✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۵، تابستان ۱۳۸۱

# بررسی سرولوژی آلودگی به ویروس IBR در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری

● **فرهید همت‌زاده**، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
● **حسن ممتاز**، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
● **الهه تاج بخش**، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
● **حمید صفری**، شبکه دامپزشکی استان چهار محال و بختیاری

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۰

چکیده

به منظور مشخص نمودن وضعیت آلودگی گاوداری‌های استان چهار محال و بختیاری به ویروس IBR این تحقیق در فاصله زمانی تابستان ۱۳۷۹ تا بهار ۱۳۸۰ روی تعداد ۸۷۴ نمونه سرمی اخذ شده از گاوداریهای صنعتی و سنتی استان انجام گرفت. پس از انجام آزمون SN مشخص گردید که از ۸۷۴ نمونه سرم تعداد ۴۰۸ نمونه در آزمون SN دارای پاسخ مثبت هستند، که میزان کل آلودگی در استان برابر با ۴۶/۶۸٪ برآورد می‌گردد. میزان آلودگی در فصل بهار ۴۵/۸ در تابستان ۴۰/۵ در پاییز ۴۳/۹ و در زمستان ۵۱/۲۵ درصد برآورد گردیده است. میزان آلودگی در گاوهای ماده ۴۷/۴٪ و در گاوهای نر برابر ۳۵/۷٪ برآورد گردید. از بین ۸۴۷ نمونه مورد آزمون ۸۳۹ مورد دارای برنامه منظم واکسیناسیون البته نه بر علیه بیماری IBR بلکه علیه بیماری‌های دیگری از قبیل بروسلوز، طاعون و تب برفکی بودند که از این تعداد ۳۹۱ مورد (۴۶/۶٪) آلودگی را از خود نشان دادند در حالی که از بین ۳۵ نمونه فاقد برنامه واکسیناسیون ۱۷ مورد (۴۸/۵٪) آلوده بودند. در کل استان از بین ۸۱۸ نمونه سرمی مربوط به گاوهای ماده ۲۹ مورد دارای سابقه سقط جنین و ۷۸۹ مورد فاقد سابقه سقط بوده‌اند در بین ۲۹ مورد واجد سابقه سقط ۱۹ مورد (۶۵/۵٪) دارای واکنش سرمی مثبت و ۱۰ مورد منفی و از بین ۷۸۹ مورد فاقد سابقه ۳۶۹ مورد مثبت (۴۶/۷٪) و ۴۲۰ نمونه منفی بوده‌اند. در بین گروه‌های سنی مختلف کمترین میزان آلودگی در گروه سنی صفر تا یک سال با ۱۷/۵٪ آلودگی و بیشترین آلودگی در گروه سنی ۶ تا ۷ سال با ۷۷/۵٪ بود ولی شیب خط رگرسیون حاکی از ازدیاد میزان آلودگی به ازاء افزایش سن می‌باشد. در تجزیه و تحلیل آماری بین میزان آلودگی و محل شهرستان، جنسیت فصل و سابقهٔ واکسیناسیون، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: تورم بینی و نای عفونی گاوان، هرپس ویروس، سرولوژی، آزمون خنثی‌سازی سرم، چهارمحال و بختیاری

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 55 PP:38-43**

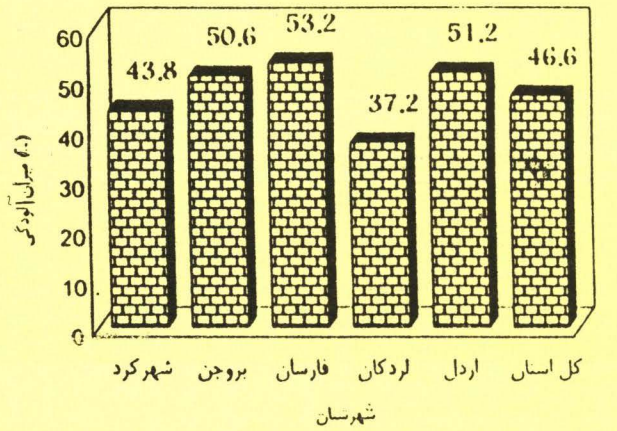
**A serological survay on bovine rhinoteracheitis virus infection in Chahar Mahal Bakhtiary province**

*By: F. Hemmatzadeh, Department of Microbiology and Immunology, University of Tehran-Iran., H. Momtaz, E. Tajbakhsh, M. Safari, Azad University of Shahrekord-Iran.*

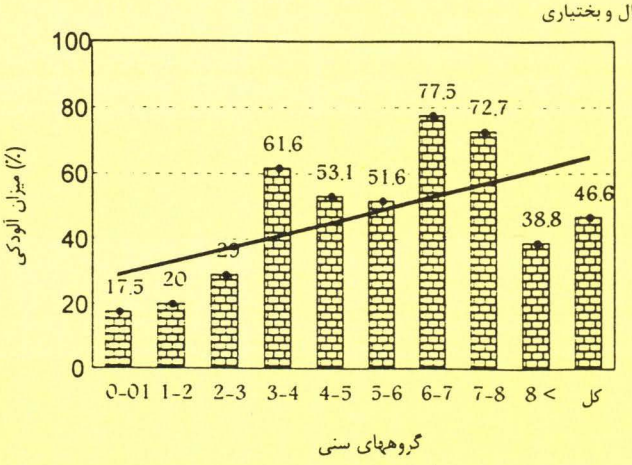
The most important purposes of this research were determining the rate of infection publicity and variant interference rate such as age, sex, health management and other environmental factors. In this research we tested 874 serum samples were taken from different township of Caharmahal Bakhtiary province in Iran. All of those samples were tested in serum neutralization test (SN). Infection rate of whole province was 47. 68%. Comparison between age groups showed that there was the lowest infection rate in 0-1 years old 17.5% and the cows had 6-7 years old had the most infection rate 77.5. This means that increasing in age causes the increase in rate of infection. There is the least infection rate (40.5%) in summer and the most infection rate (51.25%) in winter. The infection rate in cows which had regular vaccination programme were 46.6%, and these who didn't have a regular vaccination programme were infected about 48.5% and the infectoin in males were 37.5% and in females 47.4%. The infection rate in cows which had abortion were 65.5% and those who hadn't abortion were 46.7% Statistic analysis of these data shown that there was a significant difference between, increasing of age IBR infection with there wasn't any singificant difference between IBR infection with vaccination, sex and health management.

Keywords: IBR, Herpesviruses, Serology, SN test, Chahar Mahal Bakhtiary

نمودار شماره ۱- تعداد و درصد موارد مثبت آلودگی به ویروس IBR در آزمون SN در شهرستان‌های استان چهارمحال و بختیاری




نمودار شماره ۲- تعداد و درصد موارد مثبت آلودگی گاوها به ویروس IBR در آزمون SN در گروه‌های مختلف سنی در استان چهارمحال و بختیاری




## مقدمه

بیماری IBR از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه تنفسی و تناسلی در گاوها است که خسارات ناشی از آن در صنعت دامپروری جهان بسیار چشمگیر می‌باشد. عامل مواد این بیماری هرپس ویروس تیپ یک گاوی (BHV-1) متعلق به خانواده هرپس ویریده و دون خانوادهٔ آلفاهرپس ویرینه می‌باشد. ویریون غشاءدار این ویروس‌ها قطری حدود ۱۵۰ نانومتر دارد. اندازه ژنوم DNA هرپس ویروس‌ها از ۱۲۱-۲۲۷kbp در نوسان می‌باشد. تاکنون بیش از صد هرپس ویروس در حشرات، خزندگان، دوزیستان مورد بررسی و شناسائی قرار گرفته است. ذرات هرپس ویروس‌ها حساس بوده و در خارج از بدن زنده باقی نمی‌مانند. ویروس در اثر تماس‌های نزدیک فیزیکی که سطح اپی‌تلیال مرطوب در مجاورت هم قرار دارند منتقل می‌شود. در نقاط مختلف مثل محل پرورش گاوهای پرواری، زایشگاه و همچنین در مرغداری‌ها انتشار ویروس توسط ریز قطرات مهمترین راه انتقال بیماری محسوب می‌شود (۱، ۲، ۷، ۱۹).

تکثیرویروس در داخل هسته سلول منجر به تولید گنجیدگی‌های[1] داخل هسته‌ای ائوزینوفیلیک می‌گردد. ویروس به‌راحتی در کشت کلیه جنین گاو قابل جداسازی است، همچنین در کشت سلول‌های کلیه خوک، سگ، گوسفند، بز و اسب رشد کرده و در تمام آنها اثرات سیتوپاتیک[2] شدیدی ایجاد می‌کند. این آثار سیتوپاتیک در مدت ۳۶-۲۴ ساعت شروع شده و در مدت ۹۶-۷۲ ساعت باعث ایجاد مرگ سلولی می‌شوند ک درون هسته سلول‌ها گنجیدگی‌های ویژه‌ای قابل مشاهده است (۱۹، ۲۱، ۲۳).

حضور مادام العمر ویروس در بدن میزبان به صورت پنهان[3] به طور معمول چهره بارز همه عفونت‌های هرپس ویروسی است. انتشار ویروس می‌تواند به‌طور مداوم یا متناوب بدون حضور بیماری و یا به شکل دوره‌ای همراه با عفونت‌های بالینی برگشت پذیر صورت گیرد و یا ممکن است تا سالها پس از عفونت اولیه انتشار ویروسی اتفاق افتد. عفونت ناشی از ویروس IBR[4] همانند اغلب هرپس ویروس‌ها حالت نهفته پیدا کرده و در هنگام بروز استرس مجدداً نمایان می‌شود (۱، ۳، ۱۹، ۲۳).

از آنجائی که بیماری IBR دارای اشکال مختلفی چون تنفسی، تناسلی، گوارشی و انسفالیتی می‌باشد و ویروس عامل بیماری در میزبان به شکل نهفته باقی مانده و در هنگام وارد آمدن استرس خود را به شکل بالینی نمایان می‌سازد و تشخیص بیماری نیز تنها با تکیه بر علائم بالینی کاری نسبتاً دشوار است، لذا جهت تشخیص قطعی بیماری توام کردن یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی امری اجتناب‌ناپذیر است از طرفی بیماری IBR و ضایعات ناشی از آن مستعد کننده هجوم عوامل باکتریائی و زمینه ساز ایجاد عفونت‌های ثانویه است که این امر خود اهمیت ویژه‌ای را مخصوصاً در فرم تنفسی بیماری داراست، لذا جمع‌آوری اطلاعات مربوط به وضعیت بیماری در مناطق مختلف کشور و برآورد خسارات ناشی از آن امری ضروری به نظر می‌رسد و بدیهی است تا زمانی که در این زمینه اطلاعات کافی وجود نداشته باشد اقدامات کنترلی و پیشگیری کننده بیماری میسر نخواهند بود (۸، ۲۲).

BHV-1 در اندام‌های مختلف بدن، بیماری‌هایی با چهره‌های متفاوتی را ایجاد می‌کند و با توجه به مشابه بودن عامل آنها چنین به نظر می‌رسد که شاید بین سویه‌های مختلف این ویروس از نظر توانائی تکثیر و تمایل به سلول‌ها و ساختمان پادگنی تفاوت‌هائی وجود داشته باشد و به واسطه همین اختلافات از یکدیگر متمایز می‌شوند. تا زمانی که ویروس به صورت نهفته در حیوان بسر می‌برد امکان انتقال آن به حیوانات حساس وجود دارد و یا بعد از تحریکات وارده به خود حیوان ویروس‌های نهفته تکثیر یافته و بیماری را به شکل تک‌گیر اشاعه می‌دهند (۱۲، ۲۰).

میزان واگیری و تلفات در موارد مختلف متفاوت بوده و در گله‌های شیری کمتر از گاوهای پرواری گوشتی است به طوری که در گاوهای شیری میزان واگیری ۸درصد و تلفات ناشی از آن ۳ درصد می‌باشد در حالی که در گاوهای پرواری گوشتی واگیری حدود ۳۰-۲۰ درصد و به‌طور نادر ۱۰۰درصد می‌باشد. ویروس در بدن دام‌های بهبود یافته ممکن است مدت زیادی باقی بماند و خروج متناوب ویروس به وسیله ترشحات بینی تا ۱۷ ماه در دام‌هائی که به طور تجربی آلوده شده بودند گزارش گردیده است. ویروس در گاوهای پرواری بیش از سه سال باقی مانده و با ایجاد عوارض خفیف بالینی و ظهور پادتن‌های اختصاصی در سرم حیوانات قابل شناسایی است (۵).

پس از عفونت طبیعی و یا بعد از مایه‌کوبی به وسیله ویروس‌های تخفیف حدت یافته عوامل دستگاه ایمنی سلولی و هومورال فعال می‌شوند. میزان پاسخ‌های ایمنی هومورال را معمولاً بیان کننده آلودگی قبلی و وسیله غیر مستقیمی برای برآورد میزان مقاومت در برابر بروز علائم بیماری می‌دانند با وجود این میزان پادتن خنثی کننده در سرم معرف قابل اعتمادی برای مقاومت در

برابر شکل تنفسی بیماری نمی‌باشد. دام‌هائی که پادتن کمی دارند ممکن است به واسطه ایمنی سلولی مقاومت کافی در برابر بروز بیماری داشته باشند. پادتن‌های خنثی کننده ضد ویروس IgG و IgM هستند که چند روز بعد از ایجاد عفونت ایجاد می‌شوند (۸، ۱۱، ۱۳، ۱۸).

فعالیت ایمنی سلولی به علت فعالیت ویروس ۵ روز بعد از ایجاد آلودگی شروع شده و ۱۰-۸ روز پس از عفونت به حداکثر می‌رسد اگر چه پادتن‌های خنثی کننده در حیوان فاقد عفونت وجود ندارند ولی به نظر می‌رسد پاسخ‌های ایمنی سلولی مسوول بهبودی از هرپس ویروس‌ها هستند. ابتلاء به IBR باعث افزایش حساسیت حیوان به عفونت‌های ثانویه باکتریائی و تجمع این عوامل در ناحیه مجرای تنفسی می‌گردد از جمله این عوامل باکتریائی *Pasteurella haemolytica* می‌باشد. گاوهای ماده‌ای که سرم آنها واجد پادتن است از طریق آغوز آن را به گوساله‌های خود منتقل می‌کنند که بر حسب میزان پادتن از ۱ تا ۶ ماه در بدن گوساله باقی می‌ماند وجود پادتن مادری در گوساله می‌تواند تا سن ۶ ماهگی اثر مایه کوبی را خنثی نماید (۶، ۸، ۱۷، ۱۸).

سقط جنین از عوارض معمول بیماری است که معمولاً چند هفته پس از ابتلاء یا متعاقب واکسیناسیون با واکسن‌های زنده ایجاد شده و بیشتر در گاوهای ۸-۶ ماهه بروز می‌کند. پس از سقط، جفت اغلب در رحم باقی می‌ماند و دوران ناباروری حیوان چندان طولانی و مهم نیست ولی تورم رحم، نازائی، کوتاهی دوره فحلی بعد از تلقیح با اسپرم آلوده ممکن است بروز کند (۸، ۹، ۲۳).

در آزمایش هیستوپاتولوژی آماس نزله‌ای حاد در مخاطات دیده می‌شود گنجیدگی‌های ائوزینوفیلیک داخل هسته‌ای در هسته سلول‌ها و اطراف محل نکروزه وجود دارد. هجوم باکتری‌های ثانویه، واکنش نکروتیک شدیدتری را به همراه دارد که معمولاً به برونکوپنومونی منجر می‌گردد. در گوساله‌ها نکروز شدیدی در بافت پوششی مری و شیردان وجود دارد و اتصال سلول‌های نکروتیک به هم منظره شیر بریده را ایجاد می‌کند و در جنین‌های سقط شده هضم خودی[5] بافت‌ها، کم و بیش شدید بوده و در هیستوپاتولوژی کبد دارای تورم نکروتیک می‌باشد وجود انسفالیت ویروسی به وسیله جراحاتی به ویژه در قشر مغز و کپسول داخلی مشهود است (۸، ۱۹).

جداسازی ویروس عامل بیماری در کشت سلول و ردیابی پادتن در دوبار خونگیری، یکی در شروع بیماری و دیگری در دوره نقاهت برای تشخیص قطعی بیماری ضروری است. با استفاده از برخی روش‌های سرولوژی از قبیل روش پادتن‌های درخشان[6]، الایزا[7]، رادیو ایمنواسی[8]، ایمنوپراکسیداز[9]، ثبوت عناصر مکمل[10] و خنثی سازی سرم[11]، می‌توان حضور پادتن ضد ویروس را در سرم تعیین نمود. در روش خنثی سازی ویروس VN[12] ویروس عفونت‌زا پس از مجاورت با سرم حاوی پادتن ضد خود، خنثی شده و خاصیت عفونت‌زائی خود را از دست می‌دهد بدین صورت که پادتن‌ها به جایگاههای پادگنی سطح ویروس چسبیده و باعث خنثی شدن آن می‌گردند. اساس روش خنثی‌سازی ویروس بر پایه این واکنش می‌باشد. عیار ویروس مورد استفاده در آزمایش VN معمولاً ۵۰ TCID ۱۰۰ می‌باشد (۶، ۱۴، ۱۶، ۱۷).

به‌طور کلی معمول‌ترین روش پیشگیری از بیماری، واکسیناسیون است که امروزه واکسن‌های زیادی از ویروس ساخته شده است که به شیوه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریشه‌کنی بدون استفاده از آزمون‌های حساس که تشخیص دهند پادتن ایجاد شده مربوط به عفونت طبیعی یا واکسیناسیون است، غیرممکن می‌باشد (۱۰).

در این تحقیق تعداد ۸۷۴ نمونه به روش نمونه گیری خوشه‌ای - تصادفی از گاوداریهای مختلف شهرستان‌های شهرکرد، اردل، بروجن، فارسان و لردگان در استان چهار محال و بختیاری از گاوها در سنین مختلف اخذ شده است. آزمایش بر روی نمونه‌ها با استفاده از روش خنثی سازی سرم انجام شد در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات نیز از روش کای - اسکوئر و رگرسیون خطی استفاده گردید.

## مواد و روش کار

استان چهار محال و بختیاری در بخش مرکزی رشته‌کوه‌های زاگرس، بین پیشکوه‌های داخلی استان اصفهان واقع شده است و از شمال و مشرق به استان اصفهان، از مغرب به استان خوزستان و از جنوب به استان کهکیلویه و بویراحمد محدود می‌شود. استان چهارمحال و بختیاری ۱۴۸۲۰ کیلومتر مربع مساحت دارد. نگهداری گاو در استان به صورت صنعتی، بومی عشایری می‌باشد. طبق گزارشات شبکه دامپزشکی استان، در شهرستان شهرکرد حدود ۶۱۵۹۵ رأس، در شهرستان بروجن، ۱۵۳۹۶ رأس، در شهرستان فارسان ۲۵۶۳۸ رأس، در شهرستان لردگان ۲۷۸۷۹ رأس، در شهرستان اردل ۱۹۵۶۲ رأس و مجموعاً ۱۵۰۰۷۰ رأس گاو در کل استان وجود دارد.

## نمونه گیری

نمونه‌های مورد نیاز به طریقهٔ خوشه‌ای - تصادفی از گله‌های مختلف مناطق متفاوتی از شهرستان‌های استان تهیه شدند. تعداد نمونه‌های اخذ شده شامل ۸۷۴ نمونه می‌باشد که به صورت تصادفی از سنین مختلف تهیه گردید. نمونه‌ها پس از شماره‌گذاری و کدبندی در فریزر ۳۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند. در مورد هر نمونه اطلاعات مورد نظر از قبیل سن و جنس دام، محل و تاریخ نمونه‌گیری، نام صاحب دام، نحوه تغذیه دام، مدیریت بهداشتی دامداری، برنامه واکسیناسیون، سابقه سقط جنین در گله و وجود دامپزشک ناظر در دامداری ثبت می‌گردید.

## مواد مورد استفاده

محیط کشت سلولی استوکر، سرم جنین گاو[13]، پنی‌سیلین K، استرپتومایسین، تامپون PBS، تریپسین[14]، روسینات سدیم[15]، رنگ تریپان بلو[16]، تیره سلولی R-BK[17]، سویه ویروس IBR جدا شده در ایران.

## آزمون خنثی سازی سرم (SN)

از آنجایی که هرپس ویروس‌های گاو به خوبی در کشت‌های سلولی با منشاء گاو و همچنین کشت سلول کلیهٔ خوک، سگ، گوسفند، بز و اسب تکثیر می‌یابند و پس از ۲۰ تا ۹۶ ساعت CPE واضحی را در کشت‌های سلولی ایجاد می‌کنند، لذا برای انجام آزمون SN در این تحقیق از تیره سلولی R-BK استفاده گردید. ویروس IBR جدا شده در ایران پس از ۳-۴ روز CPE مناسبی را در این تیره سلولی ایجاد می‌نماید و محیط کشت سلولی مناسب برای رشد این تیره سلولی، محیط کشت استوکر می‌باشد، البته می‌توان پس از عادت دادن سلول در محیط کشت سلولی RPMI یا سایر محیط‌های مشابه نیز برای تکثیر سلول استفاده نمود. آزمون SN به روش لوله‌ای (ماکرو)[18] انجام گرفت.

کشت‌های سلولی R-BK به‌طور معمول در بطریهای «رو»[19] به میزان زیاد تهیه و به طور معمول هر چهار تا پنج روز یکبار پاساژ داده شدند. برای شروع کار در ابتدا یک بطری «رو» که سلول‌های آن واجد کیفیت مطلوب از نظر تراکم و زمان مناسب بود را انتخاب کرده و پس از تریپسینه کردن، سلول‌ها را در لوله‌های با درپوش لاستیکی کشت داده پس از علامتگذاری ثبت مشخصات به شکل خوابیده با زاویه مناسب در گرم خانه ۳۷، درجه سانتیگراد قرار می‌گرفتند. پس از سه روز کلیهٔ لوله‌ها از نظر کیفیت تشکیل لایه سلولی و عدم وجود آلودگی با استفاده از میکروسکوپ معکوس کنترل شده و لوله‌های حاوی سلول‌های مناسب جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب می‌گردیدند. در مرحله بعدی اقدام به عیارسنجی نمونه ویروسی به روش «رید و مانش»[20] گردید و در نهایت تعلیقی از ویروس حاوی ۱۰۰ TCID۵۰ تهیه و جهت انجام آزمون SN مورد استفاده قرار گرفت (۹، ۱۶).

## انجام آزمون SN

پس از غیر فعال سازی حرارتی نمونه‌ها در ۵۶ درجه حرارتی نمونه‌ها در ۵۶ درجه به مدت نیم ساعت، از هر نمونهٔ سرمی رقت $\frac{1}{8}$ در محیط استوکر تهیه نموده و سپس از هر رقت سرم به میزان نیم میلی لیتر برداشت کرده و با نیم میلی لیتر ویروس رقیق شده مخلوط و برای انجام عمل خنثی سازی لوله‌ها به مدت یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفتند. پس از طی این زمان به ازاء هر لوله از رقت‌های مختلف سرم یک بار شسته می‌شدند. پس از آماده سازی سلول‌ها از هر لوله حاوی سرم و ویروس به میزان ۰/۴ میلی لیتر برداشت کرده و به هر لوله کشت سلول منتقل و به مدت یک ساعت به شکل خوابیده درگرمخانه ۳۷ درجه قرار می‌گرفتند، سپس به هر کدام از لوله‌ها به میزان یک میلی لیتر محیط استوکر فاقد سرم اضافه کرده و پس از علامت گذاری به گرمخانه منتقل می‌گردیدند. برای هر سری آزمایش تعدادی لوله به عنوان شاهد ویروس، شاهد سرم و شاهد سلول در نظر گرفته می‌شد. برای شاهد سلول تعداد ۲ لوله حاوی کشت سلول مشابه سایر لوله‌ها انتخاب می‌شد که تنها محیط کشت این لوله‌ها تعویض شده و با محیط استوکر واجد ۲ درصد سرم جایگزین می‌گردید.

برای شاهد سرم قبلاً به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از سرم مثبت راکه به میزان $\frac{1}{8}$ رقیق شده بود با ۰/۲ میلی لیتر ویروس مجاور نموده و پس از گذشت یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه به دو لوله کشت سلول منتقل نموده

جدول شماره ۱- تعداد و درصد مواد مثبت آلودگی به ویروس IBR در آزمون SN در شهرستان‌های استان چهار محال و بختیاری

| شهرستان | شهرکرد | بروجن | فارسان | اردل | لردگان* | جمع |
|---|---|---|---|---|---|---|
| تعداد نمونه | ۳۹۰ | ۱۵۴ | ۱۵۶ | ۸۰ | ۹۴ | ۸۷۴ |
| مثبت SN | ۱۷۱ | ۷۸ | ۸۳ | ۴۱ | ۳۵ | ۴۰۸ |
| منفی SN | ۲۱۹ | ۷۶ | ۷۳ | ۳۹ | ۵۹ | ۴۶۶ |
| درصد مثبت SN | ٪۴۳/۸ | ٪۵۰/۶ | ٪۵۳/۲ | ٪۵۱/۲ | ٪۳۷/۲ | ٪۵۱/۷ |

p=۰/۰۶۶۶

جدول شماره ۲- درصد آلودگی به ویروس IBR در آزمون SN در فصول مختلف سال در استان چهار محال و بختیاری

| فصل | کل | مثبت | دصد |
|---|---|---|---|
| بهار | ۷۲ | ۳۳ | ۴۵/۸ |
| تابستان | ۱۹۵ | ۷۹ | ۴۰/۵ |
| پاییز | ۳۳۰ | ۱۴۵ | ۴۳/۹ |
| زمستان | ۲۷۷ | ۱۴۲ | ۵۱/۲۵ |
| کل | ۸۷۴ | ۴۰۸ | ۴۶/۶ |

p=۰/۰۸۶۶۸

جدول شماره ۳- تعداد و درصد آلودگی گاوهابه ویروس IBR در آزمون SN در جنس نر و ماده در استان چهارمحال و بختیاری

| جنس | کل | مثبت | درصد |
|---|---|---|---|
| ماده | ۸۱۸ | ۳۸۸ | ۴۷/۴ |
| نر | ۵۶ | ۲۰ | ۳۵/۷ |
| کل | ۸۷۴ | ۴۰۸ | ۴۶/۶ |

p=۰/۰۸۶۶۸

جدول شماره ۴- تعداد و درصد آلودگی به ویروس IBR در گاوهای واجد برنامه واکسیناسیون منظم در مقایسه با گاوهای فاقد برنامه واکسیناسیون منظم در استان چهار محال بختیاری.

| برنامه واکسیناسیون | کل | مثبت | درصد |
|---|---|---|---|
| انجام واکسیناسیون | ۸۳۹ | ۳۹۱ | ۴۶/۶ |
| فاقد واکسیناسیون | ۳۵ | ۱۷ | ۴۸/۵ |
| کل | ۸۷۴ | ۴۰۸ | ۴۶/۶ |

p=۰/۰۹۵۵

جدول شماره ۵- تعداد و درصد آلودگی به ویروس IBR با آزمون SN در گاوهایی که سقط جنین داشته‌اند در مقایسه با گاوهایی که سقط جنین نداشته‌اند در استان چهارمحال و بختیاری

| | واجد سابقه سقط | فاقد سابقه سقط | کل |
|---|---|---|---|
| مثبت | ۱۹ | ۳۶۹ | ۳۸۸ |
| منفی | ۱۰ | ۴۲۰ | ۴۳۰ |
| کل | ۲۹ | ۷۸۹ | ۸۱۸ |

p=۰/۰۷۲۴

جدول شماره ۶- تعداد و درصد موارد مثبت آلودگی به ویروس IBR در آزمون SN در گاوه‌های مختلف سنی در استان چهارمحال و بختیاری

| گروه سنی | کل | مثبت | درصد |
|---|---|---|---|
| ۱-۰ | ۸۰ | ۱۴ | ۱۷/۵ |
| ۲-۱ | ۱۲۰ | ۲۴ | ۲۰ |
| ۳-۲ | ۱۲۴ | ۳۶ | ۲۹ |
| ۴-۳ | ۱۵۱ | ۹۳ | ۶۱/۶ |
| ۵-۴ | ۱۵۸ | ۸۴ | ۵۳/۱ |
| ۶/۵ | ۹۵ | ۴۹ | ۵۱/۶ |
| ۷/۶ | ۸۰ | ۶۲ | ۷۷/۵ |
| ۸-۷ | ۴۴ | ۳۲ | ۷۲/۸ |
| ۸ و بالاتر | ۲۲ | ۱۴ | ۲۸/۷ |
| کل | ۸۷۴ | ۴۰۸ | ۴۶/۷ |

p=۰/۰۰۱

همزمان در مجاور سایر لوله‌های آزمایش به مدت یک ساعت گرمخانه گذاری جهت انجام واکنش بین ویروس و پادتن به آنها نیز محیط کشت اضافه می‌شد. برای شاهد ویروس از نمونه ویروسی اولیه یک رقت $\frac{1}{10}$ تهیه کرده و سپس از این نمونه رقتهای $\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{40}$ و $\frac{1}{80}$ و $\frac{1}{160}$ و $\frac{1}{320}$ تهیه می‌گردید، از ۵ لوله آخر به میزان ۰/۲ میلی لیتر برداشت کرده و به سلول‌های آماده شده از قبل اضافه نموده و پس از گذشت یک ساعت در ۳۷ درجه منتقل می‌شد. پس از گذشت ۴ روز واکنش‌های انجام شده در هر لوله با استفاده از میکروسکوپ معکوس بازدید می‌گردید. به هنگام قرائت نتایج در ابتدا کلیه لوله‌ها را ظاهراً از نظر آلودگی‌های احتمالی قارچی یا میکروبی که باکدورت مایع کشت سلول و مشاهده پرگنه‌های قارچی در مایع کشت سلول مشخص می‌شدند راکنترل کرده و موارد آلوده را خارج، سپس لوله‌های شاهد مورد بررسی قرار می‌گرفت. لوله‌های شاهد سلول می‌باید دارای لایه سلولی کامل و فاقد CPE باشند سپس لوله‌های شاهد ویروس قرائت می‌شدند. لوله اول که حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر ویروس بود طبعاً CPE واضحی را ایجاد می‌نمود، لوله‌های دوم، سوم، چهارم و پنجم به ترتیب حاوی ۲/۵، ۱/۷۵، ۰/۸۷۵ و ۰/۴۳۷ TCID۵۰ ویروس بودند، لذا در لوله‌های اول، دوم و سوم CPE ایجاد شده اما در لوله‌های چهارم و پنجم CPE ایجاد نخواهد شد (۶، ۱۸) پس از قرائت شاهدها نوبت به قرائت نتایج حاصل از نمونه‌ها می‌رسد. هر کدام از لوله‌ها که CPE در آن ایجاد نشده بود به عنوان عیار سرم یادداشت می‌شد. از آنجایی که برای هر نمونه دو سری رقت استفاده شده بود، اگر اختلافی بین دو سری رقت مشاهده می‌شد معدل آن در نظر گرفته می‌شد. اگر احیاناً یکی از لوله‌ها به علت آلودگی خارج شده بود نتیجه آن در محاسبه عیار به حساب آورده نمی‌شد. کلیه نمونه‌های واجد عیار $\frac{1}{8}$ به بالا جهت انجام آزمایشات بعدی و تعیین عیار نهایی استفاده می‌گردید.

## نتایج

متعاقب انجام آزمون SN با استفاده از تیره سلولی R-BK و سویه ویروس IBR جدا شده در ایران بر روی نمونه سرم که از نقاط مختلف استان تهیه شده بود، مشخص گردید که از ۸۷۴ نمونه سرم تعداد ۴۰۸ نمونه در آزمون SN با عیار $\frac{1}{8}$ و بالاتر دارای پاسخ مثبت هستند، با توجه به این یافته‌ها میزان کل آلودگی در این استان برابر با ۴۶/۶۸٪ برآورد می‌گردد. در تجزیه و تحلیل آماری، اختلاف معنی‌داری بین میزان آلودگی در شهرستان‌های استان وجود ندارد (جدول و نمودار ۱).

چنانچه اطلاعات موجود در جدول ۲ نیز نشان می‌دهند میزان آلودگی در فصل بهار ۴۵/۸ در تابستان ۴۰/۵ در پاییز ۴۳/۹ و در زمستان ۵۱/۲۵ درصد برآورد گردیده است که ظاهراً زمستان آلودگی زیادتری را نشان می‌دهد ولی تجزیه و تحلیل آماری حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار از نظر میزان آلودگی در فصول مختلف می‌باشد. از ۸۷۴ نمونه سرمی تهیه شده از سطح استان تعداد ۸۱۸ نمونه مربوط به گاوهای ماده و تعداد ۵۶ نمونه مربوط به گاوهای نر بودند که میزان آلودگی در گاوان ماده ۴۷/۴٪ و در گاوهای نر برابر ۳۵/۷٪ برآورد گردید که در تجزیه و تحلیل آماری بین جنسیت و میزان

آلودگی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

در این بررسی از وجود برنامه واکسیناسیون منظم در سطح گاوداری‌های مورد بررسی به عنوان یک فاکتور دخیل در مدیریت بهداشتی و تأثیر آن بر میزان آلودگی استفاده گردید بر همین مبنا از بین ۸۴۷ نمونه مورد آزمون ۸۳۹ مورد دارای برنامه منظم واکسیناسیون البته نه علیه بیماری IBR بلکه علیه سایر بیماری‌های دیگری از قبیل بروسلوز طاعون و تب برفکی بودند که از این تعداد ۳۹ مورد (۴۶/۶٪) آلودگی را از خود نشان دادند در حالی که از بین ۳۵ نمونه فاقد برنامه واکسیناسیون ۱۷ مورد (۴۸/۵٪) آلوده بودند در تجزیه و تحلیل آماری بین میزان آلودگی و انجام یا عدم انجام واکسیناسیون اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

از آنجایی که یکی از عوارض بیماری IBR سقط جنین می‌باشد در این بررسی نیز به دنبال یافتن ارتباطی بین سابقه سقط جنین و آلودگی با ویروس IBR بودیم به همین خاطر یکی از سوالات موجود در متن پرسشنامه سابقه سقط جنین در گاوداری مورد نظر بوده است و تنها گاوهای ماده مورد توجه قرار گرفته‌اند، در کل استان از بین ۸۱۸ نمونه سرمی ۲۹ مورد دارای سابقهٔ سقط جنین و ۷۸۹ مورد فاقد سابقه سقط بوده‌اند در بین ۲۹ مورد واجد سابقه سقط ۱۹ مورد (۶۵/۵٪) دارای واکنش سرمی مثبت و ۱۰ مورد منفی و از بین ۷۸۹ مورد فاقد سابقه ۳۶۹ مورد (۴۶/۷٪) دارای واکنش سرمی مثبت و ۴۲۰ نمونه منفی بوده‌اند. در تجزیه و تحلیل آماری بین میزان آلودگی و سابقه سقط جنین اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

در این بررسی همه سعی بر آن بود که از گروه‌های سنی مختلف بسته به فراوانی در جمعیت نمونه سرمی تهیه گردد، به همین خاطر نمونه‌های تهیه شده به ۹ گروه سنی ۱-۰ سال، ۳-۲ سال، ۴-۳ سال، ۵-۴ سال، ۶-۵ سال، ۷-۶ سال، ۸-۷ سال و ۸ سال به بالا تقسیم شدند که در جدول ۶ نشان داده شده‌اند. پس از انجام آزمون SN کمترین میزان آلودگی در گروه سنی ۱-۰ سال با ۱۷/۵٪ آلودگی و بیشترین آلودگی در گروه سنی ۶ تا ۷ سال با ۷۷/۵٪ بود ولی شیب خط رگرسیون حاکی از ازدیاد میزان آلودگی به ازاء افزایش سن می‌باشد که در نمودار ۶ نشان داده شده است.

## بحث

عفونت‌های هرپس ویروس از تمامی قاره‌های جهان و اکثر کشورهای دنیا گزارش شده‌اند. به علت طبیعت خاص این بیماری‌ها و پنهان بودن چهره بالینی بیماری، عدم بروز علائم بالینی جالب توجه در بررسی‌های بالینی و پیچیدگی‌های تشخیص آزمایشگاهی، هیستوپاتولوژیک و ایمنوهیستوشیمی، این بیماری، گسترش بسیار وسیع در کشورهای مختلف داشته و عموماً گزارش‌های اولیه درهر کشوری مبنی بر آزمون‌های سرولوژی و به ویژه آزمون SN بوده است. اما اگر با دیدی عمیق‌تر به این گونه بیماری‌ها خصوصاً در طولانی مدت توجه شود به اهمیت فوق‌العاده این بیماری در صنعت گاوداری پی برده خواهد شد. نکاتی چون، وجود دام‌های آلوده‌ای که ویروس را طی دوره بیماری به سایر حیوانات منتقل می‌نمایند. وجود گاوهای مبتلا به عفونت مخفی و نمایان شدن علائم بالینی بیماری به محض بروز استرس. احتمال آلودگی از طریق فرآورده‌های بیولوژیک مثل واکسن‌های زنده. انتقال از طریق اسپرم آلوده در هنگام تلقیح. توجه به نقش جوندگانی که به عنوان مخازن مورد توجه قرار گرفته‌اند. همه این موارد به نحوی در کشورهایی که بیماری در آنها حضور فعال دارد به صورت‌های مختلف گزارش شده و مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴، ۵، ۱۷).

نظر به وفور مشاهده مواردبالینی متعدد در سطح استان چهار محال و بختیاری این بررسی به منظور تعیین میزان آلودگی با ویروس BHV-1 در شهرستان‌های استان چهار محال و بختیاری انجام گرفت. در شهرستان‌های فوق گاوداری به دو صورت صنعتی و سنتی وجود دارد که نمونه‌های تهیه شده مربوط به هر دو نوع دامپروری می‌باشد. متعاقب استخراج و ثبت نتایج حاصل از آزمایشات، با توجه به اطلاعات مستخرج از برگه‌ها و ثبت سوابق، کلیه یافته‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری (Instant) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

با توجه به جمعیت ۱۵۰۰۰۰ رأسی گاو در استان و از طرفی با توجه به حجم ۴۶/۶۸ درصدی آلودگی در این استان می‌توان به گسترش چشمگیر بیماری در این منطقه اشاره نمود. در تجزیه و تحلیل آماری با سطح اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی‌داری بین شهرستان‌ها و آلودگی به ویروس IBR مشاهده نگردید. (جدول و نمودار ۱) این نکته حاکی از عدم دخالت عوامل جغرافیایی یا منطقه‌ای خاص در رابطه با چگونگی گسترش بیماری IBR است.

با توجه به اطلاعات موجود در جدول ۲ که میزان آلودگی را در فصل‌های مختلف سال نشان می‌دهد در نگاه اول فصل زمستان با ۵۱/۲۵٪ آلودگی بیشتری را نسبت به سایر فصل‌ها و فصل تابستان با ۴۰/۵٪ آلودگی کمتری را نسبت به سایر فصل‌ها نشان می‌دهد که با تجزیه و تحلیل آماری در آزمون کای دو با سطح معنی‌دار بودن ۹۵درصد و درجه‌آزادی ۱ و P معادل ۰/۱۱۸۳ اختلاف معنی‌داری بین آلودگی به ویروس IBR در فصل زمستان و سایر فصول مشاهده نمی‌گردد. البته در برخی از متون وقوع بیماری را در فصول سرد سال زیادتر از سایر فصول می‌دانند که به علت افزایش تراکم و افزایش شانس تماس گاوهای بیمار با سالم بوده و استرس سرما را نیز در این زمینه دخیل دانسته‌اند (۶، ۸).

باتوجه به اطلاعات موجود در جدول ۳ که در آن رابطه بین جنسیت و میزان آلودگی مورد توجه قرار گرفته است مشاهده می‌گردد که در بین جمعیت گاوهای ماده آلودگی برابر با ۴۷/۴ درصد و در بین گاوهای نر برابر با ۳۵/۷ درصد می‌باشد. جدول ۳ در تجزیه و تحلیل آماری به روش کای اسکوار با سطح اطمینان ۹۵ درصد و درجه آزادی ۱ و P، معادل ۰/۱۱۸۳ اختلاف معنی‌دار بین جنسیت و میزان آلودگی مشاهده نمی‌شود. نکته حایز اهمیت در این میان آن است که متوسط جمعیت گاوهای نر مورد مطالعه از گاوهای ماده کمتر بوده و به نظر می‌رسد این اختلاف ظاهری ناشی از عام همسانی گروه‌های مورد مطالعه و وجود فاکتور مخدوشگر سن، بوده است به همین منظور میزان آلودگی در هر جنس در گروه‌های هم‌سن مورد مطالعه قرار گرفت و در نهایت مشخص گردید که در گروه‌های هم سن نیز از نظر میزان آلودگی با ویروس IBR اختلاف معنی‌داری در بین جنس‌نر و ماده وجود ندارد (۸).

همانگونه که در جدول ۴ اشاره شده است میزان آلودگی در بین گاوهای دارای سابقه واکسیناسیون ۴۶/۶ درصد و در بین گاوهای فاقد سابقه واکسیناسیون ۴۸/۵ درصد می‌باشد. در تجزیه و تحلیل آماری به روش کای دو و با سطح اطمینان ۹۵ درصد و P، ۰/۹۹۵ اختلاف معنی‌داری بین سابقه واکسیناسیون برعلیه بیماری‌های معمول و شیوع بیماری IBR مشاهده نمی‌شود. بررسی این عامل در شیوع بیماری از جنبه‌های مختلف می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.واکسیناسیون منظم خود به عنوان یک شاخص بهداشتی و مدیریتی در سطح گاوداری مطرح است و در نگاه اول به نظر می‌رسد که توجه به این شاخص می‌تواند تا حدی گویای پایین بودن شیوع ظاهری در رابطه با بیماری‌ها در گله باشد.

در کلیه متون دامپزشکی به ویروس IBR به عنوان یکی از عوامل دخیل در سندرم سقط جنین گاو اشاره شده است. در این بررسی نیز به دنبال یافتن ارتباطی بین سابقه سقط جنین و آلودگی بودیم به همین دلیل پرسشی در زمینه سابقه سقط در مورد مطالعه در پرسشنامه مطرح شد و از آنجایی که احتمال وقوع سقط تنها در بین گاوهای ماده ممکن است جمعیت گاوهای نر اعم از منفی یا مثبت از جمعیت مورد مطالعه در این قسمت حذف گردیدند در کل نمونه‌ها میزان آلودگی در بین گاوهای دارای سابقه سقط جنین ۶۵/۵ درصد و در بین گاوهای فاقد سابقه سقط جنین ۴۶/۷ درصد برآورد شد و در تجزیه و تحلیل آماری در آزمون کای دو با سطح اطمینان ۹۵ درصد و P معادل ۰/۰۷۲۴ اختلاف معنی‌داری بین آلودگی به ویروس IBR و سقط جنین مشاهده نشد (۸، ۲۳).

از آنجایی که در بیماری‌های عفونی که به طور مستقیم موجب مرگ و میر حیوانات نمی‌شوند، به موازات افزایش سن به دلیل افزایش احتمال برخورد با جرم بیماری‌زا احتمال رخ داد آلودگی در بین حیوانات زیادتر می‌شود، بسیاری از محققین افزایش میزان آلودگی را به موازات افزایش سن مورد توجه قرار داده‌اند. در این بررسی نیز به موازات افزایش سن میزان آلودگی از ۱۷/۵ درصد در گروه سنی ۱-۰ سال به ۷۲/۷ درصد در گروه سنی ۸-۷ سال به بالا رسیده است. در تجزیه و تحلیل آماری به روش کی دو ارتباط معنی‌داری بین افزایش سن و افزایش آلودگی مشاهده می‌گردد و با توجه به نمودار شماره ۶ وجود ارتباط خطی بین افزایش سن و میزان آلودگی کاملاً مشهود می‌باشد که البته دور از انتظار هم نیست. نکته قابل توجه در این میان این است که در گروه سنی ۱-۰ سال تنها از گوساله‌هایی خون گیری به عمل آمده که دارای سن ۶ ماه به بالا باشند تا احیاناً اثر پادتن‌های مادری منتقل شده به واسطه آغوز در آزمون‌های سرولوژیک از بین برود و تنها گوساله‌هایی که به طور طبیعی آلوده شده‌اند مورد توجه قرار گیرند (۲۳).

با توجه به جمیع شرایط ذکر شده و همچنین مدنظر قرار دادن این نکته که در بسیاری از گله‌های آلوده منشاء آلودگی میتواند گاوهایی باشند که مبتلا به شکل مخفی بیماری هستند و چنین گاوهایی در آزمون‌های سرولوژیک پاسخ منفی نشان می‌دهند لذا یکی از مهمترین عوامل که در بررسی‌های اپیدمیولوژیک در

مورد بیماری IBR می‌بایستی مورد توجه قرار گیرد استفاده از آزمون‌های سرولوژیک جهت ردیابی پادتن‌های سرمی و آزمون‌های بیولوژیکی مولکولی جهت ردیابی پادگن‌های ویروس است (۴، ۶، ۱۴، ۲۴).

## پاورقی‌ها

1- Inclusion Bodies
2- Cytopathic Effects
3- Latent
4- Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)
5- Autolysis
6- Fluorecent Antibody
7- Enzyme linked Immuno Surbant Assay (ELISA)
8- Radio Immuno Assay (RIA)
9- Immuno Peroxidase (IP).
10- Complemant Fixation Test (CFT)
11- Serum Nutralization (SN)
12- Virus Nutralization (VN)
13- Fetal Calf Serum
14- Trypsin
15- EDTA, Na
16- Trypan Blue
۱۷- تیره سلولی R-BK توسط دکتر خدمتی در مؤسسه رازی تهیه شده و در بخش ویروس شناسی استفاده می‌شود.
18- Macroneutralization.
19- Roux Bottle.
20- Reed & Muench.

## منابع مورد استفاده


۱- حضرتی، عباس، ۱۳۵۴. هرپس ویروس‌های گاوی و نقش بیماریزائی آنها، نشریه شماره ۲۲ سازمان تحقیقات کشاورزی، انستیتو رازی.
۲- کیوانفر. هادی، کریمی، ناصر، ۱۳۷۶. ویروس شناسی دامپزشکی (ترجمه)، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۸۰-۴۲.
۳- کیوانفر، هادی، همت‌زاده، فرهید، محمودیان. علیرضا، ۱۳۸۰، ویروس شناسی دامپزشکی بیولوژی ویروس‌ها، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۱۸.
۴- همت‌زاده، فرهید، ۱۳۸۰، ارزیابی تهیه کیت ایمونوفلئورسنت جهت تشخیص سرمی آلودگی به ویروس IBR، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۲ دوره ۵۶.
5- Ackermann. M. Weber. H, Welyer. R. 1990. Aspects of IBR eradication Programmes in a fattening cattle farm, preventive veterinary medicine 9:2, 121-130.
6- Babiuk. L.A, Drunen. S, Tikoo. S.K 1996. Immunology of bovine herpes virus type 1, Veterinary microbiology 53, 31-34.
7- Belsh. R, Louis. S. 1991. Text book of human virology, 2nd ed, Mosby year book, 822-925.
8- Blood-DC; Radostits - OM; Arundel. JH Gay-CC. 1998. Veterinary medicine. Seventh edition. Bailliere tindal publication. 1998. pp947-948.
9- Castro. AE, Huschele. WP. 1992. Veterinary diagnostic virology, Mosby year Book, 103-106.
10- Donnal. L, Hytching. S. 1990. Lymphocyte prolifrative responses to seperated BHV-1 proteins immune cattle, Veterinary record 42, 5114-5122.
11- Espuna. F, Vendrell. J. Artigas. C. 1988. IBR in dairy cattle serological study, Veterinary medicine 5:10, 305-499.
12- Erglea M. Ackermann. M. 1990. Pathogenesis of ruminant herpes virus infection, Veterinary microbiology 53, 3-15.
13- Granutova. M, Psikol. I. 1998. Cell medicated immunity in calves immunized or infected with IBR, Veterinary medicine 34:7, 385-394.
14- Hemmatzadeh F. 2001. Development of an immunofluorecnt kit for IBR serodiagnosis. Abstract book of first ESVV veterinary herpesvirus symposium, Zurich, switzerland.
15- Koashoek M.J, Rijsew J.K, Oirschat J.T. 1996. Persistance of antibodies against BHV-1 and virus reactivation two to three years after infection, Veterinary microbiology 53, 103-110.
16- Mahy B.W. Kangro H.O, 1996. Virology methods manual. Acadamic press. 343-351.
17- Martin. S.W, Bateman. K.G, Showen P.E. 1989. The frequency distribution and effects of antibodies to seven putative respiratory pathogen, Canadaian journal of veterinary research 53: 3, 355-362.
18- Martin. W.B, Castracci G, Ferrari. M. 1990. A serological comparision of some animal herpes viruses, comp. Immune microbial 13:2, 75-84.
19- Murphy. F.A, Paul. f, Gibbs. J, Horzink. M.C, Studdert. M.J. 1999. Veterinary virology, Third edition Academic press inc 345.
20- Pritchard G, Cook N, Bank. S.M. 1997. IBR/IPV in cattle, Veterinary Record 140: 22, 587.
21- Schwyzer M, Ackermamn M. 1996. Mollecular virology of ruminant herpesviruses, Veterinary microbiology 53, 17-29.
22- Silim A, Elazhary M.A. 1988. Detection of IBR and BVD in the nasal epithelial cells by the direct immunoflurescence technique, Can J, comp med 42:6, 18-22.
23-Timoeny. JF, Gillespie. JH, Scott. FW, Barlough, JE. 1992. Hagan and Bruner's Microbiology and infectious disease of domestic Animal. 8th ed. Comstock -publishing association, Cornel university. pp 591-594.
24- Thiry E., Wellemans G. Limbourg B. Brocs A. 1992. Effect of repeated intradermal injections of BHV antigen on seronegative cattle, Journal of veterinary record. 130, 372-375.