

Köpek gençlik hastalığı virusunun prevalansı ve seroepidemiolojisi

Elvin ÇALIŞKAN¹, İbrahim BURGU²

¹ Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 06020 Etlik/Ankara; ² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı/ Ankara

Özet: Çalışmada, Köpek Gençlik Hastalığı ön tanısı olan 157 adet hayvandan alınan nazal, konjunktival ve rektal sürüntü, gaita, lökosit ve organ numuneleri Köpek Gençlik Hastalığı virus nükleik asit varlığı yönünden Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile test edildi. Testler sonucunda 51 hayvanda Köpek Gençlik Hastalığı virusu tespit edildi. Bu hayvanlara ait farklı klinik örnekler pozitiflik yönünden değerlendirildi. Ayrıca pozitiflik tespit edilen 47 olguya ait kan serum örnekleri IgM ve IgG varlığı yönünden incelendi. Değerlendirmeler sonucunda klinik örneklerde en yüksek pozitiflik oranının nazal sürüntü örneklerinde olduğu saptandı. Serolojik değerlendirmeler sonucunda hayvanların genelinin akut enfeksiyon döneminde olduğu belirlendi. Aşılandığı bildirilen 21 olguda ise enfeksiyonun geliştiği tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Köpek Gençlik Hastalığı, Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR), IgM, IgG, ELISA

Canine Distemper Virus Prevalence and Seroepidemiology

Summary: Nasal, conjunktival and rectal swabs, feces, leucocyte and organ samples were obtained from 157 animals clinically suspected Canine Distemper infected. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction were performed for the detection of viral nucleic acid. According to the test 51 cases were found positive. The positivity rates among different clinical samples were examined. Besides, existence of IgM and IgG in sera samples from CDV positive 47 cases were evaluated. It was found that, among clinical samples collected from CDV positive cases nasal swabs had higher viral nucleic acid detection rates than other specimens. Results obtained by ELISA IgM showed that most cases are at the acute phase. Twenty-one cases, known to be vaccinated, were found positive.

Key Words: Canine Distemper, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, IgM, IgG, ELISA

Giriş

Canine Distemper (CD) veya Köpek Gençlik Hastalığı olarak da bilinen enfeksiyon bir çok evcil ve vahşi karnivor türünde yaygın olarak görülen önemli viral enfeksiyonlar arasında yer alır (Mochizuki ve ark., 1999). Enfeksiyon dünya çapında oldukça yaygındır ve özellikle immünolojik olarak zayıf popülasyonlarda yüksek bulaşma ve ölüm oranına sahiptir. 16.yüzyıldan itibaren varlığı bilinen bu hastalığın etkeninin bir virus olduğu, ilk olarak 1906 yılında Carré tarafından tespit edilmiştir (Appel ve Summers, 1999). Köpek Gençlik Hastalığı Virus (CDV), Paramyxoviridae ailesi içinde bulunan Morbillivirus genusuna dahildir ve bu genusun diğer üyeleri ile oldukça yakın genetik ve dolayısıyla antijenik ilişkiye sahiptir (Mochizuki ve ark., 1999; von Messling ve ark., 2001). CDV' nin genetik materyali segmentsiz, tek zincirli, lineer ve negatif polariteli bir RNA molekülüdür. Viral genom uzunluğu 15.690 baz çiftidir (bp) (Sidhu ve ark., 1993b). Viral genomda toplam 6 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla, Nükleokapsid Pro-

teini (N), Fosfoprotein (P), Matriks Proteini (M), Füzyon Proteini (F), Hemagglütinin Proteini (H) ve Polimeraz Proteini (L) gen bölgeleridir (Abraham ve Banerjee, 1976; Sidhu ve ark., 1993b; Whelan ve ark., 2004). H proteini CDV'nin iki yüzey proteininde biridir ve virusun hücresele reseptörlere tutunmasını sağlar. Bununla birlikte H proteini viral tropizmin ve sitopatojenitenin başlıca belirleyicisi olarak ifade edilmektedir (Haas ve ark., 1997; von Messling ve ark., 2001).

CDV' nin hedefi tüm vücutta bulunan lenfoid doku ve muköz membran hücreleridir. Viral affiniteye bağlı olarak solunum, sindirim ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonları ile birlikte bazı durumlarda deri döküntüleri ve hiperkeratozun da eşlik ettiği akut, subakut ya da kronik bir enfeksiyon tablosu gelişir (Appel ve Summers, 1995; Mochizuki ve ark., 1999). CD' nin erken klinik teşhisi zordur çünkü enfeksiyonun başlıca semptomları olan burun akıntısı ve ishal diğer solunum ve sindirim enfeksiyonlarında da görülmektedir. Hastalığın teşhisi ancak ilerleyen dönemlerde ortaya çıkan

kordinasyon bozukluğu, myoklonus ve konvülsiyonlar ile karakterize sinir sistemi bulgularına dayanılarak yapılmaktadır. Enfekte hayvanlarda uygun tedavi seçeneklerinin saptanması açısından erken teşhisin büyük önemi vardır (Cho ve Park, 2005).

Bu çalışmada, farklı klinik örneklerde CDV nükleik asit varlığının araştırılması ve CD pozitif olduğu belirlenen olgulara ait kan serum örneklerinde IgM ve IgG yönünden serolojik bir değerlendirilmenin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklenen hayvanlar

Çalışmada örneklenen hayvanlar, 2004–2006 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri ve Patoloji Anabilim Dalı, özel veteriner klinikleri ve hayvan barınaklarından temin edildi. Örneklemede yüksek ateş, solunum, sindirim ve/veya sinir sistemi enfeksiyonlarına ait bulgular gösteren ya da enfeksiyon riski olan hayvanlar ile birlikte barındırılan hayvanlar kullanıldı. Bu doğrultuda CDV enfeksiyonu ön tanısı konulan çeşitli yaş grubu ve ırktan 157 adet farklı hayvandan alınan örnekler reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonuna (RT-PZR) tabi tutuldu.

Serum örnekleri

Serolojik testlerde kullanılmak amacıyla, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri, özel veteriner klinikleri ve hayvan barınaklarından sağlanan ve CDV pozitifliği saptanan 47 olguya ait kan serum örneği kullanıldı.

Nazal ve konjunktival sürüntü örneklerinin hazırlanması

Nazal ve konjunktival sürüntü örnekleri, içerisinde Fosfat Tamponlu Tuz solüsyonu (PBS) bulunan, rayon (selüloz fiber) kaplı ticari swap çubukları (Cultiplast-LP, İtalya) kullanılarak toplandı. Laboratuvarında swap tüpleri karıştırıcı (vorteks) ile karıştırıldıktan sonra tüp içerisindeki sıvı steril tüplere alındı, +4°C' de 3000 rpm' de, 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, nükleik asit varlığını araştırmak için 400µl örnek 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı.

Gaita örneklerinin hazırlanması

Gaita örnekleri, PBS ile 1/10 oranında süspanse edildi, +4°C de, 3000 rpm'de, 20 dakika santrifüj

edildikten sonra süpernatant steril bir stok tüpüne alındı. Gaita örneklerinin elde edilemediği durumlarda ise rektal sürüntü örnekleri kullanıldı. Rektal sürüntü örneklerinin hazırlanmasında nazal ve konjunktival sürüntü örneklerinde bildirilen yöntem kullanıldı. Nükleik asit varlığını araştırmak için, 400µl örnek 1.5 ml'lik bir tüpe aktarıldı.

Lökosit örneklerinin hazırlanması

EDTA içeren antikoagulanlı tüplere (Vacutainer, Almanya) alınan kan örnekleri 2000 rpm' de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Ayrılan lökosit tabakası içerisinde 1ml PBS bulunan steril bir tüpe aktarıldı ve 2000 rpm' de 10 dakika süre ile tekrar santrifüj edilerek lökosit yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Son yıkamada elde edilen lökosit tabakası 1ml PBS içeren steril stok tüpüne aktarıldı. Nükleik asit varlığını araştırmak için, 400 µl örnek 1.5ml'lik bir tüpe aktarıldı.

Organ örneklerinin hazırlanması

Organ örneklerinden alınan yaklaşık 1gr doku -20°C de bir kere dondurulup çözüldükten sonra homojenizatör yardımıyla (Braun, Almanya) parçalandı. Elde edilen homojenizat, +4°C de, 3000 rpm' de, 20 dakika santrifüj edildi. Organ homojenizatları steril stok tüplerine aktarıldı. Nükleik asit varlığını araştırmak için, 400µl örnek 1.5ml'lik bir tüpe aktarıldı.

Serum örneklerinin hazırlanması

Silikonlu tüplere (Greiner, Almanya) alınan kan örnekleri pıhtılaşmayı takiben 3000 rpm' de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj ile ayrılan kan serumu, steril tüplere aktarıldı. Test aşamasına kadar -20°C de saklandı.

RNA ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonunda Chomczynski ve Sacchi (1987) tarafından tanımlanan Asit Guanidin tiyosiyanat-Fenol ekstraksiyon metodu kullanıldı. Bu amaçla 400µl klinik örnek ve 400µl solüsyon D (4.2M Guanidin tiyosiyonat, 0.75M Sodyum Sitrata dihidrat, 0.33M N-Lauril sarcosin ve 360µl 2-merkaptotanol) karışımı 1.5 ml'lik tüp içerisinde bir araya getirildi ve karıştırıldı. Karışımın üzerine 300µl asit fenol (pH 4), kloroform-izoamilalkol [Ch/IsoA (49:1)] ve 100µl 3M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve homojen bir karışım elde edilene kadar 15 saniye süre ile karıştırıldı. Tüpler masaüstü santrifüjde, oda ısısında, 12000 rpm de 10 dakika

santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 fazın en üst fazından 700 µl yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine eşit hacimde -20°C'ye soğutulmuş 2-izopropanol ilave edildi ve karıştırıldı. Nükleik asit presipitasyonu için karışım en az 1 saat süre ile -80 °C de bekletildi. Süre sonunda donmuş olan karışımlar oda ısında eritildikten sonra, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çöken RNA pelleti, %70' lik etanol ile yıkandı ve 37°C lik etüvde kurutuldu. Kurutulan pelletler 20 µl deiyonize su (18 Mohm/cm) (Applichem, Almanya) ile çözüldü.

Reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)

Ekstraksiyon sonunda elde edilen RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla RT-PZR, Özkul ve ark. (2004) tarafından tanımlanan yöntem ile sırasıyla 10µl ve 50µl' lik hacimlerde gerçekleştirildi. İki aşamada yapılan cDNA sentezi, iki farklı karışımdan oluşan ve birbirini takip eden iki reaksiyon sonucu gerçekleştirildi. İlk basamakta, 3µl RNA, 0.5µl heksamer primer ve 3.5µl deiyonize su bileşenlerinden oluşan karışım I hazırlandı ve termal çevirici cihazda (Biometra, Almanya) ikincil RNA yapılarının açılması için, 70°C de 5 dakikalık ısı döngüsü uygulandı. Cihazdan alınan tüpler buz akülerinde soğutuldu. Bunu takiben 0,5µl MMLV reverz transkriptaz (RT), 2µl 5X RT buffer ve 1µl dNTP bileşenlerinden oluşan karışım II hazırlandı. Soğutulmuş karışım I' in üzerine karışım II' den 3.5µl eklendi ve 25°C de 5 dakika, 37°C de 1 saat ve 70°C de 5 dakika basamaklarından oluşan ısı döngüleri sonunda tek iplikli cDNA sentezi gerçekleştirildi. Takiben DNA'nın standart PZR yoluyla çoğaltılması aşamasına geçildi. H proteini gen bölgesinin kısmi amplifikasyonu amacıyla elde edilen cDNA, FF1-HR2 primer çifti ile PZR'ye tabi tutuldu. Araştırmada kullanılan primer dizinleri ve ilgili genler üzerindeki yerleşimleri Çizelge1' de sunulmuştur.

DNA amplifikasyonu için tanımlanan 50 µl lik PZR karışımı 3µl cDNA, 0,5µl Taq DNA polimeraz, 5µl 10X Taq buffer, 4µl MgCl₂ (25mM), 0,8µl dNPT (10mM), 0,8µl primer ve 35,1µl deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Termal çevirici cihazında bulunan karışım tüplerine 94°C de 4 dakikalık denatürasyon basamağını takiben 56°C de 45 saniye, 72°C de 2 dakika ve 94°C de 30 saniyelik 35 döngüden oluşan çoğaltma basamağı ve 50°C

de 1 dakika, 72°C de 10 dakikalık son uzama basamağından oluşan ısı döngüleri uygulandı. Reaksiyon sonunda agaroz jelde DNA ürünlerinin göçü sağlandı ve oluşan bantlar UV transilluminatör (Vilber Lourmat, Fransa) ve jel dokümantasyon sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) yardımı ile görüntülendi.

Çizelge 1: PZR' de kullanılan primer dizinleri, yerleşimleri ve elde edilen ürün büyüklükleri.

Primer Kodu	Dizin (5' →3')	Bölge (nt)	Ürün Büyüklüğü (bp)
CDV FF1	TCGAAATCCTATGTGAGATCACT	6897	1301
CDV HR2	GTTCTTCTGTTTCTCAGAGG	8198	

RT-PZR ile pozitif olduğu saptanan 8 olguda her iki antikorun da varlığına rastlanmadı ve bu olguların 7' sinin CD sonucunda öldüğü belirlendi. Söz konusu grup içerisinde bulunan hayvanların aşılanmadığı belirtildi. Olguların 15' inin ise her iki antikor varlığı yönünden pozitif olduğu saptandı ancak, sonuçlar ölüm oranları düzeyinde ilişkilendirilemedi.

Anamnez kayıtlarından, 47 olgudan 21'inin CD' ye karşı aşılanmış olduğu belirlendi. Bu olgulardan 19 unda IgM ve 12 sinde IgG varlığı tespit edilemedi. Bu grup içerisinde 12 olgunun CD sonucunda öldüğü belirlendi. 5 olguda (Olgu 8, 24, 31, 34 ve 39) her iki antikorun varlığına rağmen hastalığın ölüm ile sonuçlandığı belirlendi. 4 olguda ise hayvanların son durumlarına ait bilgi sağlanamadı.

Çizelge 2: Olgulara ait IgM ve IgG ELISA sonuçları.

Olgu No	IgM	IgG	SON DURUM
Olgu 1	-	+	Ö
Olgu 2*	+	-	Ö
Olgu 3	+	-	Ö
Olgu 4*	+	-	Y
Olgu 5*	+	+	B
Olgu 6	-	-	Ö
Olgu 7*	+	-	Ö

Olgu 8*	+	+	Ö
Olgu 9	-	-	B
Olgu 11*	-	+	Y
Olgu 12*	-	+	Y
Olgu 13*	+	-	Y
Olgu 14*	+	-	Ö
Olgu 15	-	-	Ö
Olgu 16*	+	+	B
Olgu 17*	+	+	B
Olgu 18	-	-	Ö
Olgu 19	-	-	Ö
Olgu 20	-	-	Ö
Olgu 21*	+	-	Ö
Olgu 22*	+	-	B
Olgu 23*	+	+	Ö
Olgu 24*	+	+	Ö
Olgu 25	-	+	Ö
Olgu 26	+	+	Y
Olgu 27*	+	+	Y
Olgu 28*	+	-	Ö
Olgu 29*	+	-	Ö
Olgu 30	-	-	Ö
Olgu 31*	+	+	Ö
Olgu 32	+	+	Ö
Olgu 34*	+	+	Ö
Olgu 35	+	-	Y
Olgu 36	+	+	Ö
Olgu 37	+	-	B
Olgu 38	+	-	Ö
Olgu 39*	+	+	Ö
Olgu 42	+	+	Ö
Olgu 44	+	-	B
Olgu 45	+	-	Y
Olgu 46	-	-	Ö
Olgu 47	+	+	Y

*: Aşılansmış olduğu beyan edilen olgular. Y: Yaşıyor
 Ö: Enfeksiyona bağlı ölüm B: Bilinmiyor

Tartışma

Çalışmada, faklı klinik örneklerde CDV nükleik asiti varlığı yönünden yapılan değerlendirmeler sonucunda, 45 olguya ait nazal sürüntü örneğinden 37 adedinde (%82,2), 42 adet konjunktival sürüntü örneğinden 26 adedinde (%61,9) ve 37 adet lökosit örneğinden 13 adedinde (%35,1) viral nükleik asit varlığı tespit edilmiştir. Karşılaştırma sonunda en yüksek pozitiflik oranının nazal sürüntü örneklerinde bulunduğu belirlenmiştir. Nazal sürüntü örneklerinde saptanan yüksek pozitiflik oranları ile olguların genelinde teşhis edilen solunum sistemi enfeksiyon bulgularının birbiri ile paralel oldukları görülmüştür.

Kim ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, deneysel olarak CDV ile enfekte köpeklerde, hastalığın erken tanısında RT-PZR yöntemi ile nazal ve konjunktival sürüntü, lökosit ve idrar örneklerinde viral nükleik asit varlığını değerlendirmişler ve konjunktival sürüntü örneklerinde viral nükleik asitin enfeksiyondan sonraki 1-14. günler, nazal sürüntü örneklerinde de bu sürenin 3-14. günler arasında değişen oranlarda tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. Lan ve ark. (2005) yine deneysel olarak enfekte köpeklere ait nazal sürüntü örneklerinden RT-PZR yöntemi ile enfeksiyonu takiben 28. güne kadar viral nükleik asit varlığının tayin edilebileceğini ortaya koymuştur. Kim ve ark. (2006) virusun, diğer dokulara oranla, kandan daha hızlı elimine edilmesinden dolayı lökosit örneklerinde viral nükleik asit tayinin diğer klinik örneklere oranla daha zor ve riskli girişimleri gerektirdiği için de daha az pratik olduğunu vurgulamışlardır.

Humoral immün yanıt hastalıktan korumada ve iyileşme sürecinde oldukça etkilidir. (Ho ve Babiuk, 1979). Bu sebepten CDV' ye karşı gelişen antikor düzeyleri ve türünün tespiti, hayvanın immünite durumunun ve/veya aşı etkinliğinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir (Mochizuki ve ark., 2002). Çalışmada elde edilen ELISA sonuçlarına ait değerlendirmede, akut enfeksiyon varlığını gösteren IgM antikor, olguların %64' ün de tespit edilmiştir. IgG varlığının ise %41 lik bir oranda kaldığı belirlenmiştir. IgM ELISA sonuçlarına dayanılarak, olguların genelinde enfeksiyonun erken döneminde bulunduğu anlaşılmaktadır. IgM varlığı saptanan 30 olgudan, 17 sinin akut enfeksiyon dönemini atlatacakları ve enfeksiyon sonucunda öldüğu belirlenmiştir. Sekiz olguda ise her iki antikorun da varlığı-

na rastlanamamış ve bu olguların 7 sinin CD sonucunda öldüğü saptanmıştır. Aşılanmış olduğu bildirilen 21 olgudan 8 olguda ise IgG varlığı tespit edilememiştir. Bu olgulardan elde edilen sonuçlar, aşılama ile yeterli bir bağışık yanıtı ulaşılamadığını göstermektedir.

von Messling ve ark., (1999) yaptıkları çalışmada, IgM pozitif ancak IgG negatif olgulara ait lökosit örneklerinde saptanan viral nükleik asitinin sözkonusu hayvanların viremi döneminde olduğunun bir göstergesi olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, 6 olguya (olgu 2,3,4,7,28 ve 44) ait sonuçların von Messling ve ark., (1999) sonuçları ile paralel olduğu ve bu olguların kısa süren viremi dönemlerinde örneklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçların hastalığın erken teşhisi açısından da önem taşıdığı bilinmektedir (Lan ve ark., 2005; Amude ve ark., 2006).

Günümüzde CD'nin tek uygulanabilir ve etkili kontrol yöntemi aşı ile immünizasyondur. Hastalık, 1950' lerde kullanılan inaktif aşılardan ve takip eden 10 yıllık süreç içerisinde geliştirilen ve günümüzde de kullanılmaya devam edilen modifiye canlı aşılardan kontrol altında tutulmaya çalışılmaktadır (Chappuis, 1995). Çalışma dâhilinde aşılanmış hayvanlarda da enfeksiyonunun geliştiği belirlenmiştir. Bu sebepten dolayı, CD' ye karşı aşılanmış hayvanlarda da enfeksiyon gelişebileceği için, aşılanmış hayvanların koruyucu bağışık düzeyi ifade edip etmediğinin sorgulanmalıdır. Ayrıca, aşı uygulamasında aşılama takvimine uyulması ve aşılama takvimi oluşturulurken maternal antikorların varlığının dikkate alınması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. **Abraham, G., Banerjee, A.K.** (1976). Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 1504-1508.
2. **Amude, A.,M., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F.** (2006). Antemortem diagnosis of CDV infections by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Vet. Resch. Comm.*, 30: 679-687.
3. **Appel, M.J.G., Summers B.A.** (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.*, 44: 187-191.
4. **Appel, M.J.G., Summers, B.A.** (1999). Canine distemper: Current Status. *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Erişim:[<http://www.ivis.com>.]
5. **Chappuis, G.** (1995). Control of canine distemper. *Vet. Microbiol.*, 44: 351-358.
6. **Cho, H.S., Park, N.Y.** (2005). Detection of Canine Distemper Virus in Blood Samples by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Vet. Med. B*, 52, 410-413.
7. **Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987). Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann. Biochem.* 162: 156-159.
8. **Haas, L., Martens, W., Greiser-Wilke, I., Mamaev, L., Butina, T., Maack, D., Barrett, T.** (1997). Analysis of hemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.*, 48: 165-171.
9. **HO, C., Babiuk, L.** (1979). Immune mechanisms against canine distemper. II role of antibody in antigen modulation and prevention of intercellular and extracellular spread of canine distemper virus. *Immunology*, 38: 765-771.
10. **Kim, D., Jeoung, Y., Ahn, J., Lee, H., Pak, S., Kwon, H.** (2006). Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 68 (8): 877-879.
11. **Lan, N.T., Yamaguchi, R., Furuya, Y., Inomata, A., Ngamkala, S., Naganobu, K., Kai, K., Mochizuki, M., Uchida, K., Tateyama, S.** (2005c). Pathogenesis and phylogenetic analysis of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet. Microbiol.*, 110:197-207.
12. **Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., Ishiguro, S.** (1999). Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin gene of recent isolates from dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2936-29423.
13. **Mochizuki, M., Motoyoshi, M., Maeda, K., Kai, K.** (2002). Complement mediated neutralization of canine distemper virus in vitro: Cross-reaction between vaccine Onderstepoort and field KDK-1 strains with different hemagglutinin gene characteristics. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9: 921-924.
14. **Özkul, A., Sancak, A., Güngör, E., Burgu, İ.** (2004). Determination and phylogenetic analysis of canine distemper virus in dogs with nervous symptoms in Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52 (1): 125-132.
15. **Sidhu, M., Husar, V., Cook, S.D., Dowling, P.C., Udem, S.A.** (1993). Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: Completion of the entire CDV genome sequence. *Virology*, 193: 66-72.
16. **von Messling, V., Harder, T., Moennig, V., Rautenberg, P., Nolte, I., Haas, L.** (1999). Rapid and sensitive detection of IgM and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein based ELISA. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1049-1056.

17. **von Messling, V., Zimmer, G., Herler, G., Haas, I., Cattaneo, R.** (2001). The Hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity . *J. Virol.* 75: 6418-6427.
18. **Whelan, S.P.J., Barr, N.J., Wertz, W.G.** (2004). Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Biology of Negative- Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics.* Springer-Verlag (Newyork). Kawaoka, Y. s: 63-111.