نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۴ پاییز ۱۳۹۳

جست‌وجوی ویروس بلوتانگ در جنین‌های سقط‌شده‌ی گوسفند در استان‌های چهارمحال و بختیاری و اصفهان با روش RT–PCR

• **محمدرضا محزونیه**
دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

• **عارفه گلستان‌فر (نویسنده مسئول)**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

• **مهدی سلیمی**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

• **مریم جمالی ترک آباد**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
تاریخ دریافت: اسفندماه ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: شهریورماه ۱۳۹۲
E-mail: a.golestanfar@gmail.com

چکیده

بیماری زبان‌آبی یا بلوتانگ از جمله بیماری‌های عفونی است که عمدتاً توسط حشرات منتقل و باعث بروز ضایعاتی در مخاط بینی، دهان و اندام‌های حرکتی و نیز سقط جنین در نشخوارکنندگان می‌شود. هدف از این مطالعه جست وجوی ژنومی–ویروس بلوتانگ در جنین‌های سقط شده گوسفند به عنوان عامل سقط بود. به منظور جست وجوی ژنوم ویروس بلوتانگ، از تعداد ۵۰ بره‌ی سقط شده نمونه‌ی خون، کبد و طحال تهیه شد. به نمونه‌های خون EDTA اضافه شد و با استفاده از ریمازول استخراج RNA انجام پذیرفت. نمونه‌ها به روش RT–PCR مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمون در ژل آگاروز ۱/۵ درصد، الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و توسط اشعه‌ی UV قرائت شد. در هیچ یک از نمونه‌ها نتیجه مثبت مشاهده نشد، به جز یک مورد که برای تعیین توالی ارسال گردید ولی نتیجه تعیین توالی، ویروس بلوتانگ را تأیید نکرد. بنابراین مطالعه‌ی حاضر می‌تواند گویای آن باشد که در موارد بررسی شده در مطالعه حاضر، احتمالا عفونت با ویروس بلوتانگ عامل سقط نبوده است اما ممکن است در صورت بالا بردن حجم نمونه و اجرای نمونه‌گیری به طور پراکنده در سرتاسر سال بتوان حتی در مناطق مورد مطالعه در طرح حاضر حضور ویروس یا ژنوم آن را نشان داد.

کلمات کلیدی: بلوتانگ، سقط، RT–PCR، بره

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 104 pp: 17-21

Detection of bluetongue virus in aborted lamb fetuses in Chaharmahal va Bakhtiari and Isfahan provinces, by RT-PCR method

By: *Mahzounieh, M.R., Associate professor of pathobiology department, Veterinary Faculty- Shahrekord University*
Golestanfar A. (Corresponding Author), Student of Veterinary Faculty, Shahrekord University
Salimi, M., Student of Veterinary Faculty, Shahrekord University
Jamali Torkabad, M., Student of Veterinary Faculty, Shahrekord University
Received: February 2012 Accepted: August 2013

E-mail:a.golestanfar@gmail.com

Detection of bluetongue virus in aborted lamb fetuses in Chaharmahal va Bakhtiari and Isfahan provinces, by RT-PCR method Background: Bluetongue or muzzle sore disease is an infectious disease which is mainly transmitted by insects. It can cause erosions in mouth, nasal mucosa and limbs and also abortion in ruminants. The aim of this study was genomic detection of bluetongue virus in sheep aborted fetuses as an aborting agent. Materials and methods: Samples were collected from blood, liver and spleen of 50 aborted lambs. EDTA was added to blood samples. RNA was extracted by using Rimazol. cDNA was synthesize was detected by RT-PCR. All products were separated by 1/5% agarose gel electrophoresis and stained in ethidium bromide. The results of all samples were negative, except one of them which was sent for sequencing and the result of sequencing didn't confirm presence of this virus. This study shows that Blue tongue virus does not cause abortion in ewes in studied areas of Iran, but it is possible that by increasing the sample size and sampling during the year in these areas, the presence of virus or its genome can be detected too.

Key words: Bluetongue, Abortion, RT-PCR, Lamb.

مقدمه

یکی از مسائل مهمی–که در زمینه دامپروری، دامپزشکی و تجارت جهانی احشام حائز اهمیت است، بیماری‌هایی هستند که در دام‌های اهلی خصوصا گوسفند، بز و گاو منجر به سقط می‌شوند. به طور کلی عوامل سقط جنین در گوسفند به دو دسته تقسیم می‌شود: ۱) عوامل غیرعفونی نظیر سوءتغذیه، عوامل هورمونی، سموم و استرس‌های محیطی. ۲) بیماری‌های عفونی نظیر بلوتانگ، بروسلوز، لیستریوز و غیره. این مطالعه وجود ردپای ویروس بلوتانگ را در جنین‌های سقط شده در استان‌های چهارمحال و بختیاری و اصفهان مورد بررسی قرار داد.

عامل ایجاد بیماری، ویروس بلوتانگ از خانواده reoviridae و از جنس orbivirus می‌باشد. ویروس بلوتانگ دارای ۲۶ سروتیپ است که ۸ سروتیپ آن بیماری‌زا و بقیه غیر بیماری‌زا هستند(۲). ژنوم این جنس شامل ۱۰ قطعه‌ی RNA دو رشته‌ای می‌باشد. در اطراف ژنوم، یک کپسید ۳ لایه از جنس پروتئین با قطر ۸۰ نانومتر قرار دارد. کپسید خارجی شامل ۲ پروتئین ساختاری VP۲ و VP۵ است که در اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌های جانوری در آغاز روند عفونت‌زایی مؤثر می‌باشند. این دو پروتئین متنوع‌ترین پروتئین‌های ویروسی‌اند. واکنش اختصاصی آن‌ها به خصوص VP۲ با آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، عامل تقسیم ویروس به سروتیپ‌های مختلف است. کپسید داخلی دو لایه بوده و قشر سطحی آن از ۸۷۰ پروتئین (VP۷) تشکیل شده است. لایه‌ی زیرین کپسید داخلی نیز شامل ۱۲۰ مولکول (VP۳)می‌باشد. هسته ویروس از ۱۰ قطعهRNA به همراه سه پروتئین ساختاری تشکیل شده است. این پروتئین‌ها شامل پلی‌مراز (VP۱)، آنزیم کلاهک‌گذاری (VP۴) و هلیکاز (VP۶) می‌باشند(۲). پروتئین‌های مرکزی به همراه برخی پروتئین‌های غیرساختاری (NS۱، NS۲، NS۳) شدیدا حفاظت شده‌اند و باعث واکنش متقاطع بین سروتیپ‌های مختلف می‌شوند (۳).

انتقال ویروس از طریق گزش پشه‌ای به نام Culicoides صورت می‌گیرد در فصول گرم و مرطوب فعالیت بیشتر دارد (۹). انتقال ویروس به طور مستقیم می‌باشد ولی به ندرت از طریق جفت و منی نیز اتفاق می‌افتد (۶). چنانچه حیوانی به یکی از سروتیپ‌ها آلوده شود تا مدت طولانی علیه آن سروتیپ آنتی‌بادی دارد ولی ایمنی در مقابل سروتیپ‌های دیگر به وجود نمی‌آید. کنترل با واکسیناسیون انجام می‌شود (۷). از علائم بیماری می‌توان به تب، ترشحات موکوزی و چرکی بینی، پرخونی و نکروز در مخاط بینی و دهان و گونه، سیانوزه شدن و ادم زبان اشاره کرد. سقط گاهی اتفاق می‌افتد (۱). جداسازی ویروس در آزمایشگاه بیشتر از خون، ریه و طحال صورت می‌گیرد. امروزه روش RT-PCR روشی استاندارد برای شناسایی ویروس است (۷).

اگرچه بیماری از آفریقا منشا گرفته و تا قبل از سال ۱۹۹۸ به صورت دوره‌های کوتاهی در اروپا خصوصا در کشور یونان دیده می‌شد، اما بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۵ سروتیپ‌های ۱، ۲، ۴، ۹ و۱۶ ویروس به اروپای مرکزی، غربی و مدیترانه گسترش یافت و در سال ۲۰۰۶ سروتیپ شماره ۸ این ویروس در شمال اروپا و در کشورهای آلمان، بلژیک، هلند و فرانسه

شـایع شد و به یک مسئله مهم اقتصادی تبدیل گردید (۱۱)، چراکه باعث کاهش تجارت بین‌المللی احشـام و تولید شـیر و گوشـت شد (۱۰ و ۱۲). در سـال ۲۰۰۸ سـروتیپ‌های دیگـری از بلوتاتگ (سـروتیپ ۶ و۱۱) در اروپای شـمالی پدیدار شـدند. بیست و پنجمین سـروتیپ این ویروس با نام Toggenberg virus در کشـور سـویس از بز جدا گردید (۷). ویروس بلوتانگ در ایران نیز در استان‌های کرمان (۸)، خوزستان، کردستان، فارس، آذربایجان غربی، قم و ایلام شناسایی شده است (۳).

مواد و روش کار

نمونه‌هـا: نمونه‌هـای مورد اسـتفاده از خون، بافت کبـد و طحال ۵۰ بره سـقط شـده با نژاد لری بختیـاری که اکثرا بیـن ۱۰۰-۶۰ روزه بودند و در فصـول پاییز و زمسـتان تهیه گردید سـپس در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری و در دمای ۷۲°C- نگه‌داری شدند. به منظور جلوگیری از انعقاد خـون، به نمونه‌های خون EDTA اضافه شـد. نمونه‌هـا مربوط به گله‌های گوسفند متعلق به شهرستان‌های شهرکرد و لردگان از استان چهار محال و بختیاری و نیز شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۰-۱۳۹۱ بود. فراوانی سقط در ایـن گله‌ها حدود ۲۵ درصد و گاهی بالاتر بـود و اغلب در ماه‌های آخر دوره‌ی جنینـی اتفاق می‌افتاد. از هر منطقه حـدودا ۲۰-۱۵ نمونه تهیه شـد. پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی دانشـکده دامپزشکی دانشـگاه شهرکرد منتقل می‌شـد. طی کالبدگشایی بره‌های سـقطی، جفت و جنین معمولا نرمال بود ولی گاهی علائمی مانند التهاب، خونریزی و نکروز بافتی در اندام‌های پارانشیمی دیده می‌شد.

استخراج:RNA اسـید نوکلئیک ویروس با استفاده از محلول ریمازول (TeifAra Farayand Co, Tehran, Iran) و به شـرح زیر اسـتخراج گردید: ابتدا نمونه‌های خون در ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و سرم آن‌ها استفاده شـد. ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های بافتی نیز در داخل میکروتیوب نرم شده، آنگاه به نمونه‌های مدنظر (سـرم و بافت) ۱۰۰۰ میکرولیتر ریمازول اضافه و ۱۰ دقیقه در محیط آزمایشـگاه قرار داده شـد تا لیز بافتی صورت پذیرد. به ترکیب فـوق ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده، ورتکس کرده و به منظور رسوب باقیمانده‌های سـلولی ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰rpm سانتریفوژ شد. ۰/۵ میکرولیتـر از فاز رویی برداشـته و به میکروتیوب دیگـری منتقل گردید، آنـگاه ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه شـد. محلول فوق به مدت ۱۰- ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سـپس ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm سـانتریفوژ گردید. در این حالت RNA ژله‌ای در کف میکروتیوب مشخص شد. پس از دور ریختن مایع رویی به رسوب RNA، ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول افزوده و پس از ورتکس، ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. شست و شو با اتانول مجدداً تکرار شد. اتانول رویی را دور ریخته و به RNA استخراج شده حدود ۵۰ میکرولیتر RNase free Water اضافه شد.

پرایمرها: پرایمرهای اختصاصی در این آزمایش که قبلا توسط Antony و همکاران (۲) طراحی و اسـتفاده شـده بود برای ساخت قطعه‌ای به اندازه ۱۱۵۶ pb از قطعـه‌ی هفتم ژنوم ویروسـی به کار برده شـد. این پرایمرها برای سـاخت cDNA و نیز انجام PCR مورد اسـتفاده قرار گرفتند. به علت تفاوت ناحیه انتهایی قطعه هفتم ژنوم در میان برخی از سـروتیپ‌های این ویروس، ۲ جفت پرایمر طراحی شـده اسـت تا بتواننـد توالی نوکلئوتیدی اختصاصی S۷ را در همه‌ی ۲۴ سـروتیپ احتمالی موجود در نمونه، تکثیر دهنـد و بتوانند همه‌ی سـروتیپ‌های ایـن ویروس را شناسـایی کنند. سروتیپ‌های ۷، ۹ و ۱۵ توسط پرایمرهای BTV/S۷/۰۳ و BTV/S۷/۰۴ و سـایر سروتیپ‌ها توسط پرایمرهای BTV/S۷/۰۱ و BTV/S۷/۰۲ تکثیر می‌شوند. خصوصیات پرایمرها در جدول شماره‌ی ۱ آورده شده است.

با توجه به اختلاف بین سروتیپ‌ها از نظر توالی قطعه جست و جو شده (S۷) دو جفت پرایمر طراحی شـد که اختلاف کمی-با یکدیگر دارند ولی اندازه قطعه کلی در هر دو یکسـان اسـت و انـدازه باند هر دو ۱۱۵۶جفت باز است.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

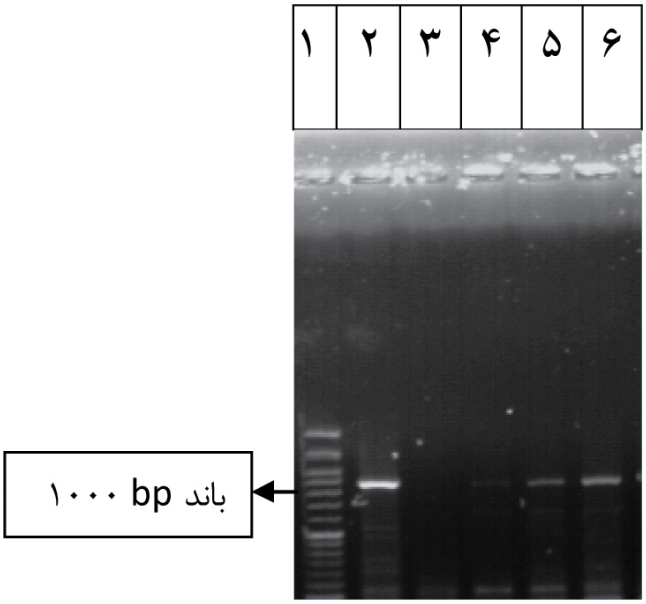
نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی ۵'→۳'
BTV/S۷/۰۱	GTTAAAAATCTATAGAGATG
BTV/S۷/۰۲	GTAAGTGTAATCTAAGAGA
BTV/S۷/۰۳	GTTAAAAAATCGTTCAAGATG
BTV/S۷/۰۳	GTAAGTTTAAATCGCAAGACG

سـاخت cDNA با روش رونوشـت برداری معکوس: پس از اسـتخراج RNA، cDNA در حجـم ۲۰ میکرولیتـر (۴میکرولیتر بافر PCR ۵ X، ۰/۵ میکرولیتـر RNase inhibitor، ۲ میکرولیتـر dNTP mix ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتـر Reverse Transcriptase، هـر کدام از پرایمرهای اختصاصی ۱ میکرولیتـر (۱۰pmol/µl) کـه چون ۴ پرایمر اسـتفاده شـده جمعا ۴ میکرولیتر می‌شـود، ۸/۵ میکرولیتر RNA الگو) ساخته شد. سیکل دمایی برای سـاخت cDNA به صورت: ۴۲ C° بـرای ۶۰ دقیقه،°C ۷۰ برای ۱۰ دقیقه بود.

واکنش PCR : cDNA تهیه شده از روی ژنوم ویروس به روش RT-PCR و با اسـتفاده از مواد تهیه شده از شرکت سـیناژن در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافـر PCR ^{X}۱۰، ۱ میکرولیتر dNTP mix ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتـر آنزیم Taq پلیمراز، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵میکرولیتر MgCl۲ ۵۰ میلی‌مـولار، هر یک از پرایمرها ۱ میکرولیتر (۱۰pmol/µl)، آب مقطـر ۱۳/۵ میکرولیتر) تکثیر شـد. برنامه‌ی دمایـی PCR به ترتیب ۹۴ C° بـه مدت ۱ دقیقـه، ۴۵ C° برای ۱ دقیقـه، ۷۲ C° برای ۲ دقیقه بود. این سـیکل ۴۰ بار در دستگاه ترموسـایکلر (Applied Biosystems, geneamp, ۹۷۰۰, USA) تکرارشـد. محصـول PCR بـه نسـبت ۱ به ۶ بـا رنـگ بارکننـده مخلـوط و در ژل آگاروز ۱/۵درصد (سـیناژن- ایران) الکتروفورز گردید.

نتایج

با توجه به سرعت بالا و توانایی RT-PCR درشناسایی سویه‌های مختلف BTV و نیز ردیابی اسـید نوکلئیک آن تا ماه‌ها پس از عفونت، این تسـت در مطالعه حاضر اسـتفاده شد. در این بررسـی نتایج آزمایش هیچ یک از انواع نمونه‌ها (خون، بافت) مثبت نشد، به جز یک مورد از نمونه‌های خون، که نتایج بررسی آن با الکتروفورز بیانگر تأیید حضور ویروس بود. این نمونه برای تعیین توالی نوکلئوتیدی ارسـال شد ولی نتایج توالی نوکلئوتیدی آن،



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصولات PCR، خط ۱ مارکر DNA ۱۰۰ زوج بازی (ساخت سیناکلون)، خط ۲ کنترل مثبت، خط ۳ کنترل منفی، خط ۶ نمونه ارسال شده به منظور تعیین توالی

حضور توالی مشابه در ویروس بلوتانگ را تأیید نکرد.

بحث

شیوع و گسترش عفونت بلوتانگ در مناطق مختلف با توجه به شرایط اقلیمی، جغرافیایی و ارتفاع و نیز حضور میزبان‌های حساس متفاوت است (۶). این ویروس نخستین بار در آفریقای جنوبی شناسایی شد (۷). متعاقباً یک همه‌گیری در اواسط قرن بیستم در کشورهای حوزه مدیترانه، ایالات متحده آمریکا، آسیا و خاورمیانه اتفاق افتاد (۷). عفونت با ویروس بلوتانگ در سال ۱۹۷۰ در استرالیا شناسایی شد (۷). از سال ۱۹۹۸ حداقل ۵ سروتیپ متفاوت از این ویروس (سروتیپ‌های ۱، ۲، ۴، ۹، ۱۶) در نواحی آزاد حوزه مدیترانه توسعه یافت و نشخوارکنندگان را در آفریقا، شبه جزیره ایبری، جزایر مدیترانه، ایتالیا، بالکان و یونان آلوده ساختند. از بین این ۵ سروتیپ تنها سروتیپ ۱ از حوزه مدیترانه به اروپای شمالی توسعه یافت. سروتیپ آسیایی از این ویروس (سروتیپ ۸) نیز در سال ۲۰۰۶ در اروپای شمالی ظاهر شد (۴). این سروتیپ به سرعت انتشار یافت و بسیاری از کشورها همچون کشورهای اسکاندیناوی را درگیر کرد (۴). سروتیپ ۸ برای بسیاری از گونه‌ها شدیداً بیماری‌زاست و بر اقتصاد کشورهای اروپایی بسیار اثر گذاشته است (۷). طی گزارش Conraths و همکاران این بیماری در آلمان از سال ۲۰۰۶ رؤیت شده و میزان مرگ و میر آن حدود ۱۳/۱درصد برای گوساله و ۴۱/۵درصد برای گوسفند می‌باشد. واکسیناسیون در سال ۲۰۰۸ این میزان را کاهش داد(۴). در سال ۲۰۰۸ دو سروتیپ جدید ۶ و ۱۱ نیز در شمال اروپا یافت شد (۷). در آسیا نیز پس از همه‌گیری اواسط قرن بیستم، گزارشاتی از ردیابی ویروس در هند و ایران ارائه شده است(۳،۵). هم اکنون عفونت در تمام کشورهای جهان به جز قطب جنوب وجود دارد و ویروس در اغلب مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دیده شده است (۷). در ایران نیز طی گزارشات خضری و عظیمی ویروس مورد نظر در استان‌های خوزستان، کردستان، فارس، آذربایجان غربی، قم و ایلام مورد شناسایی قرار گرفته است (۶). همچنین بر اساس تحقیقات مهدوی و همکاران این ویروس در استان کرمان، در شتر نیز گزارش شده است (۸).

Worwa و همکاران روش خنثی‌سازی سرم (SN) را به منظور تعیین مقدار آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و نیز تشخیص سروتیپ ویروس با استفاده از پلاسما، به کار بردند. طبق نتایج حاصل، حیوانات درگیر با سویه اروپای شمالی BTV۸ تیتر آنتی‌بادی پایینی را خصوصا پس از تجویز واکسن و یا ایجاد عفونت تجربی نشان دادند (۱۳). اگرچه تست SN حساس‌ترین روش ارزیابی سرولوژیک می‌باشد ولی به علت زمان‌گیر بودن کاربرد چندانی ندارد (۶). خضری و عظیمی گسترش سرولوژیکی این ویروس را در ایران و از طریق

(c-ELISA (competitive-enzyme linked immunosorbent assay

مورد بررسی قرار داده و بیشترین شیوع را در آذربایجان غربی (۶۴/۸۶ درصد) بیان کردند، این در حالی بود که کمترین درگیری در استان قم (۱۲/۱ درصد) وجود داشت (۶). مهدوی و همکاران با استفاده از کشت سلول و نیز c-ELISA حضور این ویروس را در ۱۰ شتر حامله در کرمان اعلام کردند (۸). همچنین Joardar و همکاران از روش الایزای غیر مستقیم یا iELISA (indirect enzyme linked immunosorbent assay) به منظور ارزیابی سرولوژیک این ویروس در هند استفاده نمودند (۵). Anthony و همکاران به منظور ردیابی ویروس روش RT-PCR را با استفاده از دو جفت پرایمر که بر اساس انتهای قطعه شماره‌ی ۷ از ژنوم ویروس طراحی شده بودند، پیشنهاد کردند. این روش قابلیت ردیابی همه‌ی سروتیپ‌ها با هر منشأ جغرافیایی که باشند، را دارد و هیچ واکنش متقاطعی با سایر اعضای جنس orbivirus نشان نمی‌دهد (۲). در ایران عظیمی و همکاران با مطالعه روی توالی نوکلئوتیدی قطعه S7، متوجه شدند که سروتیپ‌های مختلف بلوتانگ در ایران را می‌توان در دو گروه طبقه‌بندی کرد. یک گروه مشابه گونه‌های آسیای شرقی در هند و چین و گروه دوم مشابه گونه‌های غربی ویروس در آمریکا، اروپا و آفریقا است (۳).

مطالعه‌ی حاضر می‌تواند گویای آن باشد که در موارد بررسی شده در این نواحی از کشورمان این عفونت نمی‌تواند عامل سقط باشد. اگرچه ممکن است همان‌طور که خضری و عظیمی (۶) در استان‌های دیگر نشان دادند، تعدادی از گوسفندان از نظر سرمی-مثبت بوده باشند. هرچند بررسی‌های سرمی در این مطالعه انجام نشده است اما طبق این مطالعه ژنوم این ویروس در موارد سقط شناسایی نشد، لذا به احتمال زیاد ویروس زبان آبی در این نواحی در آن زمان و جمعیت خاص مورد مطالعه به عنوان عامل سقط مطرح نیست و علل سقط این گوسفندان می‌تواند مربوط به سایر عوامل ویروسی، باکتریایی یا قارچی باشد. هرچند، عواملی چون نمونه‌گیری در فصل زمستان و پاییز که پشه ناقل فعالیت کمتری دارد و یا نمونه‌گیری قبل از شروع وایرمی و گردش ویروس در خون نیز می‌توانند در منفی شدن نتایج موثر باشند و ممکن است در صورت بالا بردن حجم نمونه و اجرای نمونه‌گیری به طور پراکنده در سرتاسر سال بتوان حتی در مناطق مورد مطالعه در طرح حاضر حضور ویروس یا ژنوم آن را نشان داد.

منابع مورد استفاده

۱- اف‌کاهرز، ر. ۱۳۸۶، بیماری‌های ویروسی گاو. ترجمه عزیزیان، سید مصطفی.

تهران، سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی، صفحات: ۱۲۵- ۱۱۵.

2- Anthony, S., Jones, H., Darpel, K. E., Elliott, H., Maan, S., Samuel, A., et al. (2007). A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7(VP7 gene) from 24 BTV serotype, Journal of Virological Methods. 141:188-197.

3- Azimi, S. M., Keyvanfar, H., Pourbakhsh, S. A. and Razmaraii, N. (2008). S7 gene Characterization of bluetongue viruses in Iran, Archives of Razi Institute. 63:15-21.

4- Conraths, F. J., Gethmann, J. M., Staubach, C., Mettenleiter, T. C., Beer, M. and Hoffmann, B. (2009). Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany, Journal of Emerging Infectious Diseases. 15(3):433-435.

5- Joardar, S.N., Barkataki, B., Halder, A., Lodh, Ch. and Sarma, D. (2013). Seroprevalence of bluetongue in north eastern Indian state- Assam, Original Research. pp:196-199.

6- Khezri, M. and Azimi, S.M. (2012). Epidemiological investigation of bluetongue virus antibodies in sheep in Iran, Original Research. pp:122-125.

7- Maclachlan N.J., and Dubovi E.J. Reoviridea. Ferner's Veterinary Virology. 4th published 2011, 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK: 283-286.

8- Mahdavi, S., Khedmati, K. and Pishraft Sabet, L.(2006). Serologic evidence of bluetongue infection in one-humped camels (*Camelus dromedarius*) in Kerman province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, University of Shiraz,7(3).

9- Mellor, P. S. (1990). The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors, Current Topics in Microbiology and Immunology. 162:143-61.

10- Osburn, B. I. (1994). The impact of bluetongue virus on reproduction, Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 17(3-4):189-196.

11- Rodrigues-Sanchez, B., Iglesias-Martin, I., Martinez-Aviles, M. and Sanchez-Vizcaino, J. M. (2008). Orbivirus in the Mediterranean Basin: Update Epidemiological Situation of Bluetongue and New Methods for Detection of BTV Serotype 4, Transboundary and Emerging Diseases. 55:205-214.

12- Tabachnick, W. J., Robertson, M. A. and Murphy, K. E. (1996). *Culicoides variipennis* and bluetongue disease. Annuals of the New York Academy of Sciences. 791:219.

13- Worwa, G., Chaignat, V., Feldmann, J. and Thur, B. (2012). Detection of neutralizing antibodies against bluetongue virus serotype 8 by an optimized plasma neutralization test. Journal of Virological Methods,188(1-2):168-74.