشگیری از هاری در سگان و در نهایت در انسان داشته باشد.

References

۱. آمار سازمان دامپزشکی ایران، دفتر مبارزه با بیماریهای دامی، گزارش عملکرد مبارزه با بیماری هاری در سالهای ۷۷ - ۱۳۷۵ صفحه: ۴۱ - ۲۸.

۲. جنانی، ع. (۱۳۷۵): بررسی ده سال هاری دامی در ایران، نشریه سومین کنگره ملی بیماریهای قابل انتقال بین انسان و حیوان، صفحه: ۱۲۳.

۳. سیمانی، س.، فیاض، ا. (۱۳۷۹): روند بیماری هاری در ایران در پنج سال اخیر (۱۹۹۹-۱۹۹۵)، نشریه چهارمین کنگره ملی بیماریهای قابل انتقال بین حیوان و انسان، پنجم اردیبهشت ۱۳۷۹، صفحه: ۲۵۷-۶.

۴. شریفیان، ج. (۱۳۷۹): بررسی وضعیت حیوان گاز گرفتگی و هاری در کشور، پروتکل درمان، پیشگیری مجروحین و برنامه‌های اجرایی کنترل هاری، نشریه چهارمین کنگره ملی بیماریهای قابل انتقال بین حیوان و انسان، پنجم اردیبهشت ۱۳۷۹، صفحه: ۲۷۲.

5. Bhattacharya, A. and Narayan, K. (1995): Dot – enzyme linked immunosorbent assay – rapid alternative test for the measurment of rabies antibody. Indian J. of Comp. Micr. Immun. and Inf. Dis. 16, 1-2: 61- 63.

6. Delgando, S. and Carmenes, P. (1997): Immune response following a vaccination compaign against rabies in dogs. Prev. Vet. Med. 31, 3-4: 257-261.

7. Fener, F. (1992): Veterinary Virology, pp: 530-541 (Academic press, INC., London).

8. Gangadhar, N. and Raghavan, R. (1996): Determination of maternal antibody levels in pups against rebies by indirect ELISA, International J. of Anim Sci, 11, 1: 267 – 270.

9. Gleixner, A. (1998): Clenbuterol as a marker in baits for oral vaccination of dogs against rabies. Vet. Rec. 143, 3: 65 – 68.

10. Jayakumar, R. (1995): A modified dot ELISA for the detection virus antigen. Indian J. Vir. 11, 1: 51-53.

11. King, A.A. (1998): Rabies, In: Zoonoses Biology, Clinical practice and public Health Control, (Palmer, S. R. et al). PP: 438 – 455, (Oxford University Press, Inc. New York).

12. Shaw, D. and Ihle, S. (1997): Small Animal Internal Medicine 1 st. Edn, pp: 464-65, 561-62, (Williams & Wilkins, USA).

13. Supakron, K. (1996): Maternal antibodies against rabies in thai puppies, J. Med. Assos. Thai, 79, 1: 36-39.