AF 149

پژوهش و سازندگی
در
امور دام و آبزیان شماره ۸۰ پاییز ۱۳۸۷

استفاده از آزمون الیزای رقابتی در تشخیص سرولوژیکی بیماری بلوتانگ در گوسفند و بز استان اصفهان

• **وحید نعمان**
عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان اصفهان
• **روحانی کارگر موخر**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن وسرمسازی رازی
• **امیر حسین شاهمرادی**
عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان اصفهان
• **محمد رضا حیدری**
عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان اصفهان
• **جواد طباطبایی**
کارشناس اداره کل دامپزشکی استان اصفهان
• **عبد الرضا نبی نژاد**
عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان اصفهان
تاریخ دریافت: مهر ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۶
Email: vnoaman@yahoo.com

چکیده

بلوتانگ بیماری عفونی و غیر مسری نشخوارکنندگان است که بوسیله حشرات قابل انتقال می باشد. این بیماری در لیست A بیماریهای OIE طبقه بندی میشود و تهدیدی است برای تجارت جهانی و انتقال دام و فراورده های دامی در این مطالعه جهت تشخیص آنتی بادی ویروس بلوتانگ در گوسفند وبز استان اصفهان تحقیقی در سال ۸۵-۱۳۸۴در چهار فصل و ۳ منطقه اکولوژیکی انجام گرفت.نمونه های خون بطور تصادفی از ۷ شهرستان،۱۰۹ گله و ۸۷۴ گوسفند و بز اخذ شد.برای بررسی آنتی بادی اختصاصی بلوتانگ نمونه های سرمی با آزمون الیزای رقابتی مورد بررسی قرار گرفتند. از ۷۸۴ نمونه سرمی اخذ شده ۴۵۱ نمونه (۵۱/۶٪) مثبت ارزیابی شد همچنین از ۱۰۹ گله نمونه گیری شده ۹۱ (۸۳/۵٪) گله از نظر سرمی مثبت ارزیابی شدند که میزان شیوع بیماری در گله ها از ۳۶/۲٪ تا ۱۰۰٪ متغیر بود. از ۵۰۴ نمونه سرم گوسفند و ۳۷۰ نمونه سرم بز مورد آزمایش به ترتیب ۵۳/۳۷٪ و ۴۹/۱۹٪ مثبت ارزیابی شدند. بیشترین میزان موارد مثبت در فصل بهار مشاهده شد. میزان شیوع در شهرهای مورد بررسی بسیار متغیر بود.در بین مناطق مختلف اکولوژیک اختلاف معنی داری و جود نداشت همچنین اختلاف معنی داری بین گونه (گوسفند وبز) جنس نر و ماده و سنین مختلف مشاهده نشد.بلوتانگ قبلاً در قسمت مرکزی ایران گزارش نشده بود و این مطالعه اولین بررسی سرولوژیکی در این ناحیه می باشد.نتایج موید آن است که ویروس بلوتانگ در مرکز ایران گسترش یافته است و به نظر میرسد بیماری در این منطقه آندمیک باشد که انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: بلوتانگ، تشخیص سرمی، الیزای رقابتی، گوسفند، بز، استان اصفهان، ایران

Pajouhesh & Sazandegi No 80 pp: 39-48

Use of competitive ELISA for serological detection of blue-tongue virus antibody in sheep and goats of Isfahan province, Iran.

By: Noaman V., Member of Scientific Board of Agriculture and Natural Resources Research Center of Isfahan. Kargar-Moakhar, R., Member of Scientific Board of Razi Research Institute. Shahmoradi, A.H., Member of Scientific Board of Agriculture and Natural Resources Research Center of Isfahan.Heidari, M, R., Member of Scientific Board of Agriculture and Natural Resources Research Center of Isfahan.Tabatabaei, J., Expert of Isfahan Veterinary Office. Nabinejad A.R. Member of Scientific Board of Agriculture and Natural Resources Research Center of Isfahan.

In this study a serological survey was carried out to detect group specific blue-tongue virus antibodies in sheep and goats serum collected in three ecological regions of Isfahan province of Iran during four seasons of 2005.Blood samples were taken from 7 cities and 109 flocks and 874 sheep and goats randomly. A competitive enzyme linked immunosorbent assay(C-ELISA) was conducted to test the serum samples for blue tongue virus (BTV) group specific antibodies. BTV seropositive reaction were obtained in 451 (51.6%) out of 784 tested sera and in 83.5% (91/109) of the flocks.In the 91 seropositive flocks, the prevalence ranged from 36.2% to 100%.Out of 504 sheep serum samples and 370 goat serum samples examined ,53.37% and 49.19% respectively were positive. In spring seroprevalence was more than other seasons ($p<0.0001$).Prevalence of antibody were vary greatly from city to city. There was no difference in seroprevalence among the different ecological regions and different ages. Also there was no difference in seroprevalence between different species and different sexes. Blue–tongue has been never before reported in central area of Iran (Isfahan) and this is the first serological survey for blue-tongue in this region, the results support the conclusion that BTV was widespread in central area of Iran and suggest that it may be endemic and need for further investigation.

Keywords: Blue-tongue, Serological detection, C-ELISA, Sheep, Goats, Isfahan province, Iran

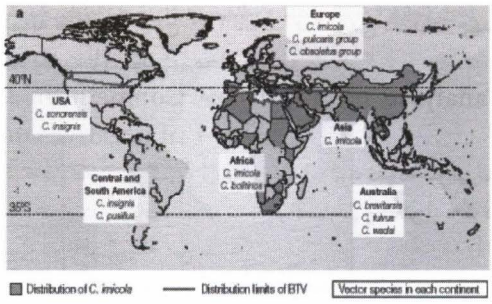
مقدمه

ویروس بلوتانگ گونه ای از جنس Orbivirus و در خانواده Reoviridae قرار گرفته است که شامل گروه بزرگی از ویروس های double-stranded RNA با ۱۰ تا ۱۲ قطعه ژنومی می باشند. (۳۶،۴،۲،۱) این ویروس عفونت غیرمسری را در نشخوارکنندگان ایجاد می کند(۳۱) و دارای ۲۵ سروتیپ می باشد. ویروس در همه نشخوارکنندگان قابل تکثیر است ولی بیماری شدید اغلب در نژادهای گوسفند با پشم نازک و نژادهای گوشتی که نژادهای غالب اروپا می باشند و برخی از گونه های گوزن محدود می شود(۶۱). انتقال بیماری خصوصاً در مناطق آندمیک به صورت خاموش در میزبان های مقاوم به بیماری اتفاق می افتد. گاوها در اغلب نواحی بعنوان مخزن بیماری عمل می کنند و گاهی بیماری در آنها به صورت تحت بالینی است و گاهی حضور ویروس در خون آنها تا ۱۰۰ روز به طول می انجامد(۲۳). با این حال از زمانی که بیماری در سال ۱۹۹۸ به اروپا رسید بیماری بلوتانگ باعث مرگ بیش از یک میلیون گوسفند شده است(۵۷،۳۲،۱۲). علاوه بر ابتلا و مرگ ومیر بلوتانگ باعث اختلال در تجارت دام و تولیدات دامی شده است و تخمین زده می شود که سالانه تنها در آمریکا ۱۲۵ میلیون دلار خسارت ایجاد نماید (۱۷).

ویروس بلوتانگ بین میزبان های نشخوارکننده اغلب از طریق نیش گونه های پشه کولیکوئیدس (راسته دو بالان، خانواده سراتو پوگونیده) انتقال می یابد. مهمترین ناقل ویروس در دنیا پشه *Culicoides imicola* است(۵۷) اگرچه گونه های دیگر مانند *C.pulicaris* در اروپا و *C.scoticus*، *C.obsoletus* در حوضه مدیترانه نیز در انتقال بیماری نقش دارند (۵۱،۱۳). تکثیر و انتشار ویروس در پشه کولیکوئیدس به توارث و فاکتورهای محیطی ارتباط دارد(۳۴،۳۳). اگر چه در خصوص انتقال بیماری بر روی گونه های کار کمی شده است ولی تاکنون کمتر از ۱٪ از ۱۴۰۰ گونه کولیکوئیدس را در انتقال ویروس بلوتانگ دخیل می دانند. بیماری در مناطقی بروز می کند که تعداد کافی ناقل وجود داشته باشد. این مناطق نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری بین عرض های ۳۵ درجه جنوبی و ۴۰ درجه شمالی را در بر می گیرد. (تصویر شماره ۱) (۴۵).

انتقال در این نواحی فصلی است و اغلب بیماری بین انتهای تابستان و انتهای پاییز در زمانی که ناقلین به وفور یافت می شوند دیده می شود. پشه های کولیکوئیدس قدرت پرواز بالایی ندارند ولی می توانند به راحتی توسط باد تا صدها کیلومتر در یک شب انتقال یابند (خصوصاً روی دریا)(۵۲).

با توجه به پتانسیل بالای عامل بیماری برای گسترش سریع و وسیع (۳۳) و عواقب جدی بیماری برای تجارت جهانی دام و محصولات دامی، بلوتانگ در لیست A بیماری های OIE (Office International Epizootic) (و سازمان جهانی سلامت حیوانات طبقه بندی می شود. عوامل بیماریزایی که از طریق ناقل منتقل می شوند به شرایط آب و هوایی حساس می باشند (۵۰). و در حقیقت تغییرات شرایط آب و هوایی می توانند منجر به گسترش و دوام عامل بیماری شده و وقوع و تراکم انتقال عامل بیماری را افزایش خواهند داد (۶۳،۴۲،۳۰،۲۵،۱۶). علاوه بر این مشخص شده است که شرایط زنده و غیر زنده دیگری نیز می توانند در انتشار بیماری نقش داشته باشند(۴۹،۴۷،۲۷، ۲۶).



تصویر شماره ۱- محدوده جغرافیایی انتشار ناقلین و ویروس بلوتانگ(اقتباس از منبع شماره ۴۵)

پرورش گوسفند در ایران از دیر باز رواج داشته است و بالتبع اکثر بیماری های گوسفند و بز در ایران به صورت بومی درآمده است و ظهور بیماری های گوسفند و بز با تراکم بالای دامی در این منطقه غیر منتظره نمی باشد. سقط، زایمان های زودرس، اختلالات تولیدمثلی و نواقص جنینی از مشکلات پرورش گوسفند وبز در اکثر نقاط دنیا و بخصوص در ایران است. عوامل میکروبی (ویروس، باکتری و قارچ) و عوامل محیطی زیادی باعث ظهور این عوارض در گوسفند و بز می شوند که در تشخیص های بالینی اکثراً عوامل میکروبی به خصوص بروسلوز را در بروز این عوارض دخیل می دانند. کشور ایران در خاور میانه در موقعیتی قرار گرفته است که شاهراه ارتباطی کشور های شرقی ایران به اروپا است به طوری که از دیر باز کالا و دام از کشور های هند، چین، افغانستان و پاکستان از طریق ایران به ترکیه وارد یا منتقل می شده است. در حال حاضر ایران و ترکیه جزو کریدور انتقال دام از کشورهای افغانستان، پاکستان و هند به اروپا می باشند. بنابراین محققین اروپایی ظهور بسیاری از بیماری ها در اروپا را ناشی از این انتقال دام به اروپا می دانند. سالانه هزاران راس دام به علت خشکسالی از کشورهای شرقی (افغانستان و پاکستان) و غربی (عراق) به ایران وارد می شود و در نتیجه امکان ظهور بسیاری از بیماری ها بخصوص بیماری های ویروسی در کشور وجود دارد. در ایران افشار در سال ۱۹۷۴وجود واکنش رسوبی مثبت را در برابر ویروس بلوتانگ گزارش نمود(۹) و محمدی وقابوسی بیماری را در ماکو مشاهده و بوسیله تزریق قابل انتقال بودن آن را اثبات و ماهیت آن را به عنوان بیماری زبان آبی بوسیله آزمایش های سرمی مشخص کردند(۳).

در کشورهای همسایه نیز گزارشات متعددی از شیوع بیماری و جداسازی ویروس وجود دارد.

Hafez و همکاران در سال ۱۹۷۸ در عراق، Yonguc و همکاران در سال ۱۹۸۲ در ترکیه، Hafez در سال ۱۹۸۵ در عربستان Taylor در سال ۱۹۸۷ در سوریه و اردن، Taylor و همکاران در سال ۱۹۹۱ در عمان، Taylor و همکاران در سال ۱۹۹۴ در مرکز و غرب ترکیه، Akhtar و همکاران در سال ۱۹۹۷ در پاکستان، Abu-Elzein و همکاران در سال ۱۹۹۸ در عربستان صعودی،Lundervold و همکاران در سال ۲۰۰۳ و۲۰۰۴در قزاقستان و Housawi در سال ۲۰۰۴ در عربستان صعودی شیوع بیماری، سروتیپ های مختلف ویروس و ظهور کلینیکی بیماری را در کشورهای اطراف ایران گزارش نموده‌اند(۵،۱۰،۲۰،۲۱،۲۲،۵۸،۵۹،۶۰،۶۷).

در آسیا نیز بررسی های متعددی در خصوص شیوع بیماری و تشخیص سروتیپ های ویروس انجام گرفته است. Mullick در سال ۱۹۸۸ در هند Kirkland و همکاران در سال ۲۰۰۲ در چین، Pitchard و همکاران درسال ۲۰۰۴ در آسیا، Purse و همکاران در سال ۲۰۰۴ در فلسطین اشغالی و Ravishankar در سال ۲۰۰۵ در هند بیماری را گزارش نموده‌اند(۴۴،۳۸،۲۴،۴۸،۴۶).

در کشورهای دیگر دنیا نیز در این خصوص بررسی های گسترده ای انجام گرفته است. Eisa و همکاران در سال ۱۹۷۹ در سودان، Gibbs و همکاران در سال ۱۹۸۳ در آمریکای جنوبی، Coackley و همکاران در سال ۱۹۸۰ در استرالیا و osmani در سال ۲۰۰۶ در کوزوو نیز بیماری را گزارش نموده اند (۱۵،۱۸،۱۹،۴۰).

در این طرح از آزمایش C-ELISA (الایزای رقابتی)جهت انجام آزمایشات استفاده شده است. قبلاً از تست های آگار ژل ایمنودیفیوژن والایزای غیرمستقیم برای تشخیص بلوتانگ استفاده می شد. این تست ها قادر به تمایز پادتن های ویروس های بلوتانگ وEHD (بیماری خونریزی دهنده اپی زوتیک) نبودند. الایزای رقابتی این مشکل را حل کرد ودر حال حاضر آزمایش الایزای رقابتی از طرف OIE برای بررسی پادتن های ضد ویروس بلوتانگ در نشخوارکنندگان کوچک توصیه می شود (۳۹). تست پیشنهادی می تواند پادتن های اختصاصی ویروس بلوتانگ را در گوسفند و بز و گاو مشخص نماید و تست بر پایه رقابت بین سرم تست شده و پادتن های منوکلونال که به پر اکسیداز متصل شده اند می باشد. این پادتن منوکلونال با انتهای آمینی پروتئین VP7 (پروتئین قسمت مرکزی ویروس بلوتانگ) که اختصاصی ویروس بلوتانگ است متصل می شود. این روش بسیار راحت سریع و قابل اعتماد است و مناسب برای آنالیز تعداد زیادی نمونه می باشد.

با توجه به اینکه ایران نیز یکی از کشورهایی است که در محدوده عرض ۴۰ درجه شمالی و ۳۵ درجه جنوبی قرار گرفته است و محل عمده ای برای انتقال دام از کشورهای افغانستان و پاکستان به ترکیه و اروپا محسوب می شود و مانند دیگر مناطق آسیا پشه C.imicola در ایران نیز گسترش دارد (۴۵) و در کشورهای همسایه نیز سروتیپ های مختلف ویروس شناخته شده است (۵،۱۰،۲۰،۲۱،۲۲،۲۸،۲۹، ۵۸،۵۹،۶۰،۶۷) لذا حضور ویروس و گسترش آن در ایران نیز دور از ذهن نمی باشد. همه ساله از سوی دامداران مراجعات متعددی به دلیل مشکلات تولیدمثلی، سقط مومی شدن جنین، به دنیا آوردن جنین مرده، ناهنجاری های مادرزادی نارسائی های فعالیتی در نوزادان زنده و تلفات در گله های گوسفند و بز به شبکه های دامپزشکی استان انجام می‌شود. اگرچه ممکن است بسیاری از بیماری های باکتریایی، انگلی و ویروسی باعث این عوارض در گوسفند وبز شوند ولی تاکنون مطالعات علمی دقیق و برنامه ریزی شده ای جهت شناخت این عوامل و پیشگیری و درمان انجام نشده است از این رو در این مطالعه برای اولین بار حضور و میزان شیوع بیماری در گله های گوسفند و بز ساکن استان اصفهان مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت تایید وجود بیماری اقدامات لازم در جهت پیشگیری و کنترل بیماری انجام شود.

مواد و روش کار

اگر آلودگی گله ها ی ثابت استان ۵۰ درصد منظورگردد با سطح اطمینان ۹۵ درصد ودقت ۰/۰۵ نمونه مورد نیاز برای تعیین میزان آلودگی

۳۸۵ نمونه خواهد بود.که چون روش نمونه گیری سیستماتیک غیر ممکن است لذا نمونه لازم به ۸۰۰ نمونه افزایش یافت. نمونه گیری در کل استان انجام گرفت ودر هر منطقه جغرافیایی کویری، جلگه ای و کوهستانی به نسبت تعداد دام های موجود در هر منطقه نمونه ها تقسیم شده و در هر شهرستان گله ها بطور تصادفی انتخاب و تعداد نمونه لازم از هر گله بطور تصادفی اخذ شد. نمونه گیری در چهارفصل انجام گرفت.

از هر دام میزان ۱۰ سی سی خون از سیاهرگ وداج اخذ شد وپس از جدا کردن سرم، سرمها تا انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.سپس سرم ها جهت انجام آزمایش الیزای رقابتی به آزمایشگاه بخش بیماری های ویروسی دام در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ارسال شد.

جهت انجام آزمایش الیزای رقابتی از کیت تجاری Institut-Pourquier ساخت کشور فرانسه استفاده شد. این کیت دارای کنترل مثبت و منفی بوده و نمونه ها با طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت می شدند. جهت تفسیر نتایج درصد رقابت با فرمول زیر محاسبه می شد.

۴۵۰ of analysed serum/OD ۴۵۰ Competition :OD
۱۰۰ of negative control x

اگر درصد رقابت بزرگتر و مساوی ۶۰٪ بود نمونه سرمی منفی، اگر بین ۵۰ تا ۶۰٪ بود نمونه مشکوک واگر مساوی وکمتر از ۵۰ درصد بود نمونه مثبت در نظر گرفته می شد.

علاوه بر خون گیری کلیه مشخصات دام ها اخذ، و نتایج آزمایش های سرمی و اطلاعات بدست آمده با نرم افزار آماری SAS و آزمون های کای و آنالیز واریانس مقایسه شد.

نتایج

نتایج در ۶ جدول زیر خلاصه شده است:

جدول شماره ۱: فراوانی نسبی و مطلق نمونه های سرمی ارزیابی شده از نظر بیماری بلوتانگ برحسب فصل سال در گوسفندان وبزان ثابت استان اصفهان در سال های ۸۴-۱۳۸۳

نمونه / فصل سال	نمونه های مثبت		نمونه های منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
زمستان	۱۲۴	۵۹/۹۰	۸۳	۴۰/۱۰	۲۰۷	۲۳/۶۸
بهار	۱۳۱	۶۰/۶۵	۸۵	۳۹/۳۵	۲۱۶	۲۴/۷۱
تابستان	۱۱۴	۵۷	۸۶	۴۳	۲۰۰	۲۲/۸۸
پاییز	۸۲	۳۲/۶۷	۱۶۹	۶۷/۳۳	۲۵۱	۲۸/۷۳
جمع	۴۵۱	۵۱/۶۰	۴۲۳	۴۸/۴۰	۸۷۴	۱۰۰

جدول شماره ۲: فراوانی نسبی و مطلق نمونه های سرمی ارزیابی شده از نظر بیماری بلوتانگ برحسب شهر در گوسفندان وبزان ثابت استان اصفهان در سال های ۸۴-۱۳۸۳

نمونه / فصل سال	نمونه های مثبت		نمونه های منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
برخوار و میمه	۵۵	۴۰/۴۴	۸۱	۵۹/۵۶	۱۳۶	۱۵/۵۶
اصفهان	۶۸	۳۴/۶۹	۱۲۸	۶۵/۳۱	۱۹۶	۲۲/۴۳
فریدن	۳۸	۸۴/۴۴	۷	۱۵/۵۶	۴۵	۵/۱۵
فلاورجان	۱۱۱	۵۱/۷۳	۴۰	۲۶/۴۹	۱۵۱	۱۷/۲۸
نطنز	۴۶	۵۹/۷۴	۳۱	۴۰/۲۶	۷۷	۸/۸۱
شهرضا	۸۵	۹۵/۵۱	۴	۴/۴۹	۸۹	۱۰/۱۸
سمیرم	۴۸	۲۶/۶۷	۱۳۲	۷۳/۳۳	۱۸۰	۲۰/۵۹
جمع	۴۵۱	۵۱/۶۰	۴۲۳	۴۸/۴۰	۸۷۴	۱۰۰

جدول شماره ۳ :فراوانی نسبی و مطلق نمونه های سرمی ارزیابی شده از نظر بیماری بلوتانگ برحسب منطقه در گوسفندان وبزان ثابت استان اصفهان در سال های ۸۴-۱۳۸۳

نمونه / فصل سال	نمونه های مثبت		نمونه های منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
کوهستانی	۱۷۱	۵۴/۴۶	۱۴۳	۴۵/۵۴	۳۱۴	۳۵/۹۳
جلگه ای	۱۷۹	۵۱/۵۹	۱۶۸	۴۸/۴۱	۳۴۷	۳۹/۷۰
نیمه بیابانی	۱۰۱	۴۷/۴۲	۱۱۲	۵۲/۵۸	۲۱۳	۲۴/۳۷
جمع	۴۵۱	۵۱/۶۰	۴۲۳	۴۸/۴۰	۸۷۴	۱۰۰

جدول شماره ۴ :فراوانی نسبی و مطلق نمونه های سرمی ارزیابی شده از نظر بیماری بلوتانگ برحسب گونه دام در گوسفندان وبزان ثابت استان اصفهان در سال های ۸۴-۱۳۸۳

نمونه / فصل سال	نمونه های مثبت		نمونه های منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
گوسفند	۲۶۹	۵۳/۳۷	۲۳۵	۴۶/۶۳	۵۰۴	۵۷/۶۷
بز	۱۸۲	۴۹/۱۹	۱۸۸	۵۰/۸۱	۳۷۰	۴۲/۳۳
جمع	۴۵۱	۵۱/۶۰	۴۲۳	۴۸/۴۰	۸۷۴	۱۰۰

جدول شماره ۵ :فراوانی نسبی و مطلق نمونه های سرمی ارزیابی شده از نظر بیماری بلوتانگ برحسب سن در گوسفندان وبزان ثابت استان اصفهان در سال های ۸۴-۱۳۸۳

نمونه / فصل سال	نمونه های مثبت		نمونه های منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
زیر یک سال	۱۲۳	۵۳/۹۵	۱۰۵	۴۶/۰۵	۲۲۸	۲۶/۰۹
۱ تا ۳ سال	۱۷۳	۵۳/۲۳	۱۵۲	۴۶/۷۷	۳۲۵	۳۷/۱۹
بالای ۳ سال	۱۵۵	۴۸/۲۹	۱۶۶	۵۱/۷۱	۳۲۱	۳۶/۷۳
جمع	۴۵۱	۵۱/۶۰	۴۲۳	۴۸/۴۰	۸۷۴	۱۰۰

جدول شماره ۶ :فراوانی نسبی و مطلق نمونه های سرمی ارزیابی شده از نظر بیماری بلوتانگ برحسب جنس دام در گوسفندان وبزان ثابت استان اصفهان در سال های ۸۴-۱۳۸۳

نمونه / فصل سال	نمونه های مثبت		نمونه های منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
ماده	۲۹۶	۵۰/۷۷	۲۸۷	۴۹/۲۳	۵۸۳	۶۶/۷۰
نر	۱۵۵	۵۳/۲۶	۱۳۶	۴۶/۷۴	۲۹۱	۳۳/۳۰
جمع	۴۵۱	۵۱/۶۰	۴۲۳	۴۸/۴۰	۸۷۴	۱۰۰

بحث

در خصوص برتری تست الایزای رقابتی و مقایسه آن با دیگر تست ها تحقیقات مختلفی صورت گرفته است.

Afshar و همکاران در سال ۱۹۸۹ در مقایسه بین AGID (آگار ژل ایمیونودیفیوژن) و C-ELISA نشان دادند که در واکنش AGID امکان واکنش متقابل آنتی بادی با پادتن های دیگر آربوویروس ها مثل ویروس بیماری هموراژیک انزوتیک وجود دارد ولی این حالت در C-ELISA اتفاق نمی افتد(۸). Afshar و همکاران در سال ۱۹۹۳ در ارزیابی کیت تجاری الیزای رقابتی جهت تشخیص سروتیپ های ویروس بلوتانگ به این نتیجه رسیدند که در مجموع تست الیزای رقابتی آزمایش مناسبی جهت ارزیابی گروهی پادتن های ضد ویروس بلوتانگ است. (۷)

Afshar در سال ۱۹۹۴ عنوان کرد که در میان تست های آزمایشگاهی AGID و C-ELISA تست هایی هستند که بطور گسترده استفاده می شود. اگرچه AGID سریع و ساده است ولی حساسیت زیادی یا کیفیت بالایی ندارد و محدودیت هایی در اختصاصی بودنش وجود دارد و در حال حاضر C-ELISA بطور گسترده جایگزین AGID شده و تبدیل به یک تست جهانی برای تایید بلوتانگ در تجارت جهانی نشخوارکنندگان شده است (۶). Potton و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که در مقایسه سه تست AGID و C-ELISA و S.N (خنثی سازی سرم) آزمایش C-ELISA مفید ترین تست برای تشخیص پادتن بلوتانگ است زیرا سریع است و صحت خوبی دارد(۴۱). Smriti و همکاران در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسیدند که C-ELISA حساس تر و قابل اعتماد تر از AGID است و می تواند به عنوان تست روتین و قابل اعتمادی جهت آزمایش بیماری بلوتانگ در نشخوارکنندگان کوچک قرار گیرد(۵۴). Donkersgoed و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی شیوع پادتن ویروس بلوتانگ دریافتند که کلیه نمونه هایی که با C-ELISA مثبت بودند با آزمایش خنثی سازی ویروس نیز مثبت شدند و این بیان کننده این است که ویژگی C-ELISA زیاد است و نزدیک به ۱۰۰٪ می رسد ولی تست AGID دارای واکنش متقاطع با ویروس بیماری خونریزی دهنده انزووتیک است و در مقایسه با C-ELISA ویژگی AGID پایین تر است (۵۵). Singer و همکاران در سال ۱۹۹۸ در ارزیابی ۵ تست تشخیصی ویروس بلوتانگ در گوسفند دریافتند که تست های AGID و C-ELISA در مقایسه با PCR، SN و جداسازی ویروس دارای حساسیت و ویژگی بالایی می باشند (۵۳).

در تحقیق انجام شده از ۸۷۴ نمونه سرمی اخذ شده از گوسفند و بز ساکن استان اصفهان ۵۱/۶٪ با آزمایش C-ELISA مثبت ارزیابی شدند و از تعداد ۱۰۹ گله بررسی شده تعداد ۹۱ گله (۸۳/۵٪) از نظر سرمی مثبت بودند و میزان آلودگی از ۳۶/۲٪ تا ۱۰۰٪ متغیر بود.

بر اساس نتایج بدست آمده از ۲۰۷ نمونه اخذ شده در فصل زمستان ۱۲۴ نمونه (۵۹/۹۰٪) مثبت، از ۲۱۶ نمونه اخذ شده در فصل بهار ۱۳۱ نمونه (۶۰/۶۵٪) مثبت، از ۲۰۰ نمونه اخذ شده در فصل تابستان ۱۱۴ نمونه(۵۷٪) مثبت و از ۲۵۱ نمونه اخذ شده در فصل پاییز ۸۲ نمونه (۳۲/۶۷٪) مثبت بود و در مقایسه بین فصول بیشترین آلودگی مربوط به فصل بهار و کمترین مربوط به فصل پاییز بود($p<0/0001$).

در بیشتر منابع ظهور بیماری را از اواخر تابستان تا اواخر پاییز همزمان با افزایش تعداد پشه های کولیکوئیدس می دانند. ولی بسته به شرایط محیطی در مناطق مختلف، به علت تغییرات دما و رطوبت اختلاف وجود دارد.در بررسی حاضر در فصول زمستان و بهار بیشترین میزان موارد مثبت سرمی تشخیص داده شد. اگرچه در زمستان سرد و خشک استان اصفهان تعداد ناقلین ویروس به حد اقل می رسند ولی با توجه به نحوه تکثیر ناقلین، زمستان گذرانی لاروها و زمستان گذرانی ویروس در حاملین، افزایش موارد مثبت سرمی در بهار توجیه پذیر است. برای انتقال ویروس بلوتانگ باید پشه بالغ کولیکوئیدس از میزبان آلوده تغذیه نماید و تعداد کافی ویروس را دریافت دارد.سپس ویروس باید چرخه خارج از بدن میزبان اصلی را در بدن پشه ۴ تا ۲۰ روز طی کند که این وقایع مهم و چرخه انتقال ویروس بلوتانگ تحت تاثیر دما و رطوبت است. فراوانی بالای ناقلین کولیکوئیدس تحت شرایط مناسب تابستان و پاییز باعث مواجهه بیشتر میزبان ها با پشه و بالارفتن میزان نیش خوردگی می شود.

در بررسی جزیی تر مشخص می شود که دما اغلب مراحل زندگی کولیکوئیدس را تسریع می کند.(۶۶،۳۳) زمستان های سرد و تابستان های گرم جمعیت ناقلین را کاهش می دهد حتی اگر در اغلب ماه های سال شرایط مساعد باشد.

افزایش جمعیت پشه های بالغ در بهار بسته به میزان زنده مانی بالغین و لاروها در فصل زمستان دارد داشتن حداقل ۸ ماه از سال با میانگین دمای ۱۲/۵ درجه سانتیگراد برای حضور *C.imicola* کافی است(۶۵). تجدید جمعیت بالغین در فصول تابستان و پاییز در دمای ۲۵ تا ۳۰ در جه سانتی گراد انجام می گیرد ولی در دمای ۸ تا ۱۰ درجه متوقف می شود.

دما بطور مستقیم توانایی ناقلین کولیکوئیدس را افزایش داده (۴۳،۳۵) و میزان تولید ویروس را در پشه بطور جزیی افزایش می دهد.(۳۷) تکثیر ویروس در زیر ۱۰ درجه متوقف می شود(۶۲). در دمای زیر ۱۰ درجه ویروس ممکن است در بدن ناقل تا ۳۵ روز زنده بماند و با گرم شدن هوا تکثیر یابد.

بلوتانگ بین میزبانهای نشخوارکننده توسط نیش ناقلین کولیکوئیدس منتقل می شود اما شرایط اقلیمی نامناسب که در طول زمستان اتفاق میافتد می تواند باعث از بین بردن ناقلین بالغ گردد. چرخه زندگی ویروس بلوتانگ نشان می دهد که تحت این شرایط ویروس نباید قادر به ادامه حیات باشد. ولی تحقیقات اپیدمیولوژیکی نشان می دهد که تحت شرایطی که تعداد ناقلین کم است یا وجود ندارد نیز زمستان گذرانی وجود دارد. Takamatsu و همکاران در سال ۲۰۰۳ با آزمایشات ابتدایی روی گوسفند مکانیسم جدیدی را برای زمستان گذرانی ویروس مشخص نمودند (۵۶).

برای اثبات این ادعا Takamatsu و همکاران نشان دادند که سلول های T گاما و دلتای گوسفند می توانند در آزمایشگاه و مزرعه عفونت دایمی ایجاد کنند و هنگامی که این سلول های T آلوده با فیبروبلاست گوسفند در آزمایشگاه ترکیب شدند باعث فعال شدن ویروس و تکثیر آن تا ۱۰۰۰ برابر می شود و در گوسفندی که ۳۵ روز بعد از وجود ویروس درخون با گزش دوباره پشه مواجه شده بود توانستند ۳۶ روز بعد از آلودگی ویروس را جدا کنند(۵۶).

در مقایسه بین ۳ منطقه اکولوژیک (کوهستانی، جلگه ای، نیمه بیابانی)، در منطقه کوهستانی از ۳۱۴ نمونه اخذ شده ۱۷۱ نمونه (۵۴/۴۶٪) مثبت، در منطقه جلگه ای از ۳۴۷ نمونه جمع آوری شده ۱۷۹ نمونه (۵۱/۵۹٪) مثبت و در منطقه نیمه بیابانی از ۲۱۳ نمونه جمع آوری شده ۱۰۱ نمونه (۴۷/۴۲٪) از نظر سرمی مثبت ارزیابی شدند. که اختلاف معنی داری بین مناطق اکولوژیک مختلف مشاهده نشد.

با توجه به اینکه مناطق جلگه ای در حاشیه رودخانه زاینده رود قرار گرفته اند و محیط مناسبی برای تکثیر ناقلین در کنار رودخانه و شالیزارهای برنج وجود دارد.همچنین در مناطق کوهستانی نیز با توجه به وجود رودخانه های فصلی و دایمی و دما و رطوبت مناسب، محیط مساعدی برای رشد و تکثیر ناقلین وجود دارد و از طرف دیگر کوچ گوسفندان عشایری به این مناطق، بنابر این بالا بودن موارد مثبت سرمی در این دو منطقه دور از ذهن نیست.

در مقایسه گوسفندان وبزان نمونه گیری شده در گوسفندان (۵۳/۳۷٪) نمونه های سرمی مثبت و در بز (۴۹/۱۹٪) نمونه های سرمی مثبت ارزیابی شد و بین گوسفند و بز اختلاف معنی داری از نظر درصد آلودگی مشاهده نگردید.

در مقایسه میزان آلودگی در سنین مختلف در گوسفندان و بزان زیر یکسال (۵۳/۹۵٪) نمونه ها از نظر سرمی مثبت، در سن ۱ تا ۳ سال (۵۳/۲۳٪) نمونه ها از نظر سرمی مثبت و در سن بالای ۳ سال (۴۸/۲۹٪) نمونه ها از نظر سرمی مثبت ارزیابی شد. و اختلاف معنی داری از نظر موارد مثبت در سنین مختلف مشاهده نمی شود.

در مقایسه میزان آلودگی در جنس نر و ماده، در گوسفندان وبزان ماده (۵۰/۷۷٪) نمونه ها از نظر سرمی مثبت و در جنس نر (۵۳/۲۶٪) نمونه ها از نظر سرمی مثبت ارزیابی شدند.که اختلاف معنی داری بین دو جنس نر و ماده مشاهده نمی شود.

اگر چه گوسفندان آسیایی نسبت به گوسفندان نژادهای اروپایی حساسیت کمتری نسبت به بیماری بلوتانگ دارند و معمولاً در تعداد کمی از این گوسفندان علایم دیده می شود ولی با توجه به حضور سروتیپ های مختلف ویروس در کشورهای همسایه نمی توان از حضور بیماری در کشور به راحتی چشم پوشی کرد. بعلاوه تغییرات ژنتیکی کوچکی در RNA آربوویروس ها ممکن است باعث تغییرات مشخصی در فنوتیپ ویروس شود (۶۴)

جهت پیشگیری از بیماری در ایران موارد زیر پیشنهاد می شود:

۱- جلوگیری از ورود دام های قاچاق

۲- کنترل پشه های ناقل

۳- دور نگهداشتن میزبان های حساس از ناقلین

۴- گاوها نقش مهمی به عنوان مخزن اولیه بیماری دارند و بعنوان منبع آلودگی ناقلین محسوب می شوند زیرا پشه های کولیکوئیدس تمایل بیشتری به نشخوارکنندگان بزرگ جهت خونخواری دارند بنابر این پرخطر ترین مناطق جهت ورود دام های حساس مناطقی است که گاو به تنهایی یا به همراه گوسفند پرورش می یابند.

۵- شناسایی ناقلین ویروس، فراوانی گونه های ناقل، شیوع فصلی ناقلین

۶- شناسایی سروتیپ ها و سویه های موجود ویروس در ایران

۷- کنترل ویروس بلوتانگ در نقاط مرزی کشور

۸- واکسیناسیون در نقاط مرزی

در برخی از مناطق مثل آفریقای جنوبی، آمریکا، اسراییل و ترکیه واکسیناسیون بر علیه بیماری بلوتانگ انجام می شود که عمدتاً از نظر سروتیپی اختصاصی می باشند واکسن های پلی والان در آفریقای جنوبی استفاده می شود بالطبع محافظت و مصونیت را بالا می برند. برخی از عوارض این واکسن های تخفیف حدت یافته عبارتند از:

۱- خطر Reassortment سویه واکسن و سویه فیلد که ممکن است سویه جدید ویروس با حدت بالا ایجاد کند.

۲- ویروس واکسن ممکن است از جفت بگذرد و باعث پایین آمدن بازده تولیدمثلی و نوزادان غیرطبیعی شود.

۳- ممکن است در فاز ویرمیک ویروس از منی دفع شود

۴- ممکن است در فاز ویرمیک واکسن، پشه های ناقل، این سویه ویروس واکسن را انتقال دهند.

۵- واکسن ممکن است شامل سروتیپ هایی باشد که مسبب شیوع بیماری های کلینیکی باشد.

ولی با این حال این مشکلات در عمل هنوز ثابت نشده است. Breard در سال ۲۰۰۴ در یک بررسی نشان داد که دو بار واکسیناسیون در زمستان و بهار علیه بلوتانگ ایمنی خوبی ایجاد کرده است و بطور کامل از رخداد بیماری پیشگیری می کند ولی یکبار تزریق واکسن تخفیف حدت یافته نتایج خوبی در بر نداشته است (۱۱). بهترین واکسن ها برای پیشگیری از بیماری واکسن های کشته هستند.ولی هنوز واکسن غیر فعال تجاری ساخته نشده است. زیرا میزان پادتن مورد نیاز جهت ایجاد پاسخ ایمنی در مقایسه با واکسن های تخفیف حدت یافته بسیار زیاد است و تزریق واکسن یاد آور مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارکنان بخش تشخیص بیماری های ویروسی دام موسسه رازی و کارکنان شبکه های دامپزشکی استان اصفهان که در انجام این طرح ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

۱- بلاد،دی.سی.،جی.آ.هندرسون و ا.ام.رادوستیتس.دامپزشکی.جلد چهارم. چاپ سوم. ترجمه احمد شیمی(۱۳۷۵) انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران.تهران. ۲۳۰-۲۱۹

۲- توماس بلاها .اپیدمیولوژی دامپزشکی چاپ اول.ترجمه عبدالحسین دلیمی اصل،غلامحسین معتمدی و غلامرضا موذنی جولا.(۱۳۷۸) انتشارات ایپژ.تهران. ۴۴-۴۰

۳- شیمی،ا. ۱۳۷۵ ویروس شناسی دامپزشکی. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران. تهران. ۵۰۹-۵۰۲

۴- ورنرپی، هوشل. تشخیص بیماری های ویروسی در دامپزشکی ویروس شناسی. ترجمه مسعود رضا صیفی آباد شاپوری. (۱۳۸۲). انتشارات دانشگاه شهید چمران.اهواز. ۲۱۱-۲۰۲

5-Abu Elzein,E.M., Aitchison,H., al-Afaleq,A.I., al-Bashir,A.M., Ibrahim.A.O., Housawi,F.M. 1998.A study on bluetongue virus infection in Saudi Arabia using sentinel ruminants. Onderstepoort J Vet Res. 65(4):243-51.

6-Afshar, A.1994. Bluetongue: laboratory diagnosis. Comp Immuno Microbiol Infect Dis. 17(3-4): 221-42.

7-Afshar,A., Trotter,H.C., Dulac,G.C., Reddington,J.J.1993. Evaluation of a commercial competitive ELISA test kit for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus. J. Vet. Diagn. Invest. 5(3): 336-40.

8-Afshar,A., Thomas,F.C., Wright,P.F., Shapiro,J.L., Anderson,J.

Health Prod.; 10(2):95-8.

22-Housawi,F.M., Abu Elzein,E.M., Ramadan,R.O., Gameel,A.A., Al-Afaleq, A.I., Al-Mousa, J. 2004. Abortions, stillbirths and deformities in sheep at the Al-Ahsa oasis in eastern Saudi Arabia: isolation of a bluetongue serogroup virus from the affected lambs. Rev. Sci. Tech. 23(3):913-20.

23-Hourrigan,J.L., Klingsporn,A.L. 1975. Bluetongue:the disease in cattle. Aust. Vet. J. 51, 170–174.

24-Kirkland,P.D., Zhang,N., Hawkes, R.A., Li Z, Zhang,F., Davis,R.J., Sanders,D.A., Li H, Zhang K., Ben,J,, He,G.F., Hornitzky,C.L., Hunt,N.T.2002.Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China. Epidemiol. Infect. 128(2):257-63.

25-Kovats, R. S., Campbell-Lendrum, D. H., McMichael, A. J., Woodward, A. & Cox, J. S. 2001.Early effects of climate change: do they include changes in vector–borne disease. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 56, 1057–1068.

26-Kuhn, K. G., Campbell-Lendrum, D. H., Armstrong, B.& Davies, C. R. 2003.Malaria in Britain: Past, present and future. Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 9997–10001.

27-Kuhn, K. G., Campbell-Lendrum, D. H. & Davies, C. R.2004. Tropical diseases in Europe? How we can learn from the past to predict the future. Epi.North. J. 1.

28-Lundervold.M, Milner-Gulland,E.J., O'Callaghan,C.J., Hamblin,C., Corteyn,A., Macmillan, A.P. 2004. A serological survey of ruminant livestock in Kazakhstan during post-Soviet transitions in farming and disease control. Acta Vet. Scand.;45(3-4):211-24.

29-Lundervold, M., Milner-Gulland,E.J., O'Callaghan,C.J., Hamblin,C. 2003. First evidence of bluetongue virus in Kazakhstan. Vet. Microbiol..92(3):281-7

30-Martens, P. & Moser, S. C.2001. Health impacts of climate change. Science 292, 1065–1066.

31-Mellor, P. S. & Boorman, J. 2004. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. Ann. Trop. Med. Parasitol. 89, 1–15.

32-Mellor, P. S. & Wittmann, E. J. 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean basin, 1998–2001. Vet. J. 164, 20–37.

33-Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M.2000. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. Annu. Rev. Entomol. 45, 307–340

34-Mellor, P. S. 2000.Replication of arboviruses in insect vectors. J. Comp. Pathol. 123, 231–247

35-Mellor, P. S., Rawlings, P., Baylis, M. & Wellby, M. P.1998. Effect of temperature on African horse sickness virus infection in Culicoides. Arch. Virol. 14 (Suppl.), 155–163

1989. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting blue-tongue virus antibodies in cattle and sheep. Vet. Rec. 124(6):136-41.

9-Afshar,A., Kayvanfar,H. 1974. Occurrence of precipitating antibodies to bluetongue virus in sera of farm animals in Iran. Vet. Rec. 94(11):233-5

10-Akhtar,S., Djallem,N., Shad,G., Thieme,O. 1997. Bluetongue virus seropositivity in sheep flocks in North West Frontier Province, Pakistan. Prev. Vet. Med. 29(4):293-8.

11-Breard,E., Hamblin,C., Hammoumi,S., Sailleau,C., Dauphin,G., Zientara,S.2004.The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. Res. Vet.Sci. 77(1):1-8.

12-Calistri,P. & Caporale,V. 2003. Bluetongue in Italy: A brief description of the epidemiological situation and the control measures applied. Bull. Off. Int. Epizoot. 15–17

13-Caracappa,S., Torina,A., Guercio,A., Vitale,F., Calabro,A., Purpari,G., Ferrantelli,V., Vitale, M., and Mellor,P.S.2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of Culicoides in Sicily. Vet. Rec. 153(3):71-4.

14-Chandel,B.S., Chauhan,H.C., Kher,H.N. 2003. Comparison of the standard AGID test and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies in camels in Gujarat, India. Trop. Anim. Health Prod. 35(2):99-104.

15-Coackley,W., Smith,V.W., Maker, D. 1980. A serological survey for bluetongue virus antibody in Western Australia. Aust. Vet. J.; 56(10):487-91.

16-Cook, G.1992. Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review. J. R. Soc. Med. 85, 688–691.

17-Donkersgoed,J.V. ; Gertonson.A., Bridges M., Raths, D., Dargatz,D., Wagner, B., Boughton A., Knoop, D., Walton, T. 2004. Prevalence of antibodies to bluetongue virus and *Anaplasma marginale* in Montana yearling in Montana yearling cattle entering Alberta feedlots.Can. Vet. J;45:486–492.

18-Eisa,M., Karrar,A.E., Abd Elrahim,A.H. 1979. Incidence of bluetongue virus precipitating antibodies in sera of some domestic animals in the Sudan. J. Hyg (Lond). 83(3):539-45

19-Gibbs,E.P., Greiner,E.C., Alexander,F.C., King,T.H., Roach,C.J. 1983. Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. Vet Rec. 5; 113(19):446-8.

20-Hafez,S.M., Taylor,W.P.1985.Serotypes of bluetongue virus present in Saudi Arabia. Prog.Clin. Biol. Res. 178:531-7.

21-Hafez,S.M., Pollis,E.G., Mustafa,S.A.1978. Serological evidence of the occurrence of bluetongue in Iraq.Trop. Anim.

Microbiol. 37, 5–15.

48-Ravishankar, C., Krishnan Nair, G., Mini, M., Jayaprakasan, V. 2005. Seroprevalence of bluetongue virus antibodies in sheep and goats in Kerala State, India. Rev. Sci. Tech. 24(3):953-8.

49-Reiter, P. 1998. Global warming and vector-borne disease in temperate regions and at high altitudes. Lancet 351, 839–840.

50-Rogers, D. J. & Randolph, S. E. 2003. Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS.Nature Rev. Microbiol. 1, 231–236.

51-Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., Cafiero, M.A., Baldi, L., de Santis, P., Meiswinkel, R., Caporale, V. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the Obsoletus complex (Culicoides, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. Vet. Rec. 157(5):133-9.

52-Sellers, R. F.1992. In Bluetongue, African Horse Sickness and Related Viruses: Proceedings of the 2nd International Symposium (eds Walton, T. E. & Osburn B. I.) 284–290 (CRC Press, Boca Raton, 1992).

53-Singer, R.S., Boyce, W.M., Gardner, I.A., Johnson, W.O., Fisher, A.S.1998. Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. Prev. Vet. Med. 35(4): 265-82.

54-Shringi,S., Shringi ,B. N.. 2005. Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies in indigenous breeds of sheep and goats in Rajasthan, India. J. Vet. Sic. 6(1), 77–79

55-Tabachnick, W. J. 1996.*Culicoides variipennis* and bluetongue virus epidemiology in the United States. Annu. Rev. Entomol. 41, 23–43.

56-Takamatsu, H., Mellor, P.S., Mertens, P.P.C., Kirkham, P.A., Burroughs, J.N. and Parkhouse, R.M.E.2003. A Possible Overwintering Mechanism for Bluetongue Virus in the Absence of the insect Vector. Journal of General Virology. 84, 227–235

57-Tatem, A.J., Baylis ,M., Mellor, P.S., Purse, B.V., Capela, R., Pena, I., and Rogers, D.J.2003.Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and North Africa using satellite imagery. Vet. Microbiol. 97(1-2):13-29.

58-Taylor, W.P., Mellor,P.S. 1994. Distribution of bluetongue virus in Turkey, 1978-81. Epidemiol. Infect. 112(3):623-33.

59-Taylor, W.P., al Busaidy, S.M., Mellor, P.S.1991.Bluetongue in the Sultanate of Oman, a preliminary epidemiological study. Epidemiol. Infect. 107(1):87-97.

60-Taylor, W.P.1987. Bluetongue in Syria and Jordan. Blue tongue in the Mediterranean region. Proceedings of a meeting in the Community programme for coordination of agricultural research, Istituto Zooprofilatico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise, Teramo, Italy, 3 and 4 October 1985

36-Mertens, P. P. C., Duncan, R., Attoui, H. & Dermody, T.S. 2004. In VIIIth Report of the ICTV (eds Fauquet, C. M.,Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. &Ball, L. A.) 447–454 (Elsevier/ Academic Press,London,).

37-Mullens, B. A., Tabachnick, W. J., Holbrook, F. & Thompson, L. H.1995. Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis* sonorensis. Med. Vet. Entomol. 9, 71–76

38-Mullick, S.G. 1988. Some epidemiological observations on the occurrence of blue tongue in organised farms in Andhra Pradesh. : Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases. 9: 4, 201-207.

39-OIE. 2000. Manual of standards, Diagnostic tests and vaccines,Chapter 2.1.9, Office International des Epizooties.

40-Osmani, A., Murati, B., Kabashi, Q.,Goga, I., Berisha, B., Wilsmore, A.J., Hamblin, C. 2006. Evidence for the presence of bluetongue virus in Kosovo between 2001 and 2004. Vet. Rec. 158(12):393-6

41-Patton, J.F., Work, T.M., Jessup, D.A., Hietala, S.K., Oliver, M.N., Maclachlan, N.J.1994. Serologic detection of bluetongue virus infection of black-tailed deer: Comparison of serum neutralization, agar gel immunodiffusion, and competitive ELISA assays. J. Wild Dis. 30(1): 99-102.

42-Patz, J. A. 2002. A human disease indicator for the effects of recent global climate change. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12506–12508.

43-Paweska, J. T., Venter, G. J. & Mellor, P. S.2002. Vector competence of South African Culicoides species for bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. Med.Vet. Entomol. 16, 10–21

44-Pritchard, L.I., Sendow, I., Lunt, R., Hassan, S.H., Kattenbelt, J., Gould, A.R., Daniels, P.W., Eaton, B.T. 2004.Genetic diversity of bluetongue viruses in south east Asia. Virus. Res. 101(2):193-201.

45-Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P., Baylis, M. 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. Nat. Rev. Microbiol;3:171–81

46-Purse, B.V., Baylis, M., Tatem, A.J., Rogers, D.J., Mellor, P.S., Van Ham, M., Chizov-Ginzburg, A., Braverman, Y. 2004. Predicting the risk of bluetongue through time: Climate models of temporal patterns of outbreaks in Israel. Rev. Sci. Tech.23(3):761-75.

47-Randolph, S. E. 2004.Evidence that climate change has caused 'emergence' of tick-borne diseases in Europe. Int. J. Med.

host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nature Rev: Microbiol. 2, 789–801.

65-Wittman, E. J., Mellor, P. S. & Baylis, M.2001. Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopognidae) in Europe. Rev. Scientifique Technique Off. Int. Epizoot. 20, 731–740

66-Wittman, E. J. & Baylis, M.2000. Climate change: Effects on Culicoides-transmitted viruses and implications for the UK. Vet. J. 160, 10–117

67-Yonguc, A.D., Taylor, W.P., Csontos, L., Worrall, E. 1982. Bluetongue in western Turkey. Vet Rec. 111(7):144-6.

61-Taylor, W. P. 1986. The epidemiology of bluetongue.Rev. Scientifique Technique Off. Int. Epizoot. 5,351–356.

62-Van Dijk, A. A. & Huismans,H. 1982. The effect of temperature on the *in vitro* transcriptase reaction of bluetongue virus, epizootic haemorrhagic disease virus and African horse sickness virus. Onderstepoort J. Vet. Res. 49, 227–232

63-Watson, R. T. 2001. IPCC. Climate Change 2001: Synthesis Report. A contribution of working groups I, II, and III to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Cambridge Univ. Press, UK, 2001).

64-Weaver, S. C. & Barrett, A. D. T.2004. Transmission cycles,