نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۹، تابستان ۱۳۹۲

بررسی ویروس شناسی و سرولوژی بیماری زبان آبی در گوسفندان برخی از مناطق ایران

• **روزبه فلاحی** (نویسنده مسئول)
استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• **منیژه یقینی**
کارشناس ارشد، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• **روحانی کارگر مؤخر**
استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• **کمال الدین خدمتی**
مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۵۴۰۵۹۷۲
Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

چکیده

زبان آبی (بلوتانگ)[1] یکی از بیماری های حاد و تحت حاد ویروسی در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی می باشد .این تحقیق جهت بررسی وضعیت این بیماری با استفاده از روش های تشخیصی سرولوژی و نیز جدا سازی ویروس انجام گرفت. در فاصله زمانی سال های ۱۳۸۵-۱۳۸۲، از گوسفندهای ۹ استان شامل مرکزی، اردبیل، یزد، قم، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، قزوین، گلستان و اصفهان از ۴۳۲ رأس گوسفند مشکوک به بیماری نمونه هایی تهیه گردید. ابتدا با انجام روش الایزای رقابتی[2] وجود پادتن ضد ویروس زبان آبی در ۲۸۷ نمونه محرز گردید. جهت جدا سازی ویروس، از نمونه های بافی کوت خون تعداد ۶۵ نمونه به تخم مرغ های SPF[3] جنین دار تلقیح[4] و پس از ازدیاد ویروس، تلقیح به سلول های Vero و BHK انجام شد. در ۲۲ مورد نمونه تلقیح شده، ضایعات سلولی مشاهده گردید که با انجام آزمایش خنثی سازی سرم تأیید گردید. پس از تعیین عیار ویروس، آماده سازی جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت و اجرام ویروسی در ابعاد ۷۲×۷۰ nm مشاهده شد. تزریق ویروس خالص شده و نیز خون کامل نمونه های اولیه در گوسفندان حساس موجب بروز علائم بالینی گردید.پس از تهیه نمونه از گوسفندان مبتلا شده، تمام مراحل مجدداً انجام گرفت که نتایج حاصله مؤید وجود ویروس زبان آبی می باشد.

کلمات کلیدی: بررسی، ویروس شناسی، سرولوژی، بیماری زبان آبی، ایران

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 99 pp: 36-43

Virological and werological wurvey on bluetongue disease in sheep in some parts of Iran

By: Fallahi, R. Assistant Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, (Corresponding Author; Tel: +989125405972), Yaghini, M. Expert of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Kargar Moakhar, R. Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Khedmati, K. Instructor Razi Vaccine and Serum Research Institute

Received: Septermer 2012 **Accepted: November 2012**

Bluetongue is an acute and subacute viral diseases of domestic and wild ruminants.This research was conducted to assess the disease status using serological diagnostic methods and virus isolation were performed. During the period 2003-2006, from sheep farms of 9 provinces including Markazi, Ardabil, Yazd, Qom, East Azarbaijan, West Azarbaijan, Qazvin, Isfahan and Golestan, Four handred thirty two samples collected in suspected sheep to disease. In first stage, by ELISA method, the antibody against bluetongue virus were found in two hundred eighty seven samples. For virus isolation, from samples of buffy coats, sixty five samples inoculated to embryonated SPF eggs and after virus propagation, re-inoculated into Vero and BHK cell cultures. In twenty two inoculated samples, the cell lesions was observed. With serum neutralization test confirmed. After titration the virus, preparation for observation under electron microscopy done, and, viral particles were found in 70x72nm. After injection the purified virus and whole the primary samples, sensitive sheep,the clinical signs seen. After obtaining blood samples from sheep infected, the all of the steps was again the results confirm there is bluetongue virus.

Key words: Survey, Virology, Serology, Bluetongue disease, Iran

مقدمه

زبان آبی (Bluetongue) یک بیماری حاد و تحت حاد ویروسی در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی است و حشرات، ناقل بیولوژیک آن می باشند. اشکال بالینی این بیماری بیشتر در گوسفندان مشاهده می شود و شدت آن بر اساس سویه ویروس، نژاد گوسفند و شرایط محیطی متفاوت است. (۹، ۱۰، ۱۱،۱۴) واگیری بیماری و تلفات ناشی از آن سبب معرفی این بیماری به عنوان یک خطر بالقوه و ثبت آن در فهرست بیماری های مورد توجه سازمان جهانی بهداشت دام [۵](O.I.E) شده است، به همین دلیل گزارش های وجود بیماری از کشورهای مختلف اهمیت زیادی دارد. (۲۰، ۲۱) ویروس زبان آبی از جنس اربی ویروس[۶] و از خانواده رئوویریده[۷] می باشد و تاکنون ۲۴ سروتیپ[۸] از آن در سراسر دنیا شناسائی و گزارش شده است. ناقل این ویروس پشه ای از خانواده کولیکوئیدس[۹] می باشد و شرایط مطلوب برای زندگی آن معمولاً دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و رطوبت ۵۰ درصد می باشد. ویروس زبان آبی دارای RNA دو رشته ای و قطعه قطعه (۱۰قطعه ای) می باشد. مبنای طبقه بندی سرولوژیکی آن بر اساس تولید پروتئین از یک یا هر دو قطعه ژنوم ویروس است، ولی حدت و سایر خصوصیات ویروس مربوط به این پروتئین نمی باشد. در روش هایی که برای تشخیص بیماری استفاده می شود مبنای کار، وجود پروتئین VP۷ یا VP۲ می باشد. ویروس زبان آبی الزاماً یکی از این پادگن ها را دارا می باشد. تشخیص های سرولوژی بیماری عمدتاً بر اساس وجود پروتئین VP۷ صورت می گیرد که بیانگر عفونت زبان آبی می باشد. هر یک از سروتیپ های این ویروس ممکن است حدت های متغیری در مناطق مختلف ایجاد نمایند. (۱۰، ۱۱،۱۴،۲۰)

بیماری زبان آبی عموماً به دو صورت اختلالات تولید مثلی و تورم عروق در ارگان های مختلف بروز می کند. علائم بالینی معمولاً درگوسفند و به ندرت درگاو و بز دیده می شود. بعد از دوره کمون[۱۰] ۸ -۳ روزه، تب زودگذر ۴۱/۵ درجه، ادم[۱۱] صورت، لب، پوزه و گوش، ترشح بزاق، پرخونی مخاط دهان، بینی و زبان و تغییر رنگ زبان به قرمز_ آبی دیده می شود. ادم ریوی و بعضاً پنومونی[۱۲]، لنگش، پرخونی در ناحیه سم و میوپاتی[۱۳] قلبی که ممکن است منجر به مرگ ناگهانی شود از دیگر علائم بیماری می باشند. زبان آبی با بیماری های اکتیمای واگیر[۱۴]، تب برفکی و آبله گوسفندی باید تفریق داده شود.

در حال حاضر آلودگی با ویروس عامل زبان آبی در آفریقای جنوبی و غربی، خاورمیانه، هند، شبه جزیره ایبری، آمریکا، استرالیا و برخی از کشورهای آمریکای جنوبی تشخیص داده شده است. (۶، ۱۴،۷، ۲۱)

اولین مورد زبان آبی در سال ۱۸۰۰در آفریقای جنوبی تشخیص داده شد اما جزئیات آن تا سال ۱۹۰۰ مشخص نشد. اولین گزارش آن در ایالات متحده در سال ۱۹۵۰ بود. در سال ۱۹۹۹ شیوع آن در بلژیک، بلغارستان،کرواسی، فرانسه، آلمان، یونان، ایتالیا، کوزوو، لوگزامبورگ، مقدونیه، مراکش، هلند، اسپانیا و یوگسلاوی رخ داد. (۸، ۱۰،۱۵،۲۰،۲۱)

بیماری زبان آبی بطور گسترده در اروپا، شمال، مرکز و جنوب آمریکا، مکزیک، آفریقای جنوبی و غربی، خاورمیانه، شبه قاره هند، شبه جزیره ایبری، چین، جنوب آسیا، جزایر سلیمان، گینه و استرالیا وجود دارد. این بیماری در کشور ترکیه نیز چندین بار گزارش گردیده است. (۱۳) در زمینه

بررسی سرولوژی بیماری، روش الایزای رقابتی به عنوان روشی دقیق و حساس توسط محققین مختلف معرفی شده است. (۵ ، ۱۶، ۱۷، ۲۳)

در مطالعات انجام گرفته، فراوانی نمونه های مثبت از نظر وجود پادتن در کشور قزاقستان ۲۳/۲ درصد، یونان ۵۷/۷ درصد، کروسیکای شمالی ۲۴ درصد و کروسیکای جنوبی ۴۰ درصد بدست آمده است. (۸)

این بیماری بر حسب گسترش میزبان و ناقل، در مناطق مختلف ایران از جمله نقاط مرزی و مرکزی گزارش شده است. در مطالعه ای که کیوانفر و افشار در سال ۱۳۵۳ انجام دادند وجود پادگن ضد ویروس بیماری زبان آبی در سرم ۲۹۲۱ رأس از دام های ذبح شده در کشتارگاه تهران و شیراز مورد ارزیابی قرار گرفت و فراوانی پادگن در سرم گوسفندان ۷/۶ درصد گزارش شد.(۳)

بکایی و همکاران (۱۳۸۶) در بررسی سرولوژیکی بیماری زبان آبی در گله های گوسفند آذربایجان غربی از مجموع ۶۰۵ نمونه سرم تهیه شده از گله های گوسفند که با روش ژل دیفوزیون از نظر پادگن ضد ویروس بیماری زبان آبی مورد آزمایش قرار گرفتند در۳۲۸ نمونه (۶۳/۱ درصد) واکنش مثبت مشاهده کردند. (۱)

از آنجا که در طی سالیان اخیر گزارشات زیادی مبنی بر احتمال وجود بیماری در گوسفندان برخی از مناطق ایران و جود دارد که بیشتر بر اساس مشاهده علائم بالینی می باشند، هدف از انجام این تحقیق بررسی وضعیت این بیماری با استفاده از روش های تشخیصی سرولوژی و نیز جداسازی ویروس زبان آبی بوده است. با جداسازی ویروس می توان نسبت به ماهیت دقیق تر آن پی برد و از آن در تحقیقات گوناگون استفاده کرد.

مواد و روش کار

نمونه برداری

در فاصله زمانی سال های ۱۳۸۵-۱۳۸۲ بر اساس گزارشات سازمان دامپزشکی و شناسایی مناطق آلوده، نمونه برداری از گوسفندهای های ۹ استان شامل مرکزی، اردبیل، یزد، قم، آذربایجان شرقی،آذربایجان غربی، قزوین، گلستان و اصفهان جهت غربالگری[۱۵] با استفاده از روش الایزای رقابتی صورت گرفت. از ۴۳۲ رأس گوسفند مشکوک با علائم مشابه به بیماری از هر کدام دو نمونه خون یکی بدون ماده ضد انعقاد جهت تهیه سرم و انجام آزمایش الایزا و دیگری حاوی ماده ضد انعقاد جهت تهیه بافی کوت از خون کامل به منظور جداسازی ویروس اخذ و تحت شرایط استاندارد (در مدت زمان ۲۴-۱۲ ساعت و در کنار یخ) به آزمایشگاه ویروس شناسی مؤسسه رازی ارسال گردید. نمونه های سرم بلافاصله مورد آزمایش قرار گرفته و نمونه های بافی کوت تا زمان مورد نظر در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی گراد قرار می گرفتند.

غربالگری نمونه های سرمی با تست الایزای رقابتی

از تعداد ۴۳۲ نمونه خون اخذ شده، نمونه های سرمی تهیه و از کیت تجارتی زبان آبی (Institut POURQUIER-Product code/P ۰۰۴۵۰/۰۴) جهت جستجوی پادگن ضد ویروس استفاده گردید. پادگن مورد استفاده در کیت، از نوع مونوکلونال که بر علیه پادتن VP7 ویروس زبان آبی تهیه و قادر به تشخیص تمام سروتیپ های ویروس می باشد، گرچه قادر به تفکیک نوع سروتیپ آنها نیست.

تزریق خون کامل به تخم مرغ SPF جنین دار

از تعداد ۶۵ نمونه بافی کوت بدست آمده از خون کامل گوسفندانی که در تست غربالگری از نظر وجود پادگن ضد ویروس زبان آبی مثبت بودند طبق روش های استاندارد (۳)، به تخم مرغ SPF جنین دار ۱۲-۹ روزه تزریق شد. تزریق در ورید جنین جوجه، با استفاده از سرنگ پدالی و به منظور تکثیر و ازدیاد ویروس انجام گرفت. تخم مرغ های تزریق شده در دمای ۳۳/۵ درجه سانتیگراد و در رطوبت لازم نگهداری شده و روزانه در اتاق Candling مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند. از جنین هائی که بین روزهای سوم تا هفتم تلف می شدند، نمونه های هموژن تهیه (بعد از جدا نمودن سر، بال و پاها) و در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد قرار داده می شدند.

تلقیح نمونه های جمع آوری شده از تخم مرغ جنین دار به کشت سلول

نمونه های هموژن شده جنین های تلف شده، بطور جداگانه به فلاسک های کشت سلولی Vero و BHK تلقیح و پس از ۲ ساعت زمان جذب، به آنها محیط کشت DMEM[۱۶] حاوی ۲ درصد سرم جنین گاو (FBS)[۱۷] اضافه و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و بمدت ۱۴ روز از لحاظ ظهور ضایعات سلولی (CPE)[۱۸] مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت عدم مشاهده CPE، حداقل ۳ پاساژ کور از آنها تهیه و در صورت مشاهده CPE در هر پاساژ، عیار ویروس به روش Reed & Muench تعیین و برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی آماده گردیدند.

انجام آزمایش خنثی سازی سرم (SN)[۱۹]

بر طبق روش استاندارد و با استفاده از آنتی سرم اختصاصی زبان آبی (۸۱۷۵/Institut POURQUIER-Product code) انجام گرفت. در این روش مقادیر متغیری از ویروس را در رقت ۱۰۰۲۰ TCID/ml با مقدار ثابتی از آنتی سرم مخلوط نموده و پس از یک ساعت مجاورت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به سلول حساس Vero اضافه گردید. در این روش دو سرم، یکی سرم تحت آزمایش و دیگری سرم فاقد پادتن در یک زمان و با هم تحت آزمایش قرار گرفتند و اختلاف عیار به دست آمده در سرم نرمال و سرم تحت آزمایش که همان شاخص خنثی سازی۲۱ است محاسبه گردید.

تزریق ویروس جدا شده به دام حساس و بررسی روند بیماری زایی آن

تعدادی گوسفند که پس از معاینه بالینی کاملاً سالم بوده و از نظر وجود پادگن علیه ویروس زبان آبی در تست الایزای رقابتی منفی بودند، انتخاب و برای هر نمونه مورد آزمایش، یک رأس گوسفند به عنوان دام تحت آزمایش و نیز یک رأس گوسفند به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بر طبق روش توصیه شده توسط O.I.E (۲۰۰۵) مقدار ۱۰ میلی لیتر از گلبول های شسته شده گوسفندانی که از آنها ویروس جدا شده بود به صورت زیر جلدی به گوسفندان تحت آزمایش تزریق شد. علاوه بر آن به تعدادی از گوسفندان تحت آزمایش دیگر مقدار ۱۰ میلی لیتر از نمونه سوسپانسیون سلول های حاوی ویروس زبان آبی تزریق گردید. دام های تزریق شده از لحاظ بروز علائم بالینی تحت کنترل و مراقبت قرار گرفتند. از گوسفندانی که در آنها علائم بالینی مشاهده گردید، به منظور جداسازی

و شناسایی ویروس، نمونه خون کامل تهیه و تمام مراحل جداسازی، تلقیح به تخم مرغ جنین دار و کشت های سلولی، آزمایش خنثی سازی سرم، تعیین عیار ویروسی و مشاهده اجرام ویروسی با میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل ازغربالگری نمونه های سرم با آزمایش الایزای رقابتی

از تعداد ۴۳۲ نمونه سرمی که با استفاده از پادگن زبان آبی استاندارد در آزمایش الایزای رقابتی مورد آزمایش قرار گرفتند، در ۲۸۷ نمونه، وجود پادگن ضد ویروس زبان آبی محرز گردید. (جدول۱)

بر طبق دستورالعمل کیت، سرم هایی که درصد مهار شدنشان برابر و یا بیشتر از ۶۰ درصد شود از نظر وجود پادگن ضد زبان آبی، منفی، مابین ۶۰-۵۰ درصد، مشکوک و کمتر و یا برابر با ۵۰ درصد، مثبت در نظر گرفته می شوند.

نتایج حاصل از تلقیح نمونه های جمع آوری شده از تخم مرغ جنین دار به کشت سلول

از مجموع ۳۰ نمونه خون کامل آماده شده که در ورید جنین های جوجه تزریق شدند در ۱۰ مورد موجب بروز تغییرات ناشی از رشد ویروس و پرخونی جنین و نهایتاً تلفات در روزهای سوم تا هفتم سن جنینی گردید که پس از جدا نمودن سر، بال و پاها از آنها نمونه های هموژن تهیه و بر روی کشت سلولی Vero و BHK تلقیح گردید. در ۳ مورد در سلول Vero بعد از ۵-۴ روز از تلقیح ضایعات سلولی (CPE) در پاساژهای سوم الی ششم مشاهده گردید. (شکل ۱)

در تعیین عیار ویروس با استفاده از روش Reed & Muench، عیار ویروس $TCID_{50}$ ۱۰ $^{5/63}$ برآورد گردید. پس از آماده سازی جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی که طی چند مرحله صورت گرفت، اجرام ویروسی در ابعاد ۷۲ nm ×۷۰ مشاهده گردید. (شکل ۲)

نتایج حاصل از آزمایش خنثی سازی سرم

اختلاف عیار بدست آمده در سرم طبیعی و سرم تحت آزمایش عدد ۲/۲۴ محاسبه گردید که همان شاخص خنثی سازی می باشد.

نتایج حاصل از تزریق ویروس به دام حساس و بررسی بیماری زایی آن

در گوسفندان تحت آزمایش که مورد تزریق گلبول های شسته شده و نیز سوسپانسیون سلول های حاوی ویروس زبان آبی قرار گرفته بودند در همه آنها پس از گذشت ۵ روز از تزریق، تب و ضایعاتی بر روی لب ها، لثه ها، زبان و پوست ایجاد گردید. (شکل ۳)

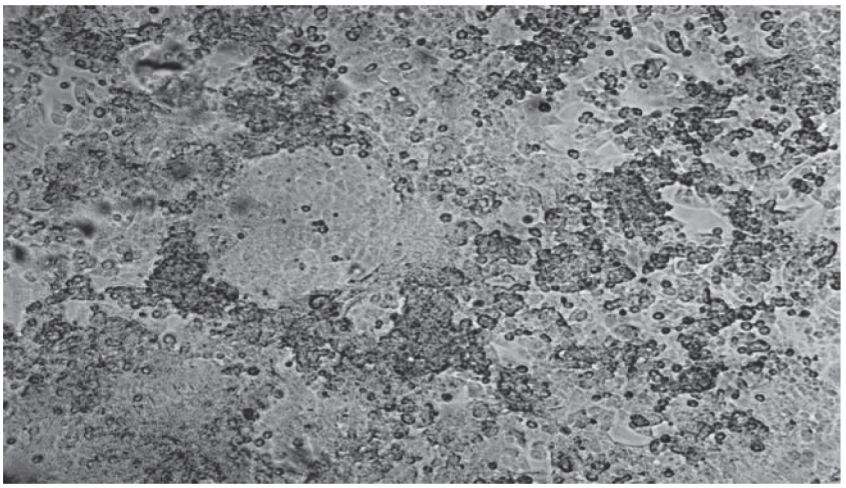
نتایج بدست آمده از تلقیح نمونه های خون کامل گوسفندان مبتلا شده در تخم مرغ جنین دار و کشت های سلولی، آزمایش خنثی سازی سرم، تعیین عیار ویروسی و مشاهده اجرام ویروسی با میکروسکوپ الکترونی عیناً مشابه موارد قبل بود.

بحث

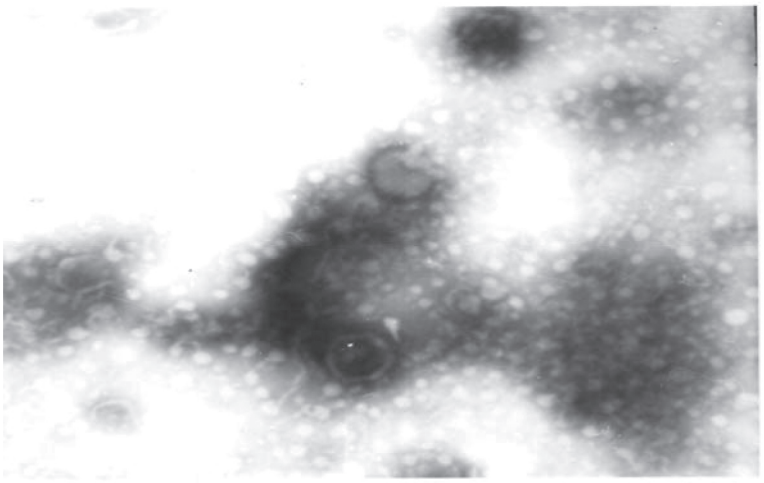
بیماری زبان آبی بر حسب گسترش میزبان و ناقل در مناطق مختلف ایران از جمله نقاط مرزی و مرکزی گزارش شده است. (۳، ۲۲) واگیری بیماری و وجود علائم بالینی و هیستوپاتولوژیک مشابه با سایر بیماری هایی نظیر اکتیمای واگیردار، طاعون نشخوارکنندگان (PPR)[۲۲]، ذات الریه و ..

جدول ۱- نتایج بررسی نمونه های مشکوک به ویروس زبان آبی از نظر سرمی

ردیف	محل نمونه برداری	تعداد نمونه سرم	نتایج
۱	استان مرکزی	۴۷	۶ نمونه مثبت
۲	استان اردبیل	۱۷	۱۳ نمونه مثبت
۳	استان یزد	۵	۱ نمونه مثبت
۴	استان قم	۷	۷ نمونه مثبت
۵	استان آذربایجان شرقی	۵	۵ نمونه مثبت
۶	استان آذربایجان غربی	۲۹	۱۳ نمونه مثبت
۷	استان قزوین	۱	۱ نمونه مثبت
۸	استان گلستان	۲۱	۱ نمونه مثبت
۹	استان اصفهان	۳۰۰	۲۴۰ نمونه مثبت
جمع کل		۴۳۲	۲۸۷ نمونه مثبت



شکل ۱- ضایعات سلولی (CPE) در سلول Vero، ۵-۴ روز بعد از تلقیح در پاساژ ششم (بزرگنمایی: ۶۳×)



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی اجرام ویروسی ۷۲×۷۰ nm در سوسپانسیون کشت سلولی مشکوک به ویروس زبان آبی (بزرگنمایی: ۱۲۵۴۰۰×)

و محدودیت های روش های شناسایی از طرف دیگر اهمیت این بیماری را در مورد تشخیص و جدا سازی و شناسایی ویروس مولد آن مضاعف نموده است. (۸، ۱۸) لذا گزارش های تشخیص و اثبات بیماری از سایر جنبه های آن مانند درمان، پیشی گرفته و از اهمیت ویژه ای در کشورهای بخصوص دارای دامپروری صنعتی برخوردار است. عموماً در این کشورها گزارشات اولیه بر مبنای آزمون های سرولوژیکی بوده و با جدا سازی ویروس و روندهای شناسایی مولکولی تکمیل می گردد. (۱۹، ۲۰)

در حال حاضر آلودگی با ویروس عامل زبان آبی در آفریقای جنوبی و غربی، خاورمیانه، هند، شبه جزیره ایبری، آمریکا، استرالیا و برخی از کشورهای آمریکای جنوبی تشخیص داده شده است. (۶، ۷،۱۴،۲۱) بر همین اساس و با توجه به موارد متعدد گزارشات شیوع بیماری در مناطق مختلف کشور، این تحقیق جهت جداسازی و شناسایی این ویروس انجام گرفت.

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شده که نقاط مختلف ایران از جمله استان های مرکزی و اصفهان به این ویروس آلوده می باشند و در اکثر موارد در بیشتر از ۵۰ درصد نمونه های تهیه شده وجود پادگن علیه زبان آبی محرز گردیده است، که مؤید وجود این ویروس در دامداری های مختلف کشور می باشد. خان بابائی (۱۳۹۰) در بررسی سرولوژیک زبان آبی گوسفندان شهرستان سنندج و با استفاده از روش الایزای رقابتی میزان آلودگی آنها را ۱۹/۳درصد گزارش کرد. (۲) از آنجائی که از ۲۴ سروتیپ این ویروس ۴ سروتیپ آن پاتوژن است، جهت جداسازی ویروس بیماری زا، باید نمونه گیری ها حتماً از دام های دارای علائم بالینی و تب

دار صـورت گیرد. (۱۱،۴) وجود علائم تب و پر خونی در مخاطات و کاهش وزن و سـیانوزه شـدن زبان که از علائم بارز این بیماری می باشـد در اکثر مـوارد در دام هایی که از آنها نمونه گیری صورت گرفته مشـاهده گردیده است.

در ایـن تحقیـق نتایج حاصـل از تزریـق نمونه خون کامـل در ورید جنین های جوجه موجب بروز تغییرات ناشی از رشد ویروس و نهایتاً تلفات گردید، همچنین ضایعات سـلولی ایجاد شده در کشت سلول های Vero و BHK با نتایج سـایر تحقیقات انجام شـده در مورد این ویروس مطابقت دارد. (۲۰،۱۸،۱۴)

در ایـن تحقیـق در مورد نمونـه هایی که آزمایش خنثی سـازی آنها مثبت گزارش گردید، تیتر ویروس $10^{5/63}$ بدسـت آمد که توانسـت تا رقت ۳- ۱۰ پادگـن اختصاصـی زبان آبـی را خنثی نماید. تیتـر بالای ویروس موجب شـد تا بتوان بدون عملیات تغلیظ توسـط اولترا سـانتریفوژ نمونه ویروسـی، تصویر میکروسـکوپ الکترونی از آن تهیه نمود. شـکل ظاهری و ابعاد اجرام ویروسـی مشاهده شده در میکروسـکوپ الکترونی با ویروس عامل بیماری زبان آبی نیز مطابقت دارد. در محاسبه شاخص خنثی سازی ویروس، عدد ۲/۲۴بدست آمد که جهت تأیید ویروس مورد نظر قابل قبول می باشد. (۲۰،۱۴)

در این تحقیق در بررسی بیماریزایی، بعد از تزریق ویروس جدا شده به دام حسـاس، تب و ضایعات تاولی بر روی لثه ها و پرخونی زبان بروز کرد و دانه های سیاه رنگ بر روی آن ظاهر گردید که با تهیه نمونه از آنها و تزریق به تخم مرغ جنین دار و کشـت سلولی حساس Vero علائم رشد ویروس بر روی آنها مشهود بود.

تمام موارد ذکر شـده مؤید وجود ویروس زبان آبی می باشـد. با توجه به گزارشات متعدد تشخیص بیماری زبان آبی و نتایج حاصل از این تحقیق لزوم تدوین برنامه های اجرائی جهت کنترل آن شـدیداً احساس می گردد. از آنجاکه بروز این بیماری ویروسـی وابسـته به جمعیت حشرات ناقل بوده و شـرایط جغرافیائی و آب و هوائی از جمله میزان رطوبت و درجه حرارت مناسـب، به منظور تکثیر ناقلین و نهایتاً انتشـار بیمـاری از اهمیت بالائی برخـوردار اسـت، از این رو مبـارزه جدی با ناقل بیمـاری باید بطور جدی برخورد شـود. در موضوع بررسـی و مراقبت بایسـتی به این موضوع توجه داشـت که عفونت ویروس زبان آبی دو چهره بالینی دارد شـامل، ناآشـکار (inapparent) که در گاو، بز و اکثر نشـخوارکنندگان وحشـی مشاهده می شـود و آشکار که در بخشی از جمعیت گوسفند و بز به صورت کشنده (fatal) بـروز می کند. بنابراین چون اکثر پشـه های ناقل (کولیکوئیدزها) گاو را بـه عنـوان میزبان اصلی خـود ترجیح می‌دهند اصـولاً گاو مخزن و تشـدیدکننده جمعیت ویروس است. از این رو پرواربندی ها بعنوان مناطق پرخطر مطرح می‌باشـند، که بایسـتی در برنامه مراقبت و کنترل بیماری، مد نظر قرار گیرد. ماهیـت خونخـواری کولیکوئیـدز ماده بدین شـکل اسـت که صرفاً در شـب خونخـواری می‌کنـد، از این رو دام را بایسـتی شب ها در آغل های سم پاشی شده، نه در فضای باز نگهداری نمود (زمان ریسـک انتقال). در فصول پرخطر از نظر انتقال عفونت، پس از بارنـدگی و درجه حرارت مناسب جهت ردیابی و پایش، می‌توان از هر گله مشکوک ۴۰ نمونه سـرم تهیه و برای انجام آزمایش الایزای رقابتی به آزمایشگاه فرستاد تا وضعیت بیماری مورد بررسی قرار گیرد.

بـرای پیشـگیری و کنترل بیماری می توان برنامـه ذیل را جهت اجرا پیشنهاد نمود:

۱- کنتـرل جمعیـت ناقلیـن احتمالی بیمـاری، از جمله پشـه ها با هماهنگی سازمان محیط زیست.

۲- اقدامـات قرنطینـه ای و انتقال گوسـفندان به مناطـق مرتفع در دوره‌های انتقال عفونت.

۳- کنترل نقل و انتقال دام در سطح مناطق مرزی.

۴- با دام های خریداری شـده برای مراکز اصلاح نژاد از دامداری های سـطح کشـور، براسـاس آئین نامه بهداشـتی مراکز اصلاح نژاد دام کشور برخورد گردد (سرم چنین دام هائی به آزمایشگاه مورد تأیید سازمان ارسال و درصورت مثبت بودن تست الایزا حذف و یا زنجیره خرید قطع گردد)

شکل ۳- ضایعات پوستی ایجاد شده در گوسفند تحت آزمایش

پاورقی ها

1-Bluetongue
2-Competative ELISA
3-Specific Pathogen Free
4-Inoculation
5-Office International Des Epizooties
(World Organisation for Animal Health)
6-Orbivirus
7-Reoviridae
8-Serotype
9-Culicoides
10-Incubation period
11-Edema
12-Pneumonia
13-Myopathy
14-Contagious ecthyma
15-Screening
16-Dulbeco Minimum Essential Medium
17-Fetal Bovine Serum
18-Cytopathic Effect
19-Serum Neutralization
20-Tissue Culture Infectious Dose
21-Neutralization Index
22- Peste des Petis Ruminants

منابع مورد استفاده

۱- بکایی، س.کارگرموخر، ر. موســوی، م . شــریفی، ل. رامین، ع. ارس خانی، ع (۱۳۸۶) بررســی ســرولوژیک بیماری زبان آبی (Bluetongue) در گله های گوســفند آذربایجان غربی، مجله دامپزشــکی ایران، دوره سوم شماره ۳، صفحه ۸۳-۸۱.

۲- خان بابائی، ه. فکور، ش. خضری، م. محمدیان، ب. رخزاد، ب. (۱۳۹۰) بررسی سرولوژیک بیماری زبان آبی در گوسفندان شهرستان سنندج به روش الیزا، مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره ۵، شماره ۲.

3- Afshar, A., Thomas, F.C., Wright, P.F., (1989) Compression of competitive Elisa, Indirect Elisa and standard AGID tests for detecting blue tongue virus antibodies in cattle and sheep, *Veterinary Record,* 124: 136-141

4- Alexander, R. A., HAG, D.A., (1951) The use of egg attenuated blue tongue in the production of polyvalent vaccine for sheep, A propagation of the virus in sheep, *Journal of Veterinary Research,* 25: 3-15

5- Billinis, C., Koumbati, M., Spyrou, V., Nomikou, K., Mangana, O., Panagiotidis, C. A., Papadopoulos, O., (2001) Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods, *Journal of Virological Methods,* 98: 77-89

6- Cheiron, A., (1997) Isolation and characterization of blue tongue Virus, *Veterinary Research*,53: 17-26

7- Ciavijo, A., Heckert, R.A., Dulac, G.C., Afshar, A., (2000) Isolation and identification of blue tongue virus, *Journal of Virological Methods*, 87: 13-23

8- Breard, E., Hamblin, C., Hammoumi, S., Sailleau, C., Dauphin, G. and Zientara, S. (2004) The epidemiology and diagnosis of blue tongue with particular reference to Corsica, *Research in Veterinary Science*, 77: 1–8.

9- Darpel, K.E., Batten, C. A., Veronesi, E., Shaw, A. E., Anthony, S., Bachanek-Bankowska, K., Kgosana, L., bin-Tarif, A., Carpenter, S., Müller-Doblies, U., Takamatsu, H., Mellor, P. S., Mertens, P., Oura, C., (2007) Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Veterinary Record* 161(8): 253-261

10- David, E., Swyne, E., Chairman, J., (1998) *Labolatory manual for the isolation & characterization of avian patogens*, Forth edition by the American accesories of avian pathologists.

11- Davies, F.G., Mungai, J.N., Pini, A., (1992) A new bluetongue virus serotype isolated in Kenya, *Veterinary Microbiology*, 31(1): 25-32

12- Erasmus, B.J., (1975) Blue tongue in sheep and goats, *Australian Veterinary Journal,* 51: 165-170

13- Ertürk, A., Tatar, N., Kabakli, O., Incoglu, S.,Cizmeci, G.S. and Barut, F. M. (2004) The current situation of bluetongue in Turkey, *Veteterinaria Italiana*, 40(3):137-140.

14- FAO (2002) Food and Agricaltural of the United Nations

15- Fenner F.J. (1992) *Veterinary Virology*, The John Curtin School of Medical Research

16-Gard, P.S., Kirkland, P. D.,(1993) *Blue tongue virology and serology in*: Australian standard diagnostic techniques for animal diseases, Corner L.A.S Barguest, T.J. ends. CSIRO information servies

17- Hawkeys, R.A., Kirkland, P.D., Sanders, D.A., Zhang, F.L.Z., (2000) Laboratory and field studies of an antigen capture Elisa for Blue Tongue virus, *Journal of Virological Methods*, 85: 137-179

18- Jochin, M. M., Chow, T. I., (1969) Immunodiffusion of bluetongue virus, *American Journal of Veterinary Research*, 30 (1) 33-41

19- Koumbati, M., Mangana, O., Nomikou, K., Mellor, P.S., Papadopoulos, O., (1999) Duration of bluetongue viraemia and se-

rological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats, *Veterinary Microbiology*, 64 (4): 277-285

20- Lee, V.H., Causey, O.R., Dorothy, L., Moore, L., (1974) Blue tongue and related viruses in Ibadan, Nigeria: Isolation and preliminary identification of viruses, *American Journal of Veterinary Research,* 35 (8): 1105- 1108

21- OIE (Office International Des Epizooties), (2004) *Isolation and characterization of blue tongue,* Third International Symposium on Blue tongue, 195-210

22- OIE (Office International Des Epizooties), (2005) *Terrestrial Manual Blue tongue,* Chapter 2.1.9.

23- Reddington, J.J., Reddington, G.M., MacLachlan, N.J., (1991) A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus, *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation,* 3: 144-147.

24- Sreenivasulu, D., Rao, M., Gard, G.P., (1999) Isolation of bluetongue virus serotype 2 from native sheep in India, *Veterinary Record,* 144 (16): 452-453

24-Wittman, E., Baylis, M., (2000) Climate change: effects on Culicoides-transmitted viruses and implications for the UK, The *Veterinary Journal,* 160: 107-117