

ارزیابی حساسیت و ویژگی آزمایش نواری BHBA شیر در مقایسه با آزمایش خون جهت تشخیص کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

بابک باستانی^۱، علیرضا شقایق^{۲*}، فرهاد موسی خانی^۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، کرج، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، کرج، ایران

دوره چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۲

صفحات ۲۳۵-۲۲۷

*نویسنده مسئول: alireza.shaghayegh@kiauo.ac.ir

چکیده

کتوز یکی از بیماری‌های متابولیک رایج است که در گاوهای شیری و به خصوص در ابتدای دوره‌ی شیردهی مشاهده می‌شود. شاخصه اصلی کتوز افزایش میزان کتون بادی‌ها در خون، ادرار و شیر است. در گاو شیری کتوز تحت بالینی به افزایش میزان کتون بادی‌ها در سیستم گردش خون بدون بروز علائم بالینی اتلاق می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر، به بررسی تست نواری BHBA (strip) شیراز نظر حساسیت و ویژگی و همچنین مزایا و معایب این تست در مقایسه با تست شاخص BHBA خون (gold standard) پرداخته شد. در این مطالعه ۳۲ راس گاو شیری چند شکم زائیده در یک گله‌ی ۲۰۰۰ راسی که به روش ترکیبی (TMR) تغذیه می‌شدند و در بازه‌ی زمانی ۷-۲۱ روز پس از زایش بودند از نظر وقوع کتوز تحت بالینی مورد بررسی قرار گرفتند. نقطه‌ی برش برای تست BHBA خون $1400 \mu\text{mol/lit}$ و برای تست BHBA شیر $100 \mu\text{mol/lit}$ در نظر گرفته شد. حساسیت و ویژگی تست نواری BHBA شیر حدود ۴۲/۸٪ و ۱۰۰٪ به دست آمد، kappa بدست آمده در این مطالعه برابر با ۰/۶۸ و عدد p معادل ۰/۰۰۰۵ ($p > 0/05$) می‌باشد. به علت حساسیت پایین و همچنین رخداد بالای موارد منفی کاذب (۵۷/۱۴٪)، در مطالعه‌ی حاضر تست مورد بررسی را نمی‌توان به عنوان تستی مناسب به جهت ردیابی کتوز تحت بالینی در سطح گله معرفی نمود و آن را تنها جهت ردیابی کتوز تحت بالینی به صورت انفرادی توصیه می‌نماییم.

واژه‌های کلیدی: کتوز تحت بالینی، گاو شیری، تست مزرعه‌ای، BHBA شیر، BHBA خون



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 4(4)227-235, 2013

Evaluation of sensitivity and specialty of milk BHBA strip in comparison with blood BHBA in purpose of detection of subclinical ketosis in dairy herds

Bastani, B¹., Shaghayegh, A.*², Moosakhani, F.³

1- Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic azad university, Karaj, Iran

2-Department of clinical sciences, Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic azad university, Karaj, Iran

3-Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic azad university, Karaj, Iran

* *Corresponding author:* alireza.shaghayegh@kiaou.ac.ir

Abstract

Ketosis is a common metabolic disorder frequently observed in dairy cows during early lactation period, it is characterized by increased levels of ketone bodies in blood, urine and milk. Sub clinical ketosis (SCK) in dairy cattle is an excess level in circulating ketone bodies in the absence of clinical signs of ketosis. In this study, cow side strip test is studied for sensitivity, specialty, advantages and disadvantages in relationship with serum BHBA (Gold standard test). 32 multiparus cows were used in this research. All diets were based on TMR. All cows were sampled during 7-21 DIM. Cows with serum BHBA concentration over 1400 μ mol/lit and milk BHBA concentration over $x > 100\mu$ mol/lit considered to suffer from subclinical ketosis. In this cut point, sensitivity and specialty of milk BHBA were 42.2% and 100%. kappa and p-value were 0.68 and 0.0005 ($x < 0.05$). according to the information above we can not denote this test for detection of subclinical ketosis in dairy herds but we can advise this cow side test as an individual test.

Key words: subclinical ketosis, dairy cow, cow side tests, milk BHBA, serum BHBA

مقدمه

کتوز یکی از مهم ترین بیماری های متابولیک گاوشیری در ابتدای دوره ی شیردهی می باشد. (۲۶و۶) ویژگی اصلی این بیماری حضور کتون بادی ها در خون، ادرار و شیر است. تئوری های بسیاری درباره ی پاتوژنز بیوشیمیایی و هورمونال کتوز و عوامل مستعد کننده ی آن وجود دارد اما به طور کلی پذیرفته شده است که کتوز در نشخوارکنندگان، به علت تفاوت در میزان دریافت منابع انرژی (مانند گلوکز) با میزان مصرف این منابع رخ می دهد. این کتون بادی ها شامل بتا هیدروکسی بوتیرات و استوآستات و استون می باشند. مهم ترین کتون بادی در حال گردش در سیستم گردش خون نشخوار کنندگان BHBA است (۱۸) و همبستگی قوی بین میزان آن با مقادیر استوآستات در خون وجود دارد (۲۱،۳،۲). کتون بادی ها به راحتی می توانند از جداری سلول های بدن عبور نمایند و به عنوان منبع انرژی در شرایط کمبود مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (۲۴). افزایش مقدار BHBA در خون بیانگر تحریک لیپولیز و یا جذب بیش از اندازه ی بوتیرات از جیره ی غذایی دام (سیلوی گندیده) است (۱،۱۱،۲۶).

کتوز تحت بالینی به افزایش میزان کتون بادی ها در خون بدون بروز علائم بالینی کتوز اطلاق می شود. اهمیت کتوز تحت بالینی به علت کاهش تولید شیر، کاهش میزان باروری، افزایش خطر رخداد جابجایی شیردان، ضعف سیستم ایمنی و افزایش بیماری های حوالی زایمان و... می باشد (۱۰ و ۲۲). میزان وقوع کتوز تحت بالینی در گله های گاو شیری می تواند در حدود ۴۱-۷٪ باشد (۱۹). به علت ضررهای اقتصادی شدید، تشخیص کتوز تحت بالینی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از این رو تست های مختلفی برای ردیابی کتوز تحت بالینی وجود دارد که هر یک مزایا و معایب و کاربرد ویژه خود را دارند. این تست ها شامل تست های آزمایشگاهی و تست های مزرعه ای می باشند (۱۷). تست های آزمایشگاهی شامل ۱- کاتالیز آنزیمی ۲- اسپکتروفتومتری

BHBA ۳- فلورومتري BHBA ۴- اسپکتروفتومتری اتمی و کروماتوگرافی گازی ۵- اندازه گیری نسبت چربی بر پروتئین شیر (۷) ۶- بررسی اسیدهای چرب بلند زنجیر در شیر می باشند. تست های مزرعه ای نیز شامل: حسگر زیستی (biosensor) (۱۲)، تست پینک و نوارکتون بادی ها در شیر یا ادرار می باشند. (۲۵)

در مطالعه ی حاضر با توجه به سهولت انجام تست نواری مزرعه ای BHBA شیر بر آن شديم تا به بررسی تست نواری BHBA شیرو مقایسه آن با BHBA پلاسمای خون گاوهای در معرض خطر ابتلا به کتوز تحت بالینی در ۲۱-۷ روز پس از زایش بپردازیم و در ضمن مزیت ها و معایب این تست و همبستگی بین این ۲ تست و حساسیت و ویژگی تست نواری BHBA شیر و موارد کاربردی استفاده ی آن را مشخص سازیم (۲۵، ۱۴، ۹، ۵).

مواد و روش کار

جامعه ی آماری، روش نمونه گیری و حجم نمونه: در یک گاوداری شیری ۲۰۰۰ راسی که تمامی دام های آن به روش ترکیبی تغذیه می شدند، از تعداد ۳۲ راس گاو که در بازه زمانی ۲۱-۷ روز پس از زایش بودند به وسیله ی ونوجکت از ورید دمی مقدار CC۵ خون اخذ شده و در لوله های حاوی فعال کننده ی انعقاد، در مجاورت یخ و با رعایت اصول عدم انجماد به دلیل بر هم خوردن میزان BHBA سرم، در عرض کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل می شود. بر اساس دستور العمل تست نواری BHBA شیر، همزمان از همان تعداد دام نمونه ی شیر به صورت کامپوزیت اخذ شد.

روش اندازه گیری BHBA شیر: بلافاصله نوار اندازه گیری BHBA شیر (BHB *porta* انگلستان) را در نمونه ی شیر اخذ شده غوطه ور ساخته و سپس شیر مازاد بر روی نوار تکان داده شد و پس از یک دقیقه نوار بر اساس تغییر رنگ و مقایسه ی آن با چارت رنگی بر اساس واحد میکرومول بر لیتر قرائت شد. در کیت مورد آزمایش آنزیمی بر روی

رنگ بنفش بیشتر باشد میزان BHBA شیر نیز بالاتر است. بر اساس دستور العمل نوار، تفسیر نتایج به جدول ۱ انجام و ثبت می‌شود.

هر نوار تعبیه شده است که BHBA شیر را به استون تبدیل می‌کند و این واکنش خود باعث آزاد شدن یون‌های هیدروژن می‌شوند که این یون‌ها *tetrazolium blue* را به فرمالین تبدیل می‌کند که رنگی بنفش دارد. هر قدر که میزان

جدول ۱- تفسیر موارد مثبت و یا منفی کتوز تحت بالینی بر مبنای کیت نواری BHBA شیر

| وضعیت دام | میزان BHBA شیر (میکرومول بر لیتر) |
|-------------------|-----------------------------------|
| طبیعی (-) | ۰-۹۹ |
| مشکوک (+/-) | ۱۰۰-۱۹۹ |
| مثبت (+) | ۲۰۰-۴۹۹ |
| بسیار مثبت (+)(+) | $x > 500$ |

می‌شود و بر اساس منابع معتبر نقطه‌ی برش بالای BHBA $1400 \mu \text{mol/lit}$ به عنوان موارد مثبت کتوز ثبت و به عنوان موارد کتوز تحت بالینی در جدول ۲- اعلام خواهند شد

روش اندازه گیری BHBA خون: میزان BHBA نمونه‌های سرم اخذ شده با استفاده از کیت رندوکس (Randox) انگلستان و به روش اسپکتروفتومتری با دستگاه Auto Analyzer BT ۱۲۰۰ و بر اساس میکرومول بر لیتر ثبت

جدول ۲- تفسیر نتایج موارد مثبت و منفی کتوز بر مبنای BHBA خون

| وضعیت دام | میزان BHBA سرم (میکرومول بر لیتر) |
|----------------|-----------------------------------|
| سالم | $x < 1000$ |
| تحت بالینی | $x > 1400$ |
| بالینی و بیمار | $x > 2500$ |

نتایج

در جدول شماره ۳ تعداد و درصد دام‌های مبتلا با توجه به بازه‌های تعریف شده در تست نواری BHBA شیر ارائه شده است و با توجه به اطلاعات موجود در این جدول بر اساس دستورالعمل نوار BHBA شیر، ۲۸ راس از گاوهای مورد بررسی در بازه‌ی $0-99 \mu \text{mol/lit}$ (۸۷/۵٪) موارد منفی و ۲ راس گاو مشکوک در بازه‌ی $100-99 \mu \text{mol/lit}$ (۶/۲٪)

در تمامی موارد، هم بستگی تست‌های BHBA شیر با تست BHBA خون ارزیابی شد و همچنین مزایا و معایب این روش اعلام گردید و آنالیز آماری کاملی بر روی نتایج به دست آمده توسط نرم افزار SPSS به عمل آمد و با منابع معتبر مقایسه شد.

ارزیابی حساسیت و ویژگی آزمایش نواری BHBA شیر در مقایسه با آزمایش BHBA خون جهت تشخیص کتوز ...

و BHBA خون آمده است و عنوان می‌دارد که سطح معنی داری بین این دو تست ($P=0/0005$) و ضریب توافق ($kappa=0/68$) به دست آمده است. طبق تعریف آماری، $kappa$ بیانگر ضریب توافق تست BHBA شیر و BHBA خون در مورد تشخیص کتوز تحت بالینی است که طبق قوانین آماری اگر این مقدار کمتر از $0/40$ باشد ضریب توافق ضعیف و اگر بین $0/40-0/60$ باشد ضریب توافق متوسط و اگر بین $0/60-0/80$ باشد ضریب توافق خوب و بالای $0/80$ ضریب توافق عالی در نظر گرفته می‌شود. $Kappa$ به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر در حد خوب تلقی می‌شود و می‌توان نتیجه گرفت که تست نواری شیر برای تشخیص کتوز تحت بالینی قابل اعتماد است. از طرف دیگر P -value در جدول شماره ۶ برابر با $0/0005$ می‌باشد که بیانگر این مهم می‌باشد که تست BHBA شیر توانسته موارد مثبت و منفی را به درستی از هم تشخیص دهد و احتمال تصادفی بودن نتایج وجود ندارد.

موارد مشکوک و ۲ راس گاو در بازه $200 \mu \text{ mol/lit} <$ به عنوان موارد مثبت در نظر گرفته می‌شوند. با توجه به مقالات و تحقیقات دیگر محققین مبنی بر در نظر گرفتن نقطه‌ی برش $100 \mu \text{ mol/lit}$ ، در این مطالعه مبادرت به مثبت در نظر گرفتن موارد مشکوک نمودیم و بدین ترتیب رخداد کتوز تحت بالینی توسط تست نواری BHBA شیر در حدود $12/5\%$ به دست آمد. در جدول شماره‌ی ۴ مقادیر، حداقل و حداکثر و میانگین و همچنین انحراف معیار BHBA خون ارائه شده است. جدول شماره ۵ شامل مقایسه‌ی موارد مثبت و منفی بین تست‌های BHBA سرم و BHBA شیر می‌باشد تا حساسیت و ویژگی تست نواری را در مقایسه با تست شاخص BHBA سرم خون به دست آورد. حساسیت و ویژگی تست مزرعه‌ای در مطالعه‌ی حاضر $42/8\%$ و 100% می‌باشد. موارد منفی کاذب و مثبت کاذب با توجه به جدول ۴ به ترتیب $57/14\%$ و 0% محاسبه شده است. در جدول شماره‌ی ۶ ضریب توافق دو تست BHBA شیر

جدول ۳- تعداد و درصد دامهای مبتلا با توجه به بازه‌های تعریف شده در تست نواری BHBA شیر

| درصد دام های مبتلا | تعداد موارد مبتلا | نتایج حاصل از تست مزرعه‌ای |
|--------------------|-------------------|----------------------------|
| ۸۷.۵ | ۲۸ | ۰-۹۹ |
| ۶.۲ | ۲ | ۱۰۰-۱۹۹ |
| ۶.۲ | ۲ | $X > 200$ |
| ۱۰۰ | ۳۲ | تعداد کل |

جدول ۴- میانگین و حداقل و حداکثر و انحراف معیار تست BHBA خون ($\mu \text{ mol/lit}$)

| انحراف معیار | میانگین | حداکثر | حداقل | تعداد |
|--------------|---------|--------|-------|-------|
| ۱۱۱.۱۳۶ | ۷۹۵.۳۱ | ۲۸۹۰ | ۲۵۰ | ۳۲ |

جدول ۵- مقایسه ی موارد مثبت و منفی تست شیر و تست شاخص خون برای پی بردن به حساسیت و ویژگی

| | | | |
|------------|------|------|----|
| شیر خون | مثبت | منفی | کل |
| منفی | ۲۵ | ۰ | ۲۵ |
| مثبت | ۳ | ۴ | ۷ |
| کل | ۲۸ | ۴ | ۳۲ |

جدول ۶- ضریب توافق تست شیر و تست خون

| | Kappa | Asymp. Std. Error | Approx. T ^p | . p- Value |
|------------|-------|-------------------|------------------------|------------|
| ضریب توافق | ۰.۶۷۶ | ۰.۱۶۹ | ۴.۰۴۱ | ۰.۰۰۰۵ |
| کل | ۳۲ | | | |

بحث و نتیجه گیری

حساسیت و ویژگی تست مزرعه ای در مطالعه ی حاضر ۴۲/۸٪ و ۱۰۰٪ و موارد منفی کاذب و مثبت کاذب با توجه به جدول ۵ به ترتیب ۵۷/۱۴٪ و ۰٪ محاسبه شده است. با توجه به بالا بودن موارد منفی کاذب این تست می توان چنین نتیجه گرفت که این تست احتمالاً تعدادی از گاوهای گله را که به کتوز مبتلا هستند، منفی اعلام کرده است. پس به همین دلیل استفاده از این تست در گله‌هایی با رخداد کتوز پایین، توصیه نمی شود و همچنین با توجه به ویژگی ۱۰۰٪ بدست آمده در این مطالعه، می توانیم این تست را تستی مناسب برای ردیابی موارد انفرادی کتوز معرفی کنیم. البته ذکر این نکته نیز مهم به نظر می رسد که طبق دستور مصرف نوار BHBA شیر باید موارد ۱۹۹-۱۰۰ $\mu\text{mol/lit}$ را به عنوان مشکوک تلقی کنیم ولی با توجه به مقالات و تحقیقات دیگر محققین و اعلام نقطه ی برش ۱۰۰ $\mu\text{mol/lit}$ در مطالعه ی حاضر مبادرت به مثبت در نظر گرفتن موارد مشکوک نمودیم لذا با توجه به جدول شماره ۳، رخداد کتوز تحت بالینی توسط تست نواری BHBA شیر چیزی در حدود ۱۲/۴٪ به دست آمده است.

لیکن این درصد رخداد را نمی توان به عنوان رخداد حقیقی کتوز در گله معرفی نمود زیرا تست شاخص برای معرفی

کتوز حقیقی در این مطالعه BHBA سرم با نقطه ی برش ۱۴۰۰ $\mu\text{mol/lit}$ در نظر گرفته شده است. با توجه به این نقطه ی برش تست شاخص، تعداد ۷ راس گاو از ۳۲ راس گاو مورد بررسی به عنوان مثبت قطعی اعلام می شوند و رخداد حقیقی کتوز در این گله ۲۱/۸۷٪ می باشد.

از محاسبات فوق این گونه می توان نتیجه گرفت که حدود ۹/۴ درصد از گاوهایی که بر مبنای تست شاخص با نقطه ی برش ۱۴۰۰ $\mu\text{mol/lit}$ مبتلا به کتوز معرفی شده اند از دیدگاه تست نواری BHBA شیر سالم تشخیص داده شده اند که این خود تایید کننده ی حساسیت پایین این تست در تشخیص موارد مثبت (بیمار) می باشد.

Otzel در سال ۲۰۰۷، ۱۲ راس گاو را برای نمونه گیری به منظور ردیابی کتوز تحت بالینی در گله مقدار قابل قبولی می داند. وی در طی مطالعه ی خود ۹ گله را از نظر شیوع کتوز تحت بالینی مورد بررسی قرار داد و بر اساس نقطه ی برش $1400 \mu\text{mol/lit} < x$ و $200 \mu\text{mol/lit} < x$ برای BHBA خون و شیر و نقطه ی هشدار ۱۰٪ مشخص گردید که ۲ گله ای که از نظر تست شاخص خون مبتلا به کتوز اعلام شدند، توسط تست شیر منفی اعلام شدند و این در حالی بود که رخداد کتوز تحت بالینی در این دو گله ۴۴٪ و ۲۴٪ بود (۵، ۱۵، ۱۶).

تشخیص کتوز تحت بالینی در گله می‌شود زیرا رخداد حقیقی کتوز در گله می‌تواند با تغییر در نقطه‌ی برش، بیشتر و یا کمتر از حد واقعی نمایش داده شود (۱۶ و ۱۵) و عدم دقت کافی در تشخیص موارد مثبت مبتلا به کتوز تحت بالینی در گله توسط تست نواری BHBA شیر باعث محدودیت استفاده از این تست را به منظور ردیابی کتوز در گله‌هایی با شیوع نه چندان بالای کتوز می‌باشد.

با توجه به حساسیت پایین و ویژگی بالای تست نواری BHBA شیرو همچنین مقادیر قابل توجه منفی کاذب، مطالعه‌ی حاضر تست نواری BHBA شیر را تستی مناسب جهت ردیابی کتوز تحت بالینی معرفی نکرده و تنها آن را تستی انفرادی جهت ردیابی کتوز تحت بالینی در گله‌هایی با رخداد کتوز بالا توصیه می‌نماید از این رو نتایج بدست آمده در این مطالعه با مطالعات مشابه دیگر محققین همخوانی دارد.

J. carrier و همکاران در سال ۲۰۰۴ عنوان کردند که تست نواری BHBA شیر با نقطه‌ی برش $100 \leq \mu \text{ mol/lit}$ دارای حساسیت ۷۳٪ و ویژگی ۹۶٪ و با نقطه‌ی برش $200 \leq \mu \text{ mol/lit}$ دارای حساسیت ۲۷٪ و ویژگی ۹۹٪ می‌باشد و با توجه به این نتایج، این تست از قابلیت خوبی برای ردیابی کتوز به صورت انفرادی برخوردار است (۲۰ و ۱۳).

در طی تحقیقات *M.A. Korgh* و همکارانش در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۸۹۰۲ راس گاو شیری در بازه‌ی ۷-۲۱ روز پس از زایش انجام گرفت نتایج حاصله از تست نواری شیر، حساسیت و ویژگی این تست را به ترتیب ۵۸٪ و ۹۷٪ بیان داشت (۲۵ و ۱۴).

Otto. M. radostits چنین عنوان می‌کند که حساسیت و ویژگی تست نواری BHBA شیر در حدود ۷۳-۹۶٪ و ۶۹-۹۶٪ می‌باشد و این اختلاف بین اعداد بدست آمده به دلیل تفاوت در اخذ عدد ثابت برای نقطه‌ی برش BHBA خون می‌باشد. این نقطه‌ی برش بین $1200 - 1400 \mu \text{ mol/lit}$ متغیر است (۱۸ و ۱۷).

Carrier و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان می‌کنند که تفاوت در گزارشات در مورد ویژگی و حساسیت تست‌های مزرعه‌ای که بر پایه تغییر رنگ استوار هستند به علت تفسیر شخصی از رنگ حاصله می‌باشد و به همین دلیل استاندارد سازی این تست‌ها دشوار است (۲۳) اما با این وجود *Driksen* و *Breitner* در سال ۱۹۹۳ به این نتیجه رسیدند که سادگی تست نواری BHBA شیر باعث ارزشمند بودن این تست برای تشخیص کتوز تحت بالینی است (۲۵ و ۴).

Otzel در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ چنین عنوان می‌دارد که مزیت سریع و آسان بودن تست نواری BHBA شیر در مورد ردیابی کتوز در سطح گله قابل چشم پوشی است زیرا این مزیت تست‌های مزرعه‌ای تنها برای بررسی کتوز به صورت انفرادی در گاوهای مشکوک به کتوز قابل استفاده است. حساسیت و ویژگی پایین BHBA شیر باعث انحراف

References

- 1-Abrian, P. (2005) Dairy cattle nutrition and feeding. Ayeezh publishing.pp:121,189,299
- 2-Anderson, D.E. (1970) ketosis in dairy cow. Extention Dairy specialists, Oregon state university, Corvallis.
- 3-Braid, G. David (1982) Primary ketosis in the High- producing dairy cow: cilinical and sub cilinical disorders, treatment, prevention and out look. J Dairy sci 65: 1-10.
- 4-Bremmer, Darin (2002) Monitoring sub cilinical ketosis in transition dairy cows. Proc. Minn. Dairy health conf.
- 5-Carrier, J (2004) Evaluation and use of three cow side tests for detection of sub cilinical ketosis in early post partum cows. J Dairy sci 87: 3755-3785.
- 6-Duffield, T.F (2008) Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. J. Dairy Sci: 92:571-580.
- 7-Duffield, Todd. F (1997) use of test day milk fat and milk protien to detect sub cilinical ketosis in dairy cattle in ontorio. Can vet J. 38; 713-718.
- 8-Enjalbert, F. (2001) Ketone bodies in milk and blood of dairy cow: relation ship between concentration and utilization for detection of sub cilinical ketosis. J Dairy sci 84: 583-589.
- 9-Geishauser, T. (1997) Evaluation of five cow side tests for use with milk to detect sub cilinical ketosis in dairy cows. J Dairy sci 81: 438-443.
- 10-Gillund, P. (2001) Body condition related to ketosis and reproduction performance in Norwegian dairy cows. J Dairy sci 84: 1390-1396.
- 11-Gold Hawk, C. (2009) Prepartum feeding behavior is an early indicator of sub-cilinical ketosis. J Dairy sci 92: 4971-4977.
- 12- Iwersen, M. (2009) Evaluation of an electronic cow side test to detect sub cilinical ketosis in dairy cow. J Dairy sci 92: 2618-2624.
- 13- Juchem, S.O. (2004) Production and blood parameters of Holstein cows treated prepartum with sodium monensin or propylene Glycol. J Dairy sci 87: 680-689.
- 14- Korgh, M.A (2011) Latent class evaluation of a milk test, a urine test, and fat to protein ratio percentage in milk to diagnose ketosis in dairy cow. J Dairy sci 94: 2360-2367.
- 15- Otzel, Garrett R. (2007) Herd level ketosis, Diagnosis, risk factors. 40th annual conference vancover 2007 Pp:67-91.
- 16- Otzel, G.R. (2010) understanding the impact of sub cilinical ketosis. Department of medical sciences, university of wisconsin.
- 17- Radostis, O. M. (2007) veterinary medicine, Elsevier pp. 1661-1665.
- 18- Scott, P. R. (2010) Cattle medicine, Manson Pp255-256.
- 19- Smith, B. P. (2009) Large animal internal medicine, Elsevier Pp:1364-1370.
- 20- Stevens, K.D. (2012) Monitoring the incidence of ketosis in fresh cows using milk composition, urine ketones and milk ketosis. Department of animal sciences, the Ohio state university 2012.
- 21-Tohru, Takeso sakal (1992). Therapeutic effects of simultaneous use of Glucose and Insulin in ketotic cows. J Dairy sci 76: 109-114.
- 22-Van knegsel, A. (2007) Natural anti bodies retated to energy balance in early lactation dairy cows. J Dairy sci 90: 5490-5498.
- 23-Vesna, G. (2008) Test day records as a tool for sub cilinical ketosis detection. Acta reterineria (Beograd), Vol 59, No. 2-3, 185-191.
- 24-Xu, Chang (2000) Metabolic characteristic of the liver of dairy cows during ketosis based on comparative proteomics. Asian-Aust anim sci. Vol

21, No.4: 1003-1010.

25-Zhang, zhigang (2011) Detection of sub-clinical ketosis in dairy cows. Pak vet J 32(2): 156-160.

26-Zhang, Zhigang, B- hydroxybutyrate, Glucose, Calcium, phosphorus and vitamin C concentrations in blood of dairy cows with sub-clinical ketosis during the early lactation. Bull vet Inst pulway. 53: 71-74.