جستجوی آنتی‌بادی ضد هرپس ویروس تیپ ۱ گاوی در شیر گاوان منطقه ارومیه و ماکو به روش الایزا

احمد قره‌خانی[1]*، احمد مرشدی[2]

۱. عضو هیات علمی گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو، ماکو، ایران
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: A.Gharekhani@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۸۹/۵/۱۰**، پذیرش نهایی:** ۸۹/۱۱/۲۶**)**

چکیده

برای تعیین میزان آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ گاوی (BHV-1) در گاوهای شیری منطقه ارومیه و ماکو و مقایسه نتایج به‌دست آمده، یک مطالعه مقطعی انجام شد. انتخاب نمونه‌ها به طور تصادفی و در سه گروه سنی (۳ تا ٤ سال، ٥ تا ٦سال و ۷ سال به بالا) صورت گرفت. در هر شهرستان ۲۲ گله انتخاب و از هر گله، ۱۰ رأس گاو جدا و از هر رأس، یک نمونه شیر اخذ گردید. نمونه‌ها با استفاده از آزمون الایزای غیر مستقیم برای جستجوی پادتن‌های ضد هرپس ویروس ۱ گاوی مورد آزمایش قرار گرفتند. با تعیین OD نمونه‌ها و درصد الایزا مثبت و الایزا منفی، نتایج به‌دست آمده مقایسه گردید. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS ویرایش ١٦، آزمون‌های من ویتنی، مربع کای، کروسکال والیس و نرم افزار S-Plus 2000، جهت پی بردن به تفاوت بین میانگین میزان آلودگی در دو منطقه و تفاوت مجموع میانگین میزان آلودگی در بین گروه‌های سنی با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. نتایج نشان داد میزان آلودگی در منطقه ماکو ۳٤/۰۸ درصد و در منطقه ارومیه ۱۳/۰٤ در صد بوده که حاکی از بالا بودن میزان آلودگی در منطقه ماکو است به طوری که تفاوت آماری معنی‌داری را بین میزان آلودگی در این دو منطقه شاهد هستیم (p =۰/۰۰۵). به علاوه، در بررسی مجموع میانگین میزان آلودگی در بین گروه‌های سنی در دو منطقه، نسبت موارد آلوده در گروه سنی اول (۳۲ درصد) به‌طور معنی‌داری از دو گروه سنی دیگر (١٤ درصد) و (٦ درصد) بیشتر برآورد گردید (p<۰/۰۵).

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ٤، شماره ۳، پیاپی ۱۵، صفحات: ۹۲۱-۹۱۵.
کلید واژه‌ها: هرپس ویروس ۱، گاو، شیر، الایزا، ارومیه، ماکو

مقدمه

هرپس ویروس ۱ گاوی عامل رینوتراکئیت عفونی گاوان (IBR) است که موجب بیماری در قسمت فوقانی دستگاه تنفس یعنی بینی، حنجره و نای می‌شود (۱۱). آلودگی به این ویروس می‌تواند سبب تورم عفونی مهبل و فرج، سقط جنین، ناباروری، گاهی آنسفالیت و عوارض گوارشی در گوساله‌ها شود، التهاب پستان و زخم مابین انگشتان از عوارض دیگر بیماری است. همچنین عده زیادی از گاوان بالغ بدون بروز نشانه‌های بالینی حامل ویروس بوده و می‌توانند سبب انتشار عفونت شوند (۵، ۱۳ و ۱۵). یک خصوصیت قابل توجه ویروس توانایی آن در مخفی شدن به دنبال عفونت اولیه با سویه تخفیف حدت یافته می‌باشد. ویروس مادام العمر مخفی باقی مانده و سپس عود می‌نماید. فعالیت مجدد ویروس و

انتشار آن در اثر عواملی مانند تزریق مقدار زیاد کورتیکواستروئیدها، استرس، تغییر رژیم غذایی یا آب و هوا، سایر بیماری‌های عفونی، تراکم زیاد گله، کوچ دائم دام‌ها و ایمنی ناهمگن صورت می‌گیرد (١٣). این بیماری تا ١٠ درصد تلفات دارد ولی خسارات اقتصادی مهمی نظیر کاهش تولید شیر، کم شدن گوشت و سقط جنین را سبب می‌شود (٨ و ١٠). در حال حاضر یکی از راه‌های تشخیص آلودگی به این ویروس، جستجوی پادتن ضد آن با استفاده از آزمون الایزا در شیر است که می‌تواند جایگزین روش سرولوژی شود (١٤، ١٥ و ١٧). هدف مطالعه حاضر، بررسی میزان آلودگی به هرپس ویروس ١ گاوی (BHV-1) با استفاده از آزمون الایزا در نمونه شیر انفرادی اخذ شده از گاوهای منطقه ارومیه و ماکو و مقایسه نتایج به‌دست آمده است.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری در این مطالعه شامل گاوهای شیرده منطقه ماکو (شامل شهرستان‌های ماکو، پلدشت و شوط) و منطقه ارومیه (شهرستان ارومیه و اطراف آن) بودند. طبق برآوردهای انجام شده، حجم نمونه مورد استفاده در این تحقیق شامل ٤٤٠ رأس گاو بود که ٢٢٠ رأس آن، از گاوهای گاوداری‌های منطقه ماکو و به روش دو مرحله‌ای خوشه‌بندی و سپس تصادفی ساده و ٢٢٠ رأس دیگر، از گاوهای گاوداری‌های منطقه ارومیه با همین روش اخذ شدند. دام‌های مورد مطالعه با توجه به اطلاعاتی که در پرسشنامه درج شده بود، در سه گروه سنی ٣ تا ٤ سال، ٥ تا ٦ سال و ٧ سال به بالا قرار گرفتند، سپس از هر راس گاو به میزان ٧–٦ میلی‌لیتر شیر اخذ و در آزمایشگاه پس از سانتریفوژ و حذف چربی، در ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جهت جستجوی پادتن برعلیه هرپس ویروس ١ گاوی از روش الایزای غیرمستقیم و با استفاده از کیت تجارتی به نام Svanovir ساخت شرکت Svanova Biotech کشور سوئد و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت به شرح زیر صورت گرفت:

١٠٠ میکرولیتر از نمونه شیر به صورت دوتایی در دو حفره مجاور هم که یکی حاوی و دیگری فاقد پادگن BHV-1 بودند، ریخته شد. چهار حفره آخرین ردیف پلیت جهت شیر مثبت و منفی استاندارد اختصاص داشت و پس از یک ساعت نگه‌داری در گرمخانه ٣٧ درجه سانتی‌گراد و ٣ بار شستشو، ١٠٠ میکرولیتر از کونژوگه پراکسیداز به هر حفره اضافه شد و دوباره پس از یک ساعت نگه‌داری در گرمخانه ٣٧ درجه و ٣ بار شستشو، به هر حفره ١٠٠ میکرولیتر محلول سوبسترا ریخته و حدود ١٥ دقیقه در حرارت اتاق گذاشته شد. پس از مشاهده تغییر رنگ ٥٠ میکرولیتر ماده متوقف کننده به هر حفره اضافه و OD (optical density) آنها در ٤٥٠ نانومتر خوانده و ثبت گردید. ارزش میانگین OD نمونه‌ها و استاندارد با کاهش OD حفره کنترل آنتی ژن از OD حفره آنتی ژن BHV-1 محاسبه گردید. در این تحقیق نمونه‌های شیر که ارزش میانگین OD آنها مساوی یا بزرگتر از٢/٥ برابر میانگین OD سرم منفی استاندارد بودند، مثبت در نظر گرفته شد (جدول ١).

جدول ١– میزان میانگین OD و دو برابر کنترل شیر منفی در نمونه‌های دو منطقه ارومیه و ماکو

منطقه	OD نمونه	OD شاهد	OD متوسط	OD×٢ متوسط
ارومیه	٠/٣٩٩	٠/٣٥٣	٠/٣٧٦	٠/٧٥٢
ماکو	٠/٣١٠	٠/٣٢٦	٠/٣١٨	٠/٦٣٦

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ١٦، روش‌های آمار توصیفی، آزمون‌های من ویتنی، مربع کای، کروسکال والیس و نرم افزار S- Plus 2000 با در نظر گرفتن سطح اطمینان ٩٥ در صد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این بررسی از مجموع ٤٤٠ نمونه شیر اخذ شده (جدول ٢)، ١٠٤ نمونه (٢٣ درصد) واجد پادتن و ٣٣٦ نمونه (٧٧

درصد) فاقد پادتن ضد ویروس هرپس ویروس ١ گاوی بودند. از ١٠٤ نمونه مثبت، در منطقه ماکو ٧٥ نمونه (٣٤/٠٨ درصد) مثبت و در منطقه ارومیه، ٢٩ نمونه (١٣/٠٤ درصد) مثبت شناخته شدند.

جدول ٢– تعداد نمونه‌های اخذ شده در هر منطقه به تفکیک گروه سنی

گروه سنی / منطقه	٤-٣ سال	٦-٥ سال	٧ سال به بالا
ارومیه	١٢٧	٥٣	٤٠
ماکو	١٤٥	٤٨	٢٧
جمع	٢٧٢	١٠١	٦٧

با توجه به میزان آلودگی گزارش شده در این دو منطقه، به نظر می‌رسد تفاوت معنی‌داری بین میانگین میزان آلودگی وجود دارد. آزمون این فرضیه، درسطح اطمینان ٩٥ درصد با نرم افزار SPSS ویرایش ١٦ انجام شد که مقدار احتمال آزمون، با آزمون من‌ویتنی برابر p=٠/٠٠٥ شد که نشان‌دهنده این موضوع است که میزان آلودگی در دو منطقه ارومیه و ماکو با هم برابر نیست و نیز با آزمون فرض یک طرفه مشاهده گردید که این میزان در منطقه ماکو بیشتر است که آزمون این فرضیه در سطح اطمینان ٩٥ در صد با نرم افزار s-plus2000 انجام شد (X-square = 25.5, df = 1, p-value= 0).

از طرفی میزان آلودگی در دو منطقه با هم ١٠٤ نمونه (٢٣ درصد) می‌باشد که از این میزان ٨٦ نمونه از گروه سنی اول،١٤ نمونه از گروه سنی دوم و ٤ نمونه از گروه سنی سوم گزارش شدند که از ١٠٠ درصد موارد آلوده به ترتیب ٨٣ درصد، ١٣ درصد و ٤ درصد آلودگی‌ها را شامل می‌شوند (جدول ٣)، البته با قیاس این نسبت‌ها با نسبت‌های تخصیص یافته از حجم نمونه به هر گروه، قضاوت از روی این ارقام سخت بوده ولی با تحلیل ناپارامتری میزان OD درون گروه‌ها با هم به‌طور معنی‌داری متفاوت است. با استفاده از آزمون کروسکال والیس مقدار آمار خی دو برابر ١٨/٢١ و مقدار p_value برابر صفر گردید. برای اطمینان بیشتر، آزمون جانکر هم این نتیجه را تأیید کرد.

برابری نسبت موارد آلوده نیز مورد آزمون قرار گرفت. آزمون این فرضیه در سطح اطمینان ٩٥ درصد با نرم افزار s-plus2000 انجام شد، که مشاهده شد نسبت موارد آلوده در بین سه گروه سنی برابر نیست. مقدار آمار خی دو آزمون برابر ٢٦/٥ و مقدار p_value برابر صفر شد. با مقایسه تکی گروه‌ها و آزمون مقایسه جفت میانگین‌ها، دریافت می‌شود که نسبت موارد آلوده در گروه سنی اول به‌صورت معنی‌داری از دو گروه سنی دیگر بیشتر است. برآورد نمونه‌ای برای نسبت موارد آلوده در گروه سنی اول ٣٢ درصد، در گروه سنی دوم برابر ١٤ درصد و در گروه سنی سوم ٦ درصد به‌دست آمد (X-square = 26.5, df = 2, p-value = 0) (جدول ٤).

جدول ٣- تعداد و در صد نمونه‌های الایزا مثبت در هر منطقه به تفکیک گروه سنی

گروه سنی / منطقه	٤-٣ سال	٦-٥ سال	٧ سال به بالا
ارومیه	٢٦	٣	-
ماکو	٦٠	١١	٤
جمع	٨٦ (٨٣ ٪)	١٤(١٣٪)	٤ (٤٪)

جدول ٤ - برخی ویژگی‌هایOD در هر منطقه به تفکیک گروه‌های سنی

گروه‌های سنی / منطقه	٤-٣ سال (در مجموع با٣٢٪ آلودگی)	٦-٥ سال (در مجموع با١٤٪ آلودگی)	٧ سال به بالا (در مجموع با٦٪ آلودگی)
ارومیه			
میانگین	٠/٣٦	٠/٢٩	٠/٢١
فاصله اطمینان ٩٥٪	٠/٣٢ -٠/٤٢	٠/٢٢ -٠/٣٦	٠/١٦ – ٠/٢٦
انحراف معیار	٠/٢٩	٠/١٧	٠/٢٠
Max	١.٤٦	٠/٠١	٠/٠١
Min	٠/٠٣	٠/٥٥	١/٠٢
ماکو			
میانگین	٠/٤٤	٠/٣٧	٠/٢٣
فاصله اطمینان ٩٥٪	٠/٣٨ -٠/٥٠	٠/٣٠ -٠/٤٤	٠/١٧ -٠/٣٠
انحراف معیار	٠/٣٥	٠/٢٤	٠/١٦
Max	١.٤٦	١/٠٩	٠/٠٦
Min	٠/٠٥	٠/٠٦	٠/٧٧

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه روش‌های مختلف آزمایشگاهی برای تشخیص آلودگی به BHV-1 در گاو وجود دارد، اما آزمون الایزا به دلیل راحت‌تر بودن مراحل انجام آن و نیاز به زمان حدود ٣ ساعت برای اعلام نتیجه به عنوان یک تست غربالگر مطرح است. در بسیاری از کشورها، این روش به عنوان ابزاری قوی و مهم برای کنترل بیماری IBR به‌کار گرفته شده است (١٢). آزمایش الایزا به‌طور گسترده‌ای برای تعیین آنتی‌بادی‌های BHV-1 در نمونه‌های شیر به‌کار رفته است (١٣). در ایران نیز کارهای سرولوژی در مورد BHV-1 در استان‌ها و شهرستان‌ها کم وبیش انجام شده است (١، ٢، ٣ و ٤).

Frankena و همکاران (١٩٩٧) نشان دادند که در گله‌های متوسط (حداقل با ٤٥ رأس گاو) با استفاده از تست الایزا در شیر بین ٢٥-١٠ درصد آلودگی در گله مشاهده شد و نتیجه گرفتند که مثبت بودن نمونه‌های شیر از نظر BHV-1 نشانگر گسترش عفونت در گله است (٧). در تحقیق دیگری که به‌وسیله Tekes و همکاران (١٩٩٩) در کشور مجارستان با استفاده از تکنیک الایزا در شیر و سرم انجام شد، در الایزای شیر ٧٩ درصد گله آلوده به BHV-1 بودند در حالی که در نمونه‌های سرمی تست شده فقط ٦٤ درصد مثبت گزارش گردید (١٦). در مطالعه دیگری که در اسلونی توسط Hostnik و Grom (١٩٩٧) روی ٨٣٥ نمونه سرم و شیر انجام گرفت، میزان آلودگی به BHV-1 در سرم ٨٦ درصد و در شیر ٨٠ درصد با استفاده از تکنیک الایزا به‌دست آمد در حالی که فقط ٧٩ درصد همین نمونه‌های سرمی با استفاده از تست VN (Viral neutralization test) مثبت بودند (٩). در بررسی

دیگری در کشور دانمارک استفاده از شیر جمع‌آوری شده از هر گله (Bulk tank) جهت تعیین وضعیت آلودگی به BHV-1 با الایزای شیر مناسب تشخیص داده شد (١١). افشاری و همکاران در یک تحقیق که از پاییز ١٣٨٤ تا تابستان ١٣٨٥، بر روی ٢٧٠ رأس گاو از ٩ گاوداری شیری اطراف شهرستان کرج جهت بررسی میزان آلودگی به BHV-1 با استفاده از آزمون الایزا در نمونه‌های شیر انفرادی انجام دادند، میزان آلودگی را ٣٧/٠٣ درصد (١٠٠ نمونه) گزارش کردند. همچنین در مقایسه میزان آلودگی در سه فصل بهار، تابستان و زمستان، بیشترین تعداد نمونه‌های مثبت (٤٥ مورد) در فصل پاییز گزارش گردید (١). در بررسی دیگری که توسط تاجیک در سال ١٣٨٠ در پنج گاوداری صنعتی اطراف تهران (شهریار و کرج) جهت بررسی سرولوژیک ویروس BHV-1 با استفاده از تست VN روی ٢٠٨ نمونه سرمی انجام شد، از ١٠١ نمونه اخذ شده از شهرستان کرج ١٧ نمونه (١٦/٨ درصد) و از ١٠٧ نمونه اخذ شده از شهرستان شهریار ٥٨ نمونه (٥٤/٧ در صد) مثبت بودند. میزان آلودگی در گاوهای بالای دو سال (گاوهای ٣ تا ٤ سال) در مجموع بیشتر از سایر گروه‌های سنی بررسی شده گزارش گردید و شهرستان شهریار نسبت به شهرستان کرج آلوده‌تر بود (٢).

در تحقیق حاضر همان‌طور که قبلاً نشان داده شده بود می‌توان نمونه‌های شیر را به جای سرم در آزمون الایزا جهت تعیین وضعیت آلودگی گله به BHV-1 به راحتی بکار برد، زیرا نمونه‌برداری شیر از گله‌ها آسان‌تر انجام می‌شود و می‌تواند آلودگی‌های بالا، متوسط و پایین را در گله نشان دهد به این شکل که آلودگی های بالاتر از ٣٠ در صد آزمایش سرمی مثبت یا شیر مثبت را آلودگی بالا، کمتر از ١٠ درصد را آلودگی پایین و ما بین ١٠ تا ٣٠ درصد را آلودگی متوسط قلمداد می‌کنند (١١). در این مطالعه که نمونه‌ها از دو منطقه ارومیه و ماکو جمع‌آوری گردید، میزان آلودگی در منطقه ماکو ٣٤/٠٨ درصد و در منطقه ارومیه ١٣/٠٤ درصد به‌دست آمد که به ترتیب میزان آلودگی بالا و متوسط را نشان دادند و در بررسی آماری نتایج که به‌وسیله آزمون‌های من ویتنی، مربع کای با نرم افزار SPSS ویرایش ١٦ و نرم افزار S-Plus 2000 با سطح اطمینان ٩٥ درصد انجام شد، نشان داده شد که میزان آلودگی در منطقه ماکو به‌طور معنی‌داری بیشتر از منطقه ارومیه می‌باشد (p=٠/٠٠٥). شاید دلیل آن را بتوان به شرایط زیست ویروس نسبت داد که در دمای پایین‌تر هوا بیشتر فراهم می‌شود (٦). با توجه به اینکه منطقه ماکو نسبت به ارومیه مرتفع‌تر و دارای آب و هوای سردتری است، می‌تواند تأییدی بر این نتیجه باشد. البته شاید عوامل دیگری نیز مانند عوامل مدیریتی در این اختلاف دخیل باشد. از طرفی در بررسی میزان آلودگی در بین سه گروه سنی انتخاب شده که به‌وسیله آزمون‌های کروسکال والیس، مربع کای به‌وسیله نرم افزار S-Plus 2000 با سطح اطمینان ٩٥ درصد انجام شد، نسبت موارد آلوده در گروه سنی اول (٣ تا ٤ سال) ٣٢ درصد، در گروه سنی دوم (٥ تا ٦ سال) ١٤ درصد و در گروه سنی سوم (٧ سال به بالا) ٦ درصد به‌دست آمد و نیز نشان داده شد که میزان آلودگی در گروه سنی اول به‌صورت معنی‌داری بیشتر از دو گروه سنی دیگر است. با نگاه کلی و ساده به جداول ارائه شده، رابطه معکوس بین میزان آلودگی با سن دام آشکار می‌شود و این یافته با آنچه در متون آمده مطابقت دارد (١٣).

با توجه به نتایج مطالعات قبلی انجام یافته و نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت که آزمون الایزای شیر با آزمون الایزای سرم و VNT که یک تست استاندارد است برابری کرده و می‌تواند به جای آنها در تعیین آلودگی گله به‌کار گرفته شود. از سوی دیگر الایزا بر خلاف VNT نیاز به کشت سلول، ویروس زنده و صرف زمان طولانی نداشته و می‌تواند در هر آزمایشگاهی انجام شود. اخیراً استفاده از شیر گاوان چه به طور انفرادی و چه به شکل مخلوط گله، به کمک آزمون

الایزا در تشخیص گله‌های آلوده به BHV-1 از گله‌های عاری از عفونت در برنامه‌های غربالگری در اکثر کشورها بکارگرفته شده است.

سپاسگزاری

با سپاس فراوان از ریاست محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو جناب آقای دکتر آب برین و معاونت محترم پژوهشی واحد جناب آقای مهندس آقازاده که هموار مشوق انجام کارهای تحقیقاتی هستند، با تشکر از مسئول محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، جناب آقای حیدر ثانی که در انجام کارهای عملی تحقیق ما را یاری نمودند و نیز از جناب آقای توحید بهرامی کارشناس ارشد آمار و مدرس دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو که انجام کارهای آماری این مطالعه را بر عهده داشتند.

منابع

۱. افشاری، غ.، باهنر، ع.، لطفی زاده، م. و موسی‌خانی، ف. ۱۳۸۷. بررسی فراوانی حضور پادتن ضد هرپس ویروس ۱ گاوی در شیر گاوداری های اطراف کرج به روش الایزا. مجله علوم دامپزشکی ایران ،دوره چهارم، شماره سوم، صفحات:۹٤-۸۹ .

۲. تاجیک، س. ۱۳۸۰. بررسی سرولوژیکی هرپس ویروس تیپ ۱ گاوی (IBR) در پنج گاوداری صنعتی اطراف تهران (کرج، شهریار). خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، صفحه: ۱۹۸.

۳. حاجی حاجیکلایی، م.ر. و صیفی آباد شاپوری، م.ر. ۱۳۸۵. بررسی سرواپیدمیولوژیکی آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۱ گاوی (BHV-1) در گاوهای اهواز. مجله علوم دامپزشکی ایران، دوره دوم، شماره دوم، صفحات: ۳۰-۲۳.

٤. همت زاده، ف.، ممتاز، ح.، تاجبخش، ا. و صفری، ح. ۱۳۸۱. بررسی سرولوژیک آلودگی به ویروس IBR در گاوهای استان چهار محال بختیاری. مجله پژوهش و سازندگی، دوره پانزدهم، شماره دوم، صفحات: ٤۳-۳۸.

5. Ata, A., Kala, M., Yavru, S., Bulut, O. and Buyukyoruk, U. 2006. The effect of subclinical bovine herpes virus 1 infection on fertility of cows and heifers. Acta veterinaria. 56(2-3):267-273.
6. Fenner, F., Bachman, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J. and White, D.C. 1999. Veterinary Virology, Academic press, London, Third Edition. p:337-348.
7. Frankena, K., Franken, P., Vandehoek, J., Koskamp, G. and Kramps, J.A.1997. Probablity of detecting antibodies to bovine hepes virus 1 in bulk milk ofter the introduction of a positive animal on to a negative farm. Vet. Rec. 140:90-92.
8. Hage, J.J., schkken, Y.H., Dijkstra, Th., Barkema, H.W., Valkengoed, P.H.R. and Wentink, G.H. 1998. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpes virus 1 infection on a dairy farm. Preventive Veterinary Medicine. 34:97- 106.
9. Hostnik, P. and Grom, J. 1997. Laboratory diagnostic and control of IBR/IPV infectious. Zlrink Veterinarske Facultete univerza Ljubljana. 34:29-35.
10. Miller, J.M., Van Der Maaten, M.J. and Whetstone, C.A. 1988. Effects of a bovine herpes virus 1 isolate on reproductive function in heifers: classification as a type-2 infection pustular vulvovaginitis. Virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. American Journal of Veterinary. 49:1653-1656.
11. Nylin, B., Stroger, U. and Ronsholt, L. 2000. A retrospective evaluation of BHV-1 antibody ELISA on bulk milk samples for BHV-1 status of Danish dairy herds. Preventive Veterinary Medicine. 47:91-105.

12. Perrin, B., Bitsch, V., Cordioli, P., Edwards, S., Eliot, M., Guerin, B., et al. 1993. A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis . Revue Scientifique et Technique. 12(3):969-984.
13. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. and Hinchcliffe, K.W. 2007. Veterinary Medicine, A textbook of the disease of cattle, sheep, goats and horses. W.B. Saunders, Ninth Edition, p:1147-1185.
14. Rosskopf, M., Staub, E. and Ackremann, M. 1993. Comparison of two ELISA systems for the detection of antibodies against IBR/IPV and against enzootic bovine leukemia virus. Schweizer Archivfur Tierheilkunde. 136: 258-267.
15. Straub, O.C. 2001. Advances in BHV-1 (IBR) research. J.Vet. Diag. Invest. 10:43-48.
16. Tekes, L., Markos, B.,Mate, Z. and Kudron, E.1999. Prevalence of BHV-1 infection in Hungarian cattle herds. Acta Veterinaria Hungarian. 47:303-309.
17. Witte, K.H., Hanneman, N.P., Dopatka, H.D. and Giesendorf, B. 1989. Technical improvement of a commercial ELISA to detect antibodies against bovine herpes virus1. Medical Microbiology and Immunology. 178:9-20.