

# بررسی آلودگی به ویروس IHN در مزارع پرورش ماهی قزل آلابی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دو استان تهران و چهارمحال و بختیاری با استفاده از تکنیک آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم

روزبه فلاحی<sup>۱</sup> مهدی سلطانی<sup>۲\*</sup> سیدجلیل ذریه زهرا<sup>۳</sup> فرید همت زاده<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۹ اسفندماه ۱۳۸۲  
پذیرش نهایی: ۵ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

## Serological Diagnosis of Infectious Haematopoietic Necrosis Disease (IHN) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) using Indirect Fluorescent Antibody Test

Fallahi, R.<sup>1</sup>, Soltani, M.<sup>2</sup>, Zorriehzahra, M.E.J.<sup>3</sup>, Hemmatzadeh, F.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unit of Aquatic Animal Health and Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj- Iran. <sup>2</sup>Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. <sup>3</sup>Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Iranian Fisheries Research Institute, Tehran- Iran. <sup>4</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

**Objective:** Serological diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus (IHN) in tissues of kidney, spleen and liver of rainbow trout (*O. mykiss*) fry.

**Design:** Cross-sectional study.

**Animals:** Ninety nine samples consisting of smears from kidney, spleen and liver were obtained from rainbow trout.

**Procedure:** Kidney, spleen and liver from rainbow trout (*O. mykiss*) fry less than 3 g body weight obtained from some farmed rainbow trout of Tehran and Char mahal - va-Bakhtiari provinces. Indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) was undertaken using both polyclonal and monoclonal antibodies to IHN to identify the IHN antigens in the tissue samples.

**Results:** Only eleven samples from the region of Char mahal - va - Bakhtiari were positive for IHN using both monoclonal and polyclonal antibodies to IHN.

**Conclusion:** Because of economic losses due to disease caused by IHN in farmed rainbow trout, it is necessary to do a comprehensive screening test, virus isolation and evaluation of the pathogenicity of recovered virus.

*J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,1:19-22,2006.*

**Keywords:** IHN, IFAT, rainbow trout.

**Corresponding author's email:** msoltani@ut.ac.ir

هدف: تشخیص آنتی ژنهای ویروس IHN در نمونه‌های بافتی برخی از کارگاههای تکثیر و پرورش قزل آلابی رنگین کمان ایران.

طرح: نمونه برداری به صورت تصادفی از موارد مشکوک به بیماری.

حیوانات: بچه ماهیان قزل آلابی رنگین کمان پرورشی.

روش: تهیه گسترش از تعداد ۹۹ نمونه بافت‌های خون ساز (کلیه و طحال) و کبد بچه ماهیان زیر ۳ گرم از کارگاههای تکثیر و پرورش واقع در استانهای تهران و چهارمحال و بختیاری و ثابت نمودن گسترش‌ها توسط استون سرد و سپس انجام آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم و مطالعه گسترش‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانت با بزرگنمایی ۲۰۰X، ۴۰۰X و ۱۰۰۰X.

نتایج: از مجموع ۹۹ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۱۱ نمونه مثبت تشخیص داده شد که متعلق به کارگاههای استان چهارمحال و بختیاری بودند.

نتیجه‌گیری: با عنایت به تشخیص آنتی ژنهای ویروس IHN در برخی نمونه‌های مورد مطالعه و با توجه به خسارات اقتصادی قابل توجه این بیماری انجام بررسیهای غربالگری و نیز انجام مطالعات دقیقتر مانند جداسازی و مطالعه پاتوژنیسیته ویروس جدا شده امری بدیهی می‌باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۱، ۲۲-۱۹.

واژه‌های کلیدی: نکروز عفونی بافت‌های خون ساز، آنتی بادی درخشان، قزل آلابی رنگین کمان.

عامل بیماری نکروز عفونی بافت‌های خون ساز (IHN)، نوعی رابدو ویروس است که خسارات قابل توجهی در ماهیان آزاد اقیانوس آرام (همه گونه‌های *Oncorhynchus*)، ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) و قزل آلابی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ایجاد می‌کند (۱۸، ۱۷، ۱۴، ۱۲). بیماری که اولین بار در سال ۱۹۳۵ در ماهی آزاد قرمز (*O. nerka*) و از سواحل غربی آمریکای شمالی گزارش گردید امروزه به تعدادی از کشورهای اروپایی و آسیایی سرایت و موجب تلفات قابل توجه در مزارع آزاد ماهیان می‌شود (۱۸، ۱۷، ۱۴، ۱۲).

در سال ۱۹۶۷، IHN در ماهیان آزاد قرمز در بریتیش کلمبیا و نیز برای اولین بار در قزل آلابی رنگین کمان گزارش شد. چند سال بعد ویروس عامل

۱) مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی حصارک، کرج - ایران.

۲) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران - ایران.

۴) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

\* نویسنده مسؤل: msoltani@ut.ac.ir



نموده، گسترشها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و سپس برای چهار مرتبه آنها را با محلول PBS-Tween (با اضافه نمودن Tween 80 به PBS به میزان ۰/۰۵ درصد تهیه می‌گردید). شستشوداده، سپس مقدار ۱۱۰۰ μL از آنتی بادی پلوکلونال ضد IHN<sub>V</sub> تهیه شده در خرگوش و یا آنتی بادی مونوکلونال ضد IHN<sub>V</sub> (Arhus, Denmark) رقیق شده (به نسبت ۱/۲۰ با PBS-Tween) اضافه گردید. آنگاه گسترشها را به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و بعد از چهار مرتبه شستشو با محلول PBS-Tween، مقدار ۱۰۰ μL کونژوگه رقیق شده (به نسبت ۱/۲۰ با محلول PBS) حاوی آنتی ایمونوگلوبولین ضد خرگوش (IgG خوک) و یا آنتی ایمونوگلوبولین ضد موش (IgG خرگوشی) (FITC, Dako, Denmark) به آنها اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و چهار مرتبه شستشو با PBS-Tween و آبیگری از گسترشها با عمل مونته کردن با استفاده از بافر گلیسرول آلکالین دار (۰/۱۶g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ۰/۷۲۹g NaHCO<sub>3</sub>، ۰/۹۰ml گلیسرول pH=۹) انجام شد. مطالعه گسترشها پس از قرار دادن لامل بر روی آنها با میکروسکوپ فلورسانت (Olympus B×50) و بزرگنمایی ۲۰۰×، و یا ۱۰۰۰× انجام شد. نتایج حاصله براساس توصیه LaPatra (1989) قرائت و ضمناً نمونه‌های کنترل منفی (بافت‌های ماهیان سالم) و مثبت گسترشهای آماده ارسالی از مؤسسه تحقیقات شیلاتی روسیه، (ARRIFF) به روش بیان شده در مورد آزمایش IFAT در نظر گرفته شد.

### نتایج

**نتایج مشاهدات بالینی:** از نظر علائم بالینی بچه ماهیان بیمار یا در حال مرگ که اکثراً در کنار حوضچه‌ها بدون حرکت مشاهده می‌شدند دارای علائمی از قبیل بی حالی، تیرگی رنگ بدن، تورم شکم، اگزوفتالمی و لاغری بودند. تلفات در برخی کارگاههای مورد نمونه برداری، قابل توجه و عمده تلفات نیز در نوزادان زیر گرم بود.

**نتایج سرولوژی (IFAT):** از مجموع ۹۹ نمونه گسترشهای اثر انگشتی از کلیه، طحال و کبد بچه ماهیان زیر ۳ گرم که از هر کدام دو گسترش برای جستجوی آنتی ژن ویروسی IHN با استفاده از آنتی بادیهای پلی کلونال و مونوکلونال تهیه و بعد از طی مراحل آماده سازی، زیر میکروسکوپ فلورسانت مورد بررسی قرار گرفتند ۱۱ مورد مثبت در گسترشهای تهیه شده از کلیه (۸ مورد) و طحال (۳ مورد) بچه ماهیان ۲ کارگاه در استان چهارمحال و بختیاری مشاهده گردید. تمام موارد مثبت با هر دو نوع آنتی بادی پلی کلونال و مونوکلونال واکنش داده بودند (تصاویر او ۲). در سایر موارد نتایج حاصله منفی بود.

### بحث

استفاده از روش ایمونوفلورسانس در تحقیقات ویروس شناسی ماهیان از سال ۱۹۷۲ متداول گشته و بطور گسترده‌ای جهت تشخیص و شناسایی

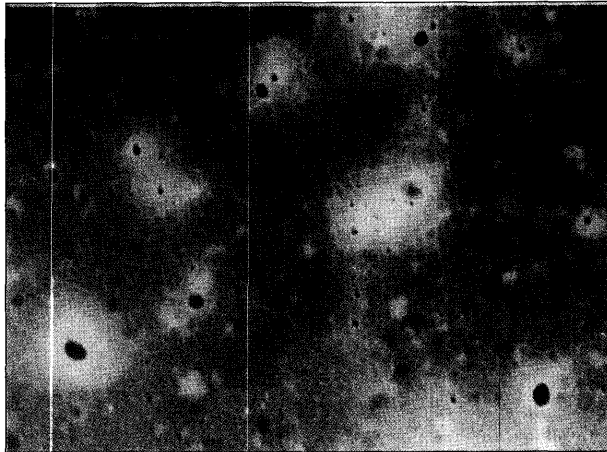
در کشورهای تایوان، کره، فرانسه، بلژیک و اسلونی گزارشاتی مبنی بر جداسازی ویروس IHN طی سالهای ۱۹۸۵ تا ۲۰۰۲ ارائه گردیده است. عامل بیماری IHN به هر دو روش افقی و عمودی منتقل می‌گردد. بنابراین محدوده جغرافیایی این بیماری گسترده می‌باشد. مهاجرت ماهیان و انتقال تخم و ماهیان آلوده باعث گسترش بیماری می‌گردد. برای جلوگیری از انتقال بیماری تدابیر خاصی در کشورهای مختلف صورت می‌گیرد که از آن جمله صدور گواهی سلامت ماهیان برای صادرات و واردات، الزامی می‌باشد.

علاوه بر همه گیری بیماری، گاهی موارد شیوع انفرادی نیز در برخی مناطق از جمله ژاپن دیده می‌شود. اگر چه توجه به جنبه‌های اپیدمیولوژی بیماری از جمله سن ابتلاء، درجه حرارت آب، میزان تلفات و بعضاً علائم بالینی مانند تیرگی پوست و اگزوفتالمی می‌تواند مارا در راه تشخیص بیماری یاری نماید اما تشخیص صحیح بیماری مستلزم کشت و جداسازی ویروس و یا بکارگیری روشهای سرولوژی و مولکولی حساس می‌باشد. از جمله روشهای سرولوژی توصیه شده توسط O.I.E (2000) استفاده از تکنیک آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم است. بررسی وضعیت این بیماری در مزارع قزل آلاهی ایران نشان می‌دهد که برخی مولدین به نوعی ویروس مشابه عامل IHN آلوده هستند (۸). بعلاوه بررسی سرولوژی به روش الیزا نیز مؤید مثبت بودن تیتراژ سرمی برخی مولدین قزل آلاست (۸). همچنین قبل از این در مطالعه‌ای توسط اخلاقی در سال ۱۳۷۹ و با استفاده از روش الیزا به وجود آنتی ژن ویروسی IHN در برخی مزارع قزل آلا در دو استان کهگیلویه و بویر احمد و فارس پی برده شد. لذا با توجه به موارد جداسازی ویروس و تشخیص‌های سرولوژی (تیتراژ آنتی بادی بالا و تعیین آنتی ژن هادر بافت‌ها)، مطالعه مذکور به منظور بررسی میزان آلودگی برخی مزارع با تلفات بالا و مشکوک به بیماری IHN انجام گرفته است.

### مواد و روش کار

**نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها:** در فاصله زمانی مهرماه ۱۳۷۹ لغایت دی ۱۳۸۱ از تعداد ۹۹ نمونه شامل کلیه (۴۰ نمونه)، طحال (۳۵ نمونه) و کبد (۲۴ نمونه) بچه ماهیان زیر ۳ گرم که از ۶ کارگاه در استان تهران (۲۲ نمونه) و ۴ کارگاه در استان چهارمحال و بختیاری (۶۷ نمونه)، از هر نمونه دو گسترش بر روی لام شیشه‌ای تهیه گردید. گسترشها به روش اثر انگشتی (imprinting) تهیه و بعد از خشک شدن در معرض هوا بوسیله استون سرد ثابت شده و بعد از ثبت کامل مشخصات و بسته بندی در ورقه‌های آلومینیومی در شرایط ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش IFAT در فریزر ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

**آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم (IFAT):** انجام این آزمایش با استفاده از آنتی بادیهای پلی کلونال و مونوکلونال ضد IHN<sub>V</sub> و براساس روش بیان شده توسط O.I.E (۲۰۰۰) صورت گرفت. ابتدا مقدار ۲۰۰ μL از بافر بلوکه کننده (با اضافه نمودن آلبومین سرم گاوی به میزان درصد به محلول PBS-Tween آماده می‌گردید) به هر گسترش اضافه



تصویر ۲- واکنش منفی در IFAT (نمونه: کنترل، آنتی بادی مورد استفاده: پلی کلونال بر علیه IHN، بزرگنمایی: ۲۰۰).



تصویر ۱- واکنش مثبت در IFAT (نمونه: کلیه بچه ماهیان زیر ۳ گرم از کارگاه ۱ در استان چهارمحال و بختیاری، آنتی بادی مورد استفاده: مونوکلونال بر علیه IHN، بزرگنمایی: ۴۰۰).

روش سنجش پلاک برابر اما به زمان کمتری نیاز دارد و به همین دلیل امروزه بعنوان یکی از روشهای تشخیصی حساس، سریع و نسبتاً ارزان توصیه شده توسط O.I.E می باشد (۹،۱۱). به هر حال با توجه به وارداتی بودن برخی مواد مورد نیاز انجام آن فعلاگران می باشد.

در این مطالعه که با هدف ردیابی آنتی ژنهای ویروسی IHN در برخی کارگاههای قزل آلائی رنگین کمال مشکوک به بیماری بویژه در مراحل نوزادی و با تلفات قابل توجه صورت گرفته است، با بکارگیری این روش نشان داده شد که برخی کارگاههای پرورش قزل آلائی کشور به ویروس عامل IHN آلوده هستند به طوری که از مجموع ۹۹ نمونه گسترشهای اثر انگشتی از کلیه، طحال و کبد بچه ماهیان زیر ۳ گرم که از هر کدام دوگسترش برای جستجوی آنتی ژن ویروسی IHN با استفاده از آنتی بادهای پلی کلونال و مونوکلونال تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند ۱۱ مورد مثبت در گسترشهای تهیه شده از کلیه (۸ مورد) و طحال (۳ مورد) بچه ماهیان ۲ کارگاه در استان چهارمحال و بختیاری مشاهده گردید. لذا استفاده از این روش بویژه با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال و مشاهده موارد مثبت، ضرورت توجه جدی به بررسیها و مطالعات بیشتر برای اتخاذ تدابیر پیشگیری را دو چندان می نماید. لذا با عنایت به نتایج مطالعات قبلی مبنی بر جداسازی نوعی رابدو ویروس شبه IHN (فلاحی و همکاران در سال ۲۰۰۳) و نیز شناسایی آنتی ژنهای ویروس IHN در این مطالعه و همچنین مطالعه انجام شده توسط اخلاقی در سال ۱۳۷۹ انجام بررسیهای غربالگری مراکز تکثیر کشور جهت بررسی عوامل ویروسی ضروری است. زیرا از دیدگاه اپیدمیولوژی، بیماری فوق به هر دو روش افقی و عمودی قابل انتقال بوده و لذا مولدین حامل می توانند خطر بالقوه و تهدید کننده ای باشند. از طرف دیگر در حال حاضر حمل و نقل تخمهای چشم زده، لاروها و نوزادان این ماهی در بین مزارع کشاورزی رایج و متداول است و می تواند موجب گسترش بیماری به سایر مزارع غیر آلوده شود. در خاتمه قابل ذکر است که بررسی علت و یا علل تلفات نوزادان قزل آلا (سندرم تلفات لاروهای قزل آلا) در مزارع ایران همانند سایر مناطق درگیر در

ویروس IHN و سایر عوامل ویروسی استفاده می شود. از آنجایی که تاکنون روش پیشگیری (واکسن تجاری کاملاً مؤثر) و کنترلی (روشهای درمانی) برای بیماری IHN وجود ندارد، تشخیص سریع همه گیریهای IHN جهت کنترل و ریشه کنی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۸، ۱۷، ۱۳، ۹، ۵، ۷). در میان روشهای تشخیصی برای IHN، استفاده از کشت سلول و مشاهده ضایعات سلولی به حداقل ۲۲-۴۸ ساعت پس از تلقیح نمونه نیاز دارد. البته تشخیص قطعی با انجام مطالعات میکروسکوپ الکترونی همراه با انجام یکی از آزمایشهای سرمی با استفاده از آنتی بادهای اختصاصی الزامی می باشد.

در میان روشهای سرمی، آزمایش خنثی سازی سرم (Serum Neutralization Test) به ۱۰-۷ روز زمان احتیاج دارد در حالی که با انجام آزمایش آنتی بادی درخشان می توان در مدت زمان بسیار کوتاهی نسبت به تشخیص بیماری اقدام نمود. در روش غیر مستقیم آن، از آنتی بادی اولیه غیر نشاندار استفاده می گردد که با استفاده از فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) کوئوژوگه شده با یک آنتی بادی ثانویه تشخیص صورت می گیرد (۱۸، ۱۷، ۹). Leong و همکاران در سال ۱۹۸۳ اولین گزارش مبنی بر تشخیص ویروس IHN را با آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم ارائه و بیان می دارند که این روش سریع، اختصاصی و حساس می باشد (۱۸، ۱۴).

LaPatra و همکاران در سال ۱۹۸۹ با استفاده از این روش نشان دادند که تمام سویه های ویروس عامل IHN که از از نقطه نظر الکترو فوری با یکدیگر اختلافاتی داشتند با استفاده از این روش و بکارگیری هر دو نوع آنتی بادی پلی کلونال و مونوکلونال قابل تشخیص است. سویه های ویروسی مورد مطالعه آنها از مراحل مختلف سنی آزاد ماهیان مناطق مختلف جغرافیایی دنیا بدست آمده بود. بنابراین با استفاده از این روش می توان نسبت به شناسایی آنتی ژنهای ویروس عامل IHN در گسترشهای بدست آمده از بافت ها، کشت سلولی، ترشحات تناسلی و گسترشهای خونی در نوزادان و حاملین به ظاهر سالم اقدام نمود (۹). از نقطه نظر میزان حساسیت نیز این روش با



## References

۱. اخلاقی، م. (۱۳۷۹): مطالعه ایمنولوژیکی بیماریهای ویروسی مشکوک به نکروز عفونی بافت‌های خون ساز و لوزالمعده‌ای قزل آلا. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، دوره ۱، شماره ۲، صفحه: ۹۵-۸۵.
۲. سلطانی، م. (۱۳۸۰): بیماریهای آزاد ماهیان، انتشارات دانشگاه تهران.
۳. سلطانی، م.، رستمی، م. (۱۳۷۶): عفونت ناشی از ارگانیزم‌های شبیه سایتوفاکا/فلکسی باکتر در مزارع پرورش قزل آلا رنگین کمان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۲، شماره ۳، صفحه: ۲۳-۱۳.
۴. سلطانی، م.، رستمی، م.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، میرزرگر، س. س.، فلاحی، ر. (۱۳۸۰): مطالعه سندرم تلفات بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان در استانهای تهران و لرستان. پژوهش و سازندگی، شماره ۵۳، صفحه: ۵-۲.
5. Arnzen, J.M., Ristow S. S., Hesson, C.P. and Lientz, J. (1991): Rapid fluorescent antibody tests for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to the nucleoprotein and glycoprotein. *J. Aqua. Anim. Health.* 3: 109-113.
6. Chou, H. Y., Fukuda, H. and Sano, T. (1993): Application of a monoclonal antibody against viral nucleoprotein to an aetiological study of infectious hematopoietic necrosis. *Fish Dis.* 16: 149-153.
7. Danton, M., Ristow, S.S., Hattenberger-Baudouy, A.M. and De-Kinkelin, P. (1994): Typing of French isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) with monoclonal antibodies using indirect immunofluorescence. *Dis. Aqua. Org.* 18: 223-226.
8. Fallahi, R., Soltani, M., Kargar, R., Zorriehzadra, M.E.J., Shchelkunov, I., Hemmatzadeh, F. and Nouri, A. (2003): Isolation and identification of the infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) - like agent from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Archives of Razi Institute.* 56 : 37-45.
9. Lapatra, S.E., Roberti, K.A., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1989): Fluorescent antibody tests for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis, *J. of Aqua. Anim. Health.* 1: 29-36.
10. Noga, E.J. (2000): Fish disease-diagnosis and treatment. Iowa State University Press.
11. O.I.E (2000): Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases.
12. Plumb, T.A. (1999): Trout and Salmon Viruses. In: Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. Iowa State University Press, PP: 103-110.
- 13- Ristow, S.S. and Arnzen, J.M. (1991): Monoclonal

دنیا نیازمند مطالعات همه جانبه با علل عفونی مانند عوامل باکتریایی و ویروسی و غیر عفونی مانند عوامل محیطی، تغذیه‌ای و ژنتیکی می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و مؤسسه تحقیقات شیلات ایران انجام گرفته است که بدین وسیله از مسئولین محترم تشکر و قدردانی می‌گردد.

antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Dis. Aqua. Org.* 11: 105-115.

14. Roberts, R.J. (2001): Fish Pathology. Third edition. W.B. Saunders.
15. Soltani, M., Tarahomi, M. (2002): Pathogenicity of *Yersinia ruckeri*-like isolates recovered from farmed rainbow trout in Tehran province. In: second convention of Iranian veterinary clinicians, Book of Abstracts, P. 37.
16. Winton, J.R., Arakawa, C.K., Lannan, C.N. and fryer, J.L. (1988): Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aqua. Org.* 4: 199-204.
17. Wolf, K. (1988): Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press.
18. Woo, P.T.K., Bruno D.W. (1999): Fish Diseases and Disorders Vol3. Viral, Barterial and Fungal Infections, CABI Publishing.