Assiut Vet. Med. J. Vol. 58 No. 134 July 2012

INVESTIGATION OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE -1- (BHV-1) ANTIBODIES IN SYRIAN CATTLE

S.Y. AL-BAROODI , A. KURDI , and A. ALOMAR
Dept. of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Al-Baath University, Syria Arab Republic.

ABSTRACT

Received at:11/6/2012

Accepted at: 5/7/2012

In order to investigate sero-prevalence of Bovine Herpesvirus-1- antibodies in dairy cattle farms in Syria , 230 serum samples were collected from cattle. The age , sex, and relationship with percentage of infection with Bovine herpesvirus-1- were studied by using Competitive Enzyme Linked Immunosorbant assay (cELISA) and Neutralization test(NT).The total percentage of seropostive cattle was 45.21% by using cELISA ,while the lowest percentage was recorded 36.09% by using NT . The results indicated the high infection were found in Gub Ramla 60%, while the lowest percentage was detected in Zerba 30% by using both tests . Results showed high percentage of acute infection in the age less than 6 months to both sex, while, the high percentage of chronic infection recorded in female (2<- 4 years) .No chronic infection recorded in young of both sex calves .High percentage of acute infection detected in Jourin , while high percentage of chronic infection recorded in Gub Ramla .Comparison between the two tests used in this study , showed that high percentages of infection in cELISA ,while in NT recorded less percentages. The high percentage of infection appear in cattle aborted in the 2nd trimester of pregnancy when compared with other ones , high percentage was recorded in cattle which suffer from reproductive disorders . The high percentage of infection with Bovine herpesvirus-1- recorded in animals which suffer from respiratory signs, while the lowest infection rate recorded in healthy one, without any significance of variance.

Key Words: *Bovine herpesvirus-1-Enzyme Linked Immunosorbent Assay-Competitive –serum Neutralization test-Immunoglobulin IgM-Immunoglobulin IgG-Acute infection-Chronic infection.*

التقصي عن أضداد الفيروس الحلئي البقري النمط -١- في الأبقار في سوريا

صفوان يوسف البارودي ، عزام كردي ، أنور العمر

تم جمع (٢٣٠)، عينة مصل من ١١ محطة للأبقار بهدف التقصي عن أضداد الفيروس الحلئي البقري النمط-١- وتحديد نسبة الإصابة وعلاقتها بالعمر والجنس وذلك باستخدام اختباري المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم – التنافسي واختبار التعادل المصلي ، تبين من خلال النتائج أن نسبة الإصابة الإجمالية في سوريا كانت (٤٥,٢١%) بالمقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم فيما كانت اقل من ذلك باستخدام التعادل المصلي (٣٦,٠٩%) أظهرت النتائج أن أعلى نسبة إصابة كانت في محطة جب رملة (٦٠%) فيما سجلت اقل نسبة إصابة في محطة الزربة (٣٠%) لكلا الاختبارين ، لوحظ من خلال النتائج أن أعلى نسبة إصابة حادة كانت في الأعمار الأقل من ستة شهور لكلا الجنسين ، فيما كانت أعلى إصابة مزمنة في الإناث التي تراوحت أعمارها اكبر من سنتين وحتى ٤ سنوات فيما لم تسجل أي إصابة مزمنة في العجول صغيرة العمر ولكلا الجنسين ، أشارت نتائج الفحص المصلي لمحطات الأبقار أن أعلى نسبة إصابة حادة كانت لمحطة أبقار جورين فيما سجلت محطة أبقار جب رملة أعلى نسبة إصابة مزمنة. ومن خلال المقارنة بين الاختبارين المستخدمين في الدراسة تبين أن أعلى نسبة إصابة كانت لاختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم ، في حين كانت نسب الإصابة باستخدام اختبار التعادل المصلي اقل من ذلك. تبين من خلال الدراسة أن أعلى نسبة إصابة في الأبقار التي أجهضت في الثلث الثاني من الحمل مقارنة بمجاميع أجهضت في الثلث الأول والثالث، بينما كانت نسب الإصابة في الأبقار التي تعاني من الإجهاض أعلى من التي تعاني من مشاكل تناسلية أخرى. لوحظ من خلال دراسة العلاقة ما بين نسبة الإصابة بالفيروس الحلئي البقري النمط-١- بالأعراض المرضية الظاهرة على الحيوانات أن أعلى نسبة إصابة كانت في الحيوانات التي عانت من مشاكل تنفسية ، بينما سجلت اقل نسبة إصابة في الحيوانات التي كانت سليمة ظاهريا ومن دون وجود فروق معنوية إحصائيا.

INTRODUCTION
المقدمة

يعد الفيروس الحلئي البقري النمط -١ - Bovine herpesvirus-1-(BoHV 1,BHV 1) احد الفيروسات الحلئية Herpesviruses والتي تعود إلى عائلة الفيروسات الحلئية Herpesviridae والى الجنس Varicellovirus ينتشر هذا الفيروس في أنحاء كثيرة من بلدان العالم

ولأهميته من الناحية البيطرية صنف ضمن اللائحة B لمنظمة الصحة العالمية World Organization Animal Health (OIE) لذلك اتخذت الكثير من بلدان العالم نظم سيطرة وقضاء Eradication للتخلص منه (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2009).

يسبب الفيروس أمراضا عديدة في الأبقار منها : التهاب القصبات والرغامي الخمجي البقري Infectious Bovine Rhinotrachitis (IBR) والتهاب الفرج والمهبل البثري الخمجي في الإناث Infectious Pustular Vulvovaginitis (IPV) والتهاب الحشفة والقضيب البثري الخمجي في الثيران Infectious Pustular Balanopsthitis(IPB) فضلا عن الأعراض الجهازية الأخرى (Benoit *et al.*, 2007) للمرض خصائص معدية كثيرة تسبب خسائر اقتصادية فادحة إلا أن احد أهم الخصائص الوبائية لهذا الفيروس هو قدرته على إحداث الإصابة الكامنة Latent Infection في النهايات العصبية Terminal Ganglia بعد الإصابة الأولية ، حيث أن الحيوانات التي تحدث فيها إصابة كامنة تبقى طيلة حياتها حاملة للفيروس وطارحة له ، ترتفع كمية الفيروس المطروح من قبل الحيوانات المصابة بعد إعادة تنشيط الإصابة الكامنة Reactivation وذلك لأسباب عديدة منها : إجهاد النقل ، التحصين، الولادة ، إعطاء بعض العقاقير منها الستيرودات القشرية Corticosteroids (Clinton and Shafiqul, 2008).

ينتقل الفيروس عادة عن طريق الرذاذ الملوث بالفيروس من الحيوانات المصابة فضلا عن الماء والعلف الملوثين بالسيلانات التنفسية أو المهبلية وينتقل كذلك عن طريق التلقيح الطبيعي أو عن طريق السائل المنوي الملوث بالفيروس والمستخدم في التلقيح الاصطناعي فضلا عن نقل الأجنة (Deka *etal.*, 2005) يتكاثر الفيروس بعد دخوله للجسم خلال فترة حضانة تبلغ ٣-٥ أيام في أنسجة البطانة المخاطية للجهاز التنفسي أو التناسلي ومن ثم تبدأ مرحلة انتشار الفيروس في الدم Viremia إلى بقية أعضاء الجسم حيث تبدأ بعدها مرحلة ظهور الأعراض المرضية ، يتمركز بعدها الفيروس في الجهاز العصبي المحيطي في العقيدات العصبية وكذلك في الأنسجة المخاطية لتبدأ بعدها مرحلة الكمون وفي حال توافر الظروف الملائمة تعاد عملية إعادة تنشيط الإصابة (Ezzi *et al.*, 2011).

ولأهمية الفيروس من الناحية الاقتصادية فقد بدأت الكثير من الدول نظاما للسيطرة عليه وأخذت تتبع برامج للتشخيص ومن ثم السيطرة واستبعاد الحيوانات المصابة وذلك من خلال إتباعها نظام للتفريق ما بين الإصابة والتلقيح Differentiating Infection from Vaccinated Individual (DIVA) وأخذت تطور أنواعا من اللقاحات للتخلص من مشكلة التأشب Recombination (Maria *et al.*, 2011)، إن نظام التفريق ما بين الإصابة والتلقيح يعتمد في التشخيص على عدة معايير واختبارات حيث كان الهدف منه هو السيطرة وانتقاء الحيوانات المصابة لغرض استبعادها واختيار الاختبار الأمثل في ذلك فضلا عن الهدف الاقتصادي الأسمى وهو تصدير حيوانات خالية من المرض ، حيث اعتمدت في ذلك اختبارات عديدة لغرض المقارنة في كفاءتها ودقتها واعتماد الأفضل منها في التقصي عن الأضداد الناجمة عن الإصابة وتفريقها عن الأضداد الناجمة عن التلقيح حيث استخدم في ذلك تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من النوع التنافسي Competitive ELISA باستخدام البروتينات السكرية Glycoprotein كمستضد مرجعي وبأنواع عديدة منها (gB,gE,gC) واختبار التعادل المصلي Neutralization test(NT) وتقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من النوع الغير مباشر Indirect ELISA واختبار حلقة الحليب Ring test المعتمد من قبل Scientific Veterinary Committee Group Organized (Julien *et al.*, 2006).

لذلك تمت هذه الدراسة نظرا لعدم وجود دراسة تتناول نسبة الإصابة في محطات الأبقار في سوريا حيث كانت تهدف إلى: البرهان عن الأضداد النوعية للفيروس لكلا النمطين (IgG, IgM) باستخدام اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من النوع التنافسي Competitive ELISA في كلا الجنسين وبمختلف الأعمار ومقارنة حساسيته باختبار التعادل المصلي.

MATERIALS and METHODS
المواد وطرائق البحث

١-الحيوانات Animals:

تمت زيارة ١١محطة للأبقار التابعة لوزارة الزراعة -المؤسسة العامة للمباقر حيث شملت (جب رمله، جورين ، حمص ، فيديو ، طرطوس ، درعا ، الغوطة ، الزربة ، مسكنة ، تل تمر ، دير الزور) تم عمل استمارة فحص سريري لكل زيارة لهذه المحطات لغرض جمع البيانات التالية عن الحيوان حيث شملت (عمر الحيوان ، الجنس ، وجود إجهاض ، وقت حدوث الإجهاض ، نوع الإجهاض ، وجود علامات مرضية (تنفسية ، عينية ، تناسلية ، عصبية ، هضمية ، التهاب ضرع ، إصابات مزدوجة بأكثر من عرض سريري أو كون الحيوان سليم ظاهريا) .

٢-جمع العينات Sample collection:

تم جمع ٢٣٠ عينة دم من وريد الذيل حيث تم وضعها في أنابيب زجاجية معقمة مفرغة من الهواء ومن ثم وضعت الأنابيب في حافظة خاصة لنقل العينات مبردة ونقلت بعد ذلك إلى مخبر الجراثيم -قسم الأحياء الدقيقة-كلية الطب البيطري-جامعة البعث ، ثفل الدم في جهاز المنبذة ٣٥٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ١٠ دقائق ، ثم فصل المصل عن الخثرة ووضع في أنابيب ابندروف لحفظ المصل ومن ثم علمت حسب رقم الحيوان واسم المحطة وحفظت عند الدرجة -٣٠ م ه لحين إجراء الاختبارات المصلية عليها. (Rai,2005).

٣- الاختبارات المصلية Serological tests:

أولا: تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم من النوع التنافسي غير المباشر

In-Direct Competitive Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (CI-ELISA) تم استخدام عتيدة هذا الاختبار العائدة لشركة Labor Diagnostik Leipzig الألمانية لغرض التقصي عن الغلوبيولينات المناعية بنوعيها وكالاتي :

- الكواشف والمحاليل الكيميائية والمواد المستخدمة:

* الصفيحات الدقيقة Micro Plates والتي تكون حاوية على ١٢ شريط وكل شريط يكون حاويا على ٨ حفر ، تكون هذه الحفر مطلية بالفيروس الحلني البقري النمط-١- المضعف.
* محلول الغسيل Wash Solution بتركيز(10X) والذي يكون حاويا على مواد حافظة و مادة التوين Tween.
* دارئة تخفيف المصل Serum Diluents Buffer والذي يستخدم لتخفيف المصل حيث يكون حاويا على مواد حافظة ومادة توين Tween.
* الشاهد الايجابي Positive Control حيث يكون حاويا على مصل بقري ايجابي للفيروس الحلني البقري النمط-١- في دارئة حاوية على بروتينات مثبتة ومواد حافظة.
* الشاهد السلبي Negative Control حيث يكون حاويا على مصل بقري سلبي للفيروس الحلني البقري النمط-١- في دارئة حاوية على بروتينات مثبتة ومواد حافظة.

* المقترن Anti-gB-HRP Conjugate حيث يكون مكونا من أضداد نوعية لأضداد البروتينات السكرية نوع gB للفيروس الحلني البقري النمط-١- والمرتبطة بأنزيم البيروكسيديز فضلا عن أضداد أحادية النسيلة للفيروس الحلني البقري النمط-١- والتي تكون ضمن دارئة حاوية على بروتينات مثبتة ومواد حافظة.
* محلول الركيزة Substrate (TMB (Tetramethylbenzidine))
* محلول إيقاف التفاعل Stop solution عبارة عن حامض الفسفوريك .

تحضير المواد اللازمة لإجراء الاختبار:

* تحضير محلول الغسيل : يجب تمديد محلول الغسيل في الماء المقطر بنسبة١:١٠ حيث أن تحضير محلول غسيل لصفيحة واحدة يلزم إضافة ٥٠ مليلتر من محلول الغسيل (10X) إلى ٤٥٠ مليلتر ماء مقطر يمزج جيدا ويحفظ في ٤ م°.
* يجب إذابة المصل المحفوظ في درجات حرارة منخفضة قبل إجراء الاختبار.

- إجراء الاختبار Test Procedure

*تم إجراء الاختبار حسب تعليمات الشركة المصنعة ضمن الكتيب الخاص بالاختبار.
*قبل إجراء الاختبار يجب وضع العتيدة في درجة حرارة الغرفة قبل ساعة من بدء الاختبار.
*تم إضافة ٥٠ مايكروليتر من دارئة تخفيف المصل لجميع حفر الصفيحة الدقيقة.
*تم إضافة ٥٠ مايكروليتر من الشاهد السلبي والايجابي بشكل مضاعف في الحفر A1,B1,C1,D1 .
*تم إضافة ٥٠ مايكروليتر من المصل بشكل مضاعف في الحفر يجب الانتباه برج الصفيحة.
*تم تحضين الصفيحة الدقيقة لمدة ١٢-١٨ ساعة (Over night) ١٨-٢٥ م°.
* يتم التخلص من المصل ومن ثم تغسل صفيحة الاختبار باستخدام محلول الغسيل بإضافة ٣٠٠ مايكروليترفي كل حفرة وترج الصفيحة ومن ثم يتخلص من محلول الغسيل وتعاد هذه العملية ثلاث مرات .*يضاف ١٠٠ مايكروليتر من المقترن لجميع حفر الاختبار .
*تحضن صفيحة الاختبار ٦٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة .
* تم التخلص من المقترن ومن ثم تغسل صفيحة الاختبار باستخدام محلول الغسيل بإضافة ٣٠٠ مايكروليتر في كل حفرة وترج الصفيحة ومن ثم يتخلص من محلول الغسيل وتعاد هذه العملية ثلاث مرات .
*تم إضافة ١٠٠ مايكروليتر من محلول الركيزة لجميع حفر الاختبار .
*تحضن صفيحة الاختبار ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة ويراعى أن يكون التحضين في مكان مظلم
*تم إضافة ١٠٠ مايكروليتر من محلول إيقاف التفاعل .
*تمت قراءة النتيجة خلال ٢٠ دقيقة في جهاز قارئ صفائح تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من نوع ELX 800 –Bio-Tek Instruments .Inc عند طول موجي ٤٥٠ نانوميتر سجلت القراءات المتمثلة بالكثافة الضوئية Optical Density (OD) .

حساب النتائج Calculation

* تم حساب متوسط الشاهد السلبي والايجابي لكل واحد منهما على حده بجمع الكثافة الضوئية لكل واحد منهما وتقسيمها على عدد الحفر لهما.
* تم حساب متوسط قراءة العينات لكل عينة على حده بجمع الكثافة الضوئية لكل عينة وتقسيمها على عدد الحفر لها.

تم حساب نسبة التثبيط Blocking باستخدام المعادلة التالية:

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{متوسط الشاهد السلبي} - \text{متوسط العينة}}{\text{متوسط الشاهد السلبي}} \times ١٠٠$$

تقييم النتائج :

- في حال كانت نسبة التثبيط اقل من ٥٥ % فان النتيجة سالبة .
- في حال كانت نسبة التثبيط اكبر أو يساوي ٥٥ % واقل من ٦٥% فان النتيجة مشكوك فيها والأفضل إعادة فحص مصل الحيوان.
- في حال كانت نسبة التثبيط اكبر أو يساوي ٦٥ % فان النتيجة موجبة .

ثانيا: اختبار التعادل المصلي Serum Neutralization(SN):

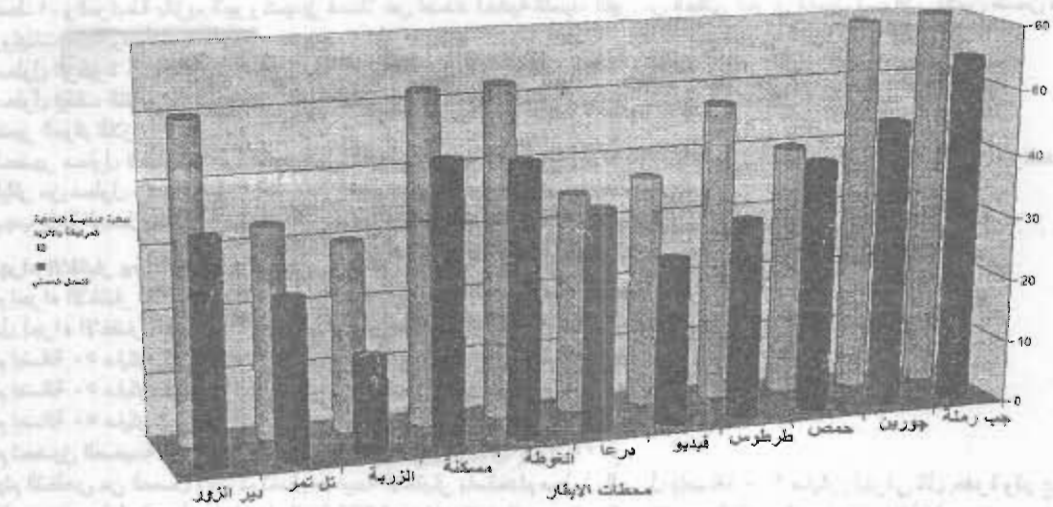
تم إجراء هذا الاختبار حسب طريقة (Amira *et al.*,2006)وكالاتي:

- يتم تحضين مصول الحيوانات المراد فحصها في الحمام المائي ٥٦ م° لمدة ٣٠ دقيقة لإبطال فعالية المتمم.
- يتم تمديد المصل عشاريا في أنابيب لعشرة تخافيف .
- يتم اخذ ٢٥مايكروليترمن المصل لكل تخفيف ووضعه في أنابيب صغيرة ومعقمة ومن ثم يضاف إليه ٢٥مايكروليتر من الفيروس الحلني البقري النمط-١- العترة الهنغارية اللقاحية والمنتجة من قبل مختبرات الصحة الحيوانية في دمشق عند معيار(100 TCID50/25ul) يمزجان جيدا ويحضن لمدة ساعة ٣٧ م°.
- يتم تحضير خلايا زرع نسجي من نوع خلايا كلية الأبقار Madin Darby bovine kidney cells في الصفيحات الدقيقة ذوات ٩٦ حفرة حيث يتم إضافة ١٠٠مايكروليتر من الخلايا لكل حفرة.
- يتم إضافة ٥٠ مايكروليتر من المصل والفيروس الممزوجين إلى الخلايا ويحضن طبق الاختبار في ٣٧ م ° (Co2 5%) وتفحص يوميا لمدة ٧ أيام لمشاهدة الأثر المرضي للخلايا CPE.
- يتم احتساب النتيجة في العينات التي أظهرت أكثر من ٥٠% تأثيرا مرضيا للخلايا إذ تعتبر النتيجة ايجابية.

٤- التحليل الإحصائي: تم استخدام اختبار Z ضمن برنامج Sigma state لتحليل النتائج إحصائيا.

RESULTS
النتائج

بينت نتائج الفحص المصلي للفيروس الحلني البقري النمط-١- لمحطات الأبقار الحلوب في سوريا باستخدام تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من النوع التنافسي واختبار التعادل المصلي ، أن معدل الإصابة العامة في سوريا ٤٥,٢١% باستخدام تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم في حين بلغ معدلها ٣٦,٠٩% باستخدام التعادل المصلي ، وجد كذلك أن أعلى معدل إصابة كان في محطة أبقار جب رملة ولكلا الاختبارين، بينما بلغ اقل معدل إصابة لمحطة الزربة ولكلا الاختبارين أيضا ، علما بان معدل الإصابة بين المحطات وبين الاختبارات بين وجود فروق معنوية بين المحطات ولكلا الاختبارين، وكما هو مبين في الشكل -١-.



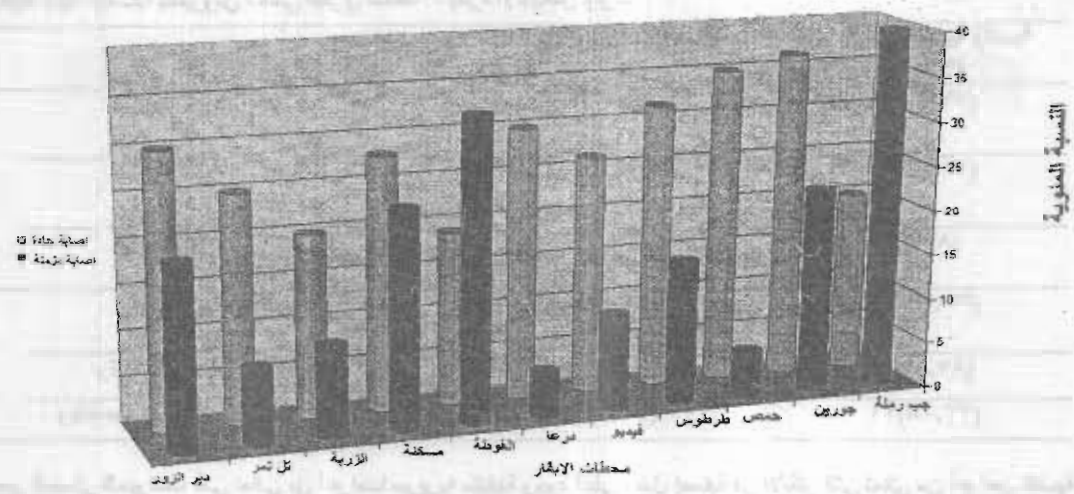
الشكل ١: يبين نسبة الإصابة العامة لمحطات الأبقار في سوريا بالفيروس الحلني البقري النمط-١- باستخدام تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من النوع التنافسي غير المباشر CI-ELISA واختبار التعادل المصلي Serum Neutralization(SN)

ومن خلال فحص الأمصال للكشف عن علاقة العمر بنوع الإصابة سواء كانت حادة أو مزمنة ، تبين من خلال النتائج وجود أعلى إصابة حادة في كلا الجنسين التي بلغت أعمارها اقل من ٦ شهور ، بينما بلغ اقل معدل إصابة حادة في الذكور التي بلغت أعمارها اكبر من سنتين ، في حين كانت اقل إصابة حادة في الإناث التي زادت أعمارها على٧ سنوات ، في حين بلغت أعلى إصابة مزمنة في الذكور التي بلغت أعمارها اكبر من سنتين ، والإناث التي بلغت أعمارها (٢<-٤ سنوات) ، أما اقل معدل إصابة مزمنة فكانت في الأعمار التي بلغت اقل من ٦ شهور ولكلا الجنسين مع وجود فروق معنوية، وكما هو موضح في الجدول-١-.

جدول ١: يبين علاقة العمر والجنس بنسبة الإصابة ونوعها بالفيروس الحلني البقري النمط-١- باستخدام تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من النوع التنافسي غير المباشر

الجنس	العمر	عدد العينات	عدد العينات الايجابية للإصابة الحادة (النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية للإصابة الحادة IgM (النسبة المئوية%)	عدد العينات الايجابية للإصابة المزمنة IgG (النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية للإصابة المزمنة IgG (النسبة المئوية%)
الذكور	اقل من ٦ شهور	٣٠	(٤٦,٦٦)١٤	(٥٣,٣٤)١٦	(٠)٠	(١٠٠)٣٠
	٦ شهور-٢ سنة	٢٧	(٣٧,٠٣)١٠	(٦٢,٩٧)١٧	(٢٩,٦٢)٨	(٧٠,٣٨)١٩
	اكبر من سنتين	١٢	(٨,٣٣)١	(٩١,٦٧)١١	(٢٥)٣	(٧٥)٩
الإناث	اقل من ٦ شهور	٣٥	(٤٨,٥٧)١٧	(٥١,٤٣)١٨	(٠)٠	(١٠٠)٣٥
	٦ شهور-٢ سنة	٢٤	(٤٥,٨٣)١١	(٥٤,١٧)١٣	(١٢,٥)٣	(٨٧,٥)٢١
	٢<-٤ سنوات	٣٩	(٢٠,٥١)٨	(٧٩,٤٩)٣١	(٣٥,٨٩)١٤	(٦٤,١١)٢٥
	٤<-٧ سنوات	٣٨	(٥,٢٦)٢	(٩٤,٧٤)٣٦	(٢١,٠٥)٨	(٧٨,٩٥)٣٠
	اكبر من ٧ سنوات	٢٥	(٠)٠	(١٠٠)٢٥	(٢٠)٥	(٨٠)٢٠
	المجموع	٢٣٠	(٢٧,٣٩)٦٣	(٧٢,٦١)١٦٧	(١٧,٨٢)٤١	(٨٢,١٨)١٨٩

تبين من خلال فحص أمصال الحيوانات في محطات الأبقار التي استخدمت في الدراسة أن أعلى معدل إصابة حادة كانت في محطة أبقار جورين بينما بلغ اقل معدل إصابة حادة لمحطة أبقار الغوطة، بينما أوضحت نتائج الإصابة المزمنة وجود أعلى معدل لمحطة أبقار جب رملة ، بينما سجل اقل معدل إصابة مزمنة في محطتي أبقار حمص ودرعا من غير وجود فروق معنوية، وكما مبين في شكل-٢-.



شكل ٢ : يبين نسبة الإصابة بالفيروس الحلني البقري النمط-١- بنوعيها في محطات الأبقار في سوريا

وللمقارنة ما بين اختباري المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم التنافسي واختبار التعادل المصلي للفئات العمرية لكلا الجنسين في محطات الأبقار ، بينت النتائج وجود أعلى معدل إصابة للفئة العمرية (٦ شهور-٢ سنة) لكلا الجنسين ، إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين الاختبارين لجميع الفئات العمرية ، وكما هو موضح في الجدول-٢-.

جدول ٢ : يبين علاقة العمر والجنس بنسبة الإصابة ونوعها بالفيروس الحلني البقري النمط-١- باستخدام تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم من النوع التنافسي غير المباشر واختبار التعادل المصلي

الجنس	العمر	عدد العينات	عدد العينات الايجابية لتقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية لتقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (النسبة المئوية%)	عدد العينات الايجابية لاختبار التعادل المصلي (النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية لاختبار التعادل المصلي (النسبة المئوية%)
الذكور	اقل من ٦ شهور	٣٠	١٤(٤٦,٦٦)	١٦(٥٣,٣٤)	١٠(٣٣,٣٣)	٢٠(٦٦,٦٧)
	٦ شهور-٢ سنة	٢٧	١٨(٦٦,٦٧)	٩(٣٣,٣٣)	١٥(٥٥,٥٦)	١٢(٤٤,٤٤)
	اكبر من سنتين	١٢	٤(٣٣,٣٣)	٨(٦٦,٦٧)	٣(٢٥)	٩(٧٥)
الإناث	اقل من ٦ شهور	٣٥	١٧(٤٨,٥٧)	١٨(٥١,٤٣)	١٤(٤٠)	٢١(٦٠)
	٦ شهور-٢ سنة	٢٤	١٤(٥٨,٣٣)	١٠(٤١,٦٧)	١١(٤٥,٨٣)	١٣(٥٤,١٧)
	٢<- ٤ سنوات	٣٩	٢٢(٥٦,٤١)	١٧(٤٣,٥٩)	١٩(٤٨,٧٢)	٢٠(٥١,٢٨)
	٤<- ٧ سنوات	٣٨	١٠(٢٦,٣٢)	٢٨(٧٣,٦٨)	٧(١٨,٤٢)	٣١(٨١,٥٨)
	اكبر من ٧ سنوات	٢٥	٥(٢٠)	٢٠(٨٠)	٤(١٦)	٢١(٨٤)
	المجموع	٢٣٠	١٠٤(٤٥,٢١)	١٢٦(٥٤,٧٩)	٨٣(٣٦,٠٩)	١٤٧(٦٣,٩١)

بينت نتائج الفحص المصلي للفيروس الحلني البقري النمط-١- في الإناث التي تعاني من مشاكل تناسلية (فترة الإجهاض، نوع الإجهاض) إن أعلى معدل كان في الأبقار التي تعاني من حصول إجهاض في الثلث الثاني من الحمل ومن دون فروق معنوية مقارنة" مع الأبقار التي أجهضت في الثلث الأول ، وكذلك بين الأبقار التي أجهضت في الثلثين الثاني والثالث من الحمل، وكما موضح في الجدول-٣-.

فيما أظهرت نتائج الفحص المصلي لنفس الأبقار من ناحية نوع الإجهاض وجود أعلى معدل إصابة بالفيروس الحلني البقري النمط-١- في الأبقار التي تعاني من حصول إجهاض وبالمقارنة الإحصائية مع المجموعتين الاخريتين تبين وجود فرق معنوي بينهم وكما هو موضح في جدول-٣-.

جدول ٣: يبين علاقة نسبة الإصابة بالفيروس الحلني البقري النمط-١- بفترة الإجهاض ونوعه

		عدد العينات	عدد العينات الايجابية (النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية (النسبة المئوية%)
فترة الإجهاض	الثلث الأول	٣٥	١٥(٤٢,٨٥)	٢٠(٥٧,١٥)
	الثلث الثاني	٤٢	٢٠(٤٧,٦١)	٢٢(٥٢,٣٩)
	الثلث الثالث	٢٥	٥(٢٠)	٢٠(٨٠)
نوع الإجهاض	إجهاض	٤٥	٢٩(٦٤,٤٤)	١٦(٣٥,٥٦)
	ولادة عجول ميتة	٣١	٤(١٢,٩)	٢٧(٨٧,١)
	ولادة مبكرة بعجول ضعيفة	٢٦	٧(٢٦,٩٢)	١٩(٧٣,٠٨)

بينت نتائج الفحص المصلي للحيوانات التي تعاني من أعراضا سريريه متباينة وجود أعلى معدل إصابة في الأبقار التي تعاني من أعراض تنفسية (٣٦,٦٧%) بينما بلغت اقل نسبة اصابة في الحيوانات التي عانت من اعراض هضمية (٢٢,٢٢%) وكما هو موضح في الجدول-٤-.

جدول ٤: يبين علاقة نسبة الإصابة بالفيروس الحلني البقري النمط-١- بالأعراض المرضية الظاهرة على الحيوانات

ت	نوع الأعراض	عدد العينات	عدد العينات الايجابية (النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية (النسبة المئوية%)
١	تنفسية	٦٠	٣٨(٦٣,٣٣)	٢٢(٣٦,٦٧)
٢	تناسلية	٧٢	٢٥(٣٤,٧٣)	٤٧(٦٥,٢٧)
٣	عينية	٣١	١٧(٥٤,٨٤)	١٤(٤٥,١٦)
٤	عصبية	٣	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
٥	هضمية	٩	٢(٢٢,٢٢)	٧(٧٧,٧٨)
٦	التهاب الضرع	٦	٣(٥٠)	٣(٥٠)
٧	مزدوجة	٢٣	١٤(٦٠,٨٧)	٩(٣٩,١٣)
٨	سليمة سريريا	٢٦	٤(١٥,٣٨)	٢٢(٨٤,٦٢)
٩	المجموع	٢٣٠	١٠٤(٤٥,٢١)	١٢٦(٥٤,٧٩)

DISCUSSION
المناقشة

يعد الفيروس الحلني البقري من اخطر الفيروسات التي تهدد الثروة الحيوانية في العديد من دول العالم نظرا لتسببه بتأثيرات عدة على هذه الصناعة ، لذلك اعتمدت العديد من البلدان نظم دورية للكشف عنه في قطعانها للحد من انتشاره والسيطرة عليه (Boelaert *et al.*, 2005)، تم خلال هذه الدراسة استخدام نوعين من الاختبارات المصلية للكشف عن الأضداد النوعية للفيروس الحلني البقري النمط-١- في مصول ٢٣٠ حيوانا ولكلا الجنسين وبأعمار مختلفة متمثلة باختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم – التنافسي واختبار التعادل المصلي ، تبين من خلال النتائج أن نسبة الإصابة الإجمالية للفيروس الحلني البقري النمط-١- في سوريا بلغ ٤٥,٢١% بالمقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم في حين بلغت النسبة ٣٦,٠٩% باستخدام اختبار التعادل المصلي ، توجد دراسة واحدة في سوريا (Alomar and AlYasino, 2010) تم من خلالها الكشف عن أضداد الفيروس الحلني البقري النمط-١- في خمسة محطات في سوريا حيث بلغت نسبة الإصابة الإجمالية وباستخدام المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (١٠-٢١%) ، إن سبب هذا الاختلاف يعود لعدة أسباب منها الاختلاف في عدد محطات الأبقار المشمولة لكل دراسة ، التباين في حساسية الاختبار حسب نوعه ، أن الفيروس الحلني البقري يمتلك خاصية إعادة التنشيط Re activation بعد مرحلة الكمون Latency والتي يمكن أن تظهر بشكل اندلاعات مرضية بين الحين والأخر مسببة ارتفاع في نسب الإصابة الإجمالية إضافة لذلك فان استهدافنا لجمع العينات من أبقار تظهر عليها أعراضا مرضية يزيد من نسب الكشف عن الإصابة إضافة إلى أن اختبار المقايسة المناعية المرتبط بالإنزيم من النوع التنافسي والذي يكشف عن الأضداد النوعية للبروتينات السكرية نوع gB للفيروس الحلني البقري النمط-١- والمستخدم قيد دراستنا ، يعتبر ذو حساسية عالية ، خصوصية عالية للكشف عن الأضداد بالمقارنة مع الأنواع الأخرى (De Wit *et al.*, 1998) لهذا الاختبار ،بينت نتائج الاختبارات المصلية للكشف عن نسب الإصابة في محطات الأبقار أن أعلى نسبة إصابة كان لمحطة أبقار جب رملة ولكلا الاختبارين ، في حين كانت اقل نسبة إصابة في محطة الزربة ، أن هذا التباين في نسب الإصابة بين المحطات يعود لعدة أسباب منها كثافة التربية ، حجم القطيع ، الطبيعة الجغرافية لكل منطقة ، أسلوب التربية ، طبيعة حركة الحيوانات وتنقلاتها بين محطة وأخرى ، دخول حيوانات جديدة لمحطة معينة واستخدام اللقاحات التحصينية ضد الفيروس لبعض المحطات دون الأخرى ، إن سبب التباين في نسب الإصابة ما بين الاختبارين المصليين المستخدمين في الدراسة يعود لاختلاف درجة الحساسية لكل منهما عن الأخر إضافة إلى الاختلاف في درجة تمديد المصل حيث تكون عالية باختبار التعادل المصلي مقارنة بالمقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم وهذه النتيجة تشابه مع ما ذكره (Serpil, 2005) حيث استخدم عدة اختبارات مصلية للكشف عن أضداد الفيروس الحلني البقري النمط-١- وكان الاختبار الأدق وذو الحساسية العالية تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم –التنافسي والمتخصص للبروتينات السكرية من نوع gB بالمقارنة مع الاختبارات الأخرى .

أما نتائج التقصي عن نسبة الإصابة الحادة مقارنة بعمر الحيوان فأظهرت النتائج إن أعلى نسبة للإصابة الحادة كانت في العجول الأقل من ٦ شهور ولكلا الجنسين في حين لم تسجل في الإناث التي كانت أعمارها اكبر من ٧ سنوات أي نسبة إصابة ، إن سبب هذا التباين يعود إلى أن الإصابة الحادة والمتمثلة بالغلوبيولين المناعي IgM يكون واضحا وبمعايير ايجابية بعد الاستجابة المناعية الناجمة عن الإصابة الأولية بالفيروس إضافة إلى أن الحيوانات صغيرة العمر تكون معرضة للإصابة وحساسة لها مقارنة بالكبيرة منها ،إن الغلوبيولين المناعي IgM يقل معدل احتمالية ظهوره بعد طور الكمون Latency أثناء إعادة تنشيط الإصابة Re-Activation ، حيث ذكر(Mylene *et al.*, 2000) إن الغلوبيولين المناعي IgM يمكن

أن يظهر بعد إعادة التنشيط بالفيروس الحلني البقري النمط-١- ولكن بنسب متباينة اعتمادا على الذرية المسببة للمرض ، الجرعة الفيروسية التي تعرض لها الحيوان أثناء الإصابة ، طريقة دخول الفيروس لجسم الحيوان، فترة حضانة الفيروس وتأثر هذه العملية بإعطاء الحيوان للستيرودات القشرية ، في حين بين آخرون (Madic *et al.*, 1995) إن الفيروس الحلني البقري النمط-١- يطرح لمدة ٢١ يوما في العجول المصابة تجريبيا بالرغم من وجود أضداد واردة من الأم وبمعايير ايجابية ، بينما قام (Mars *et al.*, 2000) بإعطاء عجول مصابة أضداد نوعية للفيروس وأظهرت النتائج عدم تأثر المعايير الفيروسية بذلك. أما الإصابة المزمنة فكان أعلى معدل لها في الفئة العمرية اكبر من سنتين إلى ٤ سنوات في الإناث وللفئة العمرية ٦ شهور-٢سنة للذكور فيما انعدمت في الأعمار الصغيرة لكلا الجنسين ، وفسرت هذه النتيجة إلى أن تقدم الحيوانات بالعمر يزيد من فرصة الإصابة بالفيروس ، وان معايير الغلوبيولين المناعي IgG تكون ذات معايير عالية بعد إعادة التنشيط وبغض النظر عن كمية الفيروس المطروحة من قبل جسم الحيوان (Daniela *et al.*, 2006) إن سبب كون نسبة الإصابة المزمنة في الإناث أعلى مما هو عليه في الذكور ، لكون الذكور تستخدم غالبا للتسمين بعد عمر الفطام ، ويستبعد دائما الضعيف منها أو تلك التي تتعرض لانتكاسات مرضية متكررة ، في حين أن الإناث تربى لأعمار كبيرة مما يزيد من فرصة الإصابة بالفيروس إضافة إلى فرصة تعرضها لأطوار الكمون وإعادة تنشيط ولمرات عديدة والتي تكون مترافقة مع عوامل عديدة من أهمها في الإناث هي حصول الحمل والولادة، وهذا يتفق على ما ذكره Eiras *et al.* (2009) حيث بين أن نسبة الإصابة المزمنة تزداد بزيادة عمر الحيوان بالمقارنة بنسب الإصابة في الإناث صغيرة العمر.

بينت نتائج الفحص المصلي لمحطات الأبقار المستخدمة قيد الدراسة وجود أعلى نسبة إصابة حادة في محطة جورين (٣٦,٣٧%) في حين بلغت أعلى نسبة إصابة مزمنة لمحطة أبقار جب رملة (٤٠%) إن سبب هذا التباين ما بين محطات الأبقار يعود لأسباب عديدة منها: إن فترة الكمون والتي تكون شائعة للفيروس الحلني البقري النمط-١- تعطي صورة غير دقيقة لنسب الإصابة في قطعان الأبقار إضافة إلى حقيقة علمية ذكرت من قبل (Abu Elzein *et al.*, 2008) أن وجود حيوان واحد مصاب في قطيع بالفيروس الحلني البقري النمط-١- يعطي مؤشرا لوجود نسب إصابة أعلى مما هو مبين ضمن الاختبار المصلي المستخدم نظرا لمرور الإصابة بمراحل عديدة ، وان الحيوان الذي يتعرض للإصابة يبقى حاملا لها طيلة حياته بالرغم من إعطاء الكثير من الحيوانات نتيجة سالبة لوجود الأضداد في أمصالها.

ومن خلال مقارنة نسب الإصابة باستخدام اختباري المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم واختبار التعادل المصلي ، تبين أن نسب الإصابة باختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم أعلى مما هو عليه باختبار التعادل المصلي ، وان نسب الإصابة تقل بازدياد عمر الحيوان إلا أن أعلى نسب إصابة كانت في الفئة العمرية ٦ شهور-٢ سنة ولكلا الجنسين، إن السبب في التباين ما بين الاختبارين يعود لعدة أسباب من أهمها ، أن للمقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم –التنافسي خصائص تعطيها حساسية ودقة أعلى مما هو عليه بالتعادل المصلي منها: أن لها القدرة على الكشف عن الأضداد مهما كانت كميتها قليلة ، الكشف عن الأضداد التي لها القدرة على التعادل إضافة للأضداد التي ليس لها القدرة على ذلك ، في حين بين Johannes *et al.* (2004) أن اختبار التعادل المصلي يتأثر بعوامل تسبب قراءات خاطئة منها استخدام لقاحات جرثومية أو فيروسية تنتج أضداد ضد بروتينات معينة ممكن أن تعطي نتائج ايجابية غير نوعية، إن نسب الإصابة التي قلت بازدياد عمر الحيوان تعود لأسباب عديدة منها: إن الإصابة الكامنة تحدث في الأعمار الكبيرة بنسب اكبر من الصغيرة منها حيث بين Tolga *et al.* (2006) إن محصول الحيوانات في فترة الكمون تعطي نتائج سالبة للإصابة إضافة إلى ذلك ذكر Kamaraj *et al.* (2009) أن الحيوان المصاب بتقدم العمر يكون مناعة ممكن أن تحد لدرجة ما من ظهور الإصابة بإعادة التنشيط مرة أخرى إضافة إلى ذلك فان الحالة المناعية للحيوانات الصغيرة العمر تسمح للفيروس بإحداث الإصابة مقارنة بالحيوانات كبيرة العمر.

أما علاقة نسبة الإصابة بفترة الإجهاض فبينت النتائج أن أعلى نسبة للإصابة كانت في الثلثين الثاني والأول من الحمل ، إن سبب التباين في النسب يعود إلى أن جسم الأبقار الحوامل يكون استجابة مناعية بتقدم الحمل تمنع من حصول الإجهاض إضافة إلى أن الاستجابة المناعية للجنين ضد المسببات المرضية تكون في الثلث الأخير من الحمل مما قد يقلل فرص الإجهاض في هذه المرحلة (Nardelli *et al.*, 2008) ، أما علاقة نسب الإصابة بنوع وفترة الإجهاض فبينت النتائج أن أعلى نسبة إصابة كانت في الأبقار التي تعاني من إجهاض مقارنة بالأبقار التي تعاني من ولادة عجول ميتة وأخرى بعجول ضعيفة ، إن سبب هذا التباين يعود إلى أن الأبقار الحوامل عند إصابتها بالفيروس الحلني البقري النمط-١- يمكن أن يتسبب بموت أجنتها ويعود السبب في ذلك لعدة أسباب من احدها هو الاستجابة المناعية النوعية وغير النوعية حيث تتحطم خلايا المشيمة والجنين مما يؤدي إلى موت الجنين ، إن طرح الجنين الميت من قبل جسم الأم إلى الخارج قد يستغرق وقتا مما قد يسمح لتحول الإصابة إلى حالة الكمون مما قد يعطي نسبة إصابة سلبية عالية مقارنة بباقي المجاميع (Hashemi *et al.*, 2009) أما الأبقار التي عانت من ولادة عجول ضعيفة فان سبب انخفاض نسبة الإصابة فيها يعود إلى كون هذه الأبقار يمكن أن تكون قد عانت من إصابة أثناء فترة الحمل وكونت استجابة مناعية قد تكون غير كافية لإبقاء أجنتها سليمة مما قد يتسبب في تلف بعض الأنسجة مؤديا لإحداث ضعف في أجسامها أو في أنسجة المشيمة مما يؤدي إلى ولادة مبكرة لعجول قد يكون البعض منها مشوها (Winkler *et al.*, 2000).

أما علاقة نسبة الإصابة بنوع الأعراض المرضية فبينت النتائج أن أعلى نسب إصابة كانت في الأبقار التي عانت من أعراض تنفسية ، إن سبب تباين نسب الإصابة بنوع الأعراض المرضية يعود لأسباب جمة من أهمها : إن الفيروس الحلني البقري النمط-١- بالرغم من تصنيفه إلى ثلاثة مجاميع اعتمادا على العلامات المرضية إلا أن الذرية الواحدة تسبب أعراضا مختلفة بنفس الوقت كأن تكون(تنفسية وتناسلية ، تنفسية وعينية ، تنفسية وعصبية) (Tikko *et al.*, 1995)، لذلك فان نسب الإصابة كانت متباينة وغير معنوية .

إن انتشار الإصابة بالفيروس الحلني البقري النمط-١- في محطات الأبقار في سوريا يعود لأسباب عديدة (مشاهدات حقلية) إن البكاكير يتم تلقيحها دائما عن طريق التلقيح الطبيعي بثيران (إما أن تكون من نفس القطيع أو قد تم جلبها من محطة أخرى) غير مفحوصة بأي اختبار للكشف عن هذا الفيروس مما قد يسهل لولادة جيل جديد مصاب بالفيروس في حال كان الثور مصابا ، سهولة انتقال الأبقار بكافة الأعمار والأجناس بين المحطات دون دراسة مسبقة عن الإصابات المرضية التي تعاني منها ، إن السائل المنوي المجمد والمستخدم من قبل محطات تربية الأبقار في التلقيح الاصطناعي خال من الفيروس الحلني البقري النمط-١- (بحث قيد النشر) إلا أنه من خلال المشاهدات الحقلية وجد أن الكثير من المحطات تعاني من تلوث معدات التلقيح الاصطناعي بروث وسيلانات الحيوانات حيث يساهم العامل البشري في نقل الإصابة ، استخدام اللقاحات الحية المضعفة دون دراسة تأثيرها أو مساهمتها في التأشب Recombination أو قدرتها على إحداث الكمون .

REFERNCES
المصادر

Abu Elzein, E.M.E.; Housawi, F.M.T.; Afaleq, A.I. and Musa, J. (2008): Emergence of clinical infectious bovine rhinotrachitis in Eastern Saudi Arabia. Revue. Elev. Vet. Pays. Trop, 61(1): 11-13.

Alomar, Y. and AlYasino, Y. (2010): Epidemiological study on infectious bovine rhinotrachitis in cattle, International Journal Of Infectious Disease, 14: 32-40.

Amira, M.E.; Fadol, M.A.; Karrer, A.E. and Elhussin, A.R.M. (2006): IBR virus in Sudan:Epidemiological and Serological studies. Journal of Animal and Veterinary Advances, 5 (12): 1053-1057.

Benoit, M.; Julien, T.; Philippe, K.; Frederic, S. and Etienne, T. (2007): Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotrachitis.Vet. Res., 38: 181-209.

Boelaert, F.; Speybroeck, N.; Kruif, A.D.; Aerts, M.; Burzykowski, T.; Molenberghs, G. and Berkvens, D.L. (2005): Risk factor for bovine herpesvirus-1 seropositivity. Preventive Veterinary Medicine, 69: 285-295.

Clinton, J. and Shafiqul, C. (2008): A review of the biology of bovine herpesvirus type 1(BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved Vaccines. Animal Health Research Reviews, 8(2): 187-205.

Daniela, B.; Ramona, M.; Virgillia, P. and Herman, V. (2006): Evaluation of immune response against infectious bovine rhinotrachitis virus by Immunoenzymatic assay.Buletinul, 63: 1454-1460.

De Wit, J.J.; Hage, J.J.; Brinkhof, J. and Westenbrink, F. (1998): A comparative study of serological tests for use in the bovine herpesvirus 1 eradication programme in the Netherlands. Veterinary Microbiology,61:153-163.

Deka, D.; Ramneek, M.; Maiti, K. and Oberoi, M.S. (2005): Detection of bovine herpesvirus -1infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 24(3):1085-1094.

Eiras, C.; Dieguez, F.J.; Sanjuan, M.L.; Yus, E. and Aranaiz, I. (2009): Prevalenc of serum antibodies to bovine herpesvirus -1 in cattle in Galicia (NW Spain). Spanish Journal Of Agricutural Research, 7(4): 801-808.

Ezzi, A.; Hatami, A. and Shoukri, M.R. (2011): Study on duration of maternal antibodies in calves against bovine herpesvirus type 1(BHV-1). Archives Of Razi. Institute, 66(1):25-28.

Gonzalez-garcia, M.A.; Arenas-Casas, A.; Carbonero-Martinez, A.; Borge-rodriguez, C.; Garcia-Bocanegra, I.; Maldonado, J.L.; Gomez-Pacheco, J.M. and Perea-Remujo, J.A. (2009): Seroprevalence and risk factors associate with bovine herpesvirus type1(BHV1)infection in non-vaccinated cattle herds in Andalusia (South of Spain). Spanish Journal Of Agricutural Research, 7(3): 550-554.

Hashemi, T.; Rad, G.R.; Naseri, M. and Azizzadeh, M. (2009): Detection of antibody against infectious bovine rhinotrachitis glycoprotein gE in aborted cattle in Mashhad, Iran. Archives Of Razi Institute, 64(2): 91-95.

Johannes, A.K.; Malcolm, B.; Martin, B.; Pierre, K.; Myriam, P.; Gerard, J.W. and Jan, T.V.O. (2004): Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. Veterinary Microbiology, 102: 169-181.

Julien, T.; Veronique, K.; Benoit, M.; Francois, M.; Sacha, G.; Alain, V. and Etienne, T. (2006): Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1.Vet. Res., 37: 169-190.

Kamataj, G.; Rana, S.K. and Srinivasan, V.A. (2009): Serological response in cattle immunized with inactivated oil and algel adjuvant vaccines against infectious bovine rhinotrachitis. New Microbiologica, 32: 135-141.

Madic, J.; Magdalena, J.; Quak, J. and Oirschot, J.T. (1995): Isotype–specific antibody response to bovine herpesvirus 1 in sera and mucosal secretion of calves after experimental reinfections and after reactivation. Veterinary Immunology and Immunopathology, 47: 81-92.

Maria do Carmo, C.; Edviges Maristela, P.; Ricardo Spacagna, J.; Claudia Pestana, R.; Moacir Marchiori, F. and Helio Jose, M. (2011): Systemic and local antibodies induced by an experimental inactivated vaccine against bovine herpesvirus type 1. Ciencia Rural, 41(2): 307-313.

Mars, M.H.; Rijsewijk, F.A.M.; Maris, M.A.; Van-Orishot, J.T. and Hage, J.J. (2000): Presence of bovine herpesvirus 1 gB-serpostive but gE-seronegative Dutch cattle with no apparent virus exposure. veterinary Record, 147(12): 328-331.

Mylene, L.; Vincent, W.; Jacques, G.; Frederic, S.; Gilles, M.; Jean-Jacques, L. and Etienne, T. (2000): Effect of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. Journal of Clinical Microbiology, 38(5): 1885-1894.

Nardelli, S.; Farina, G.; Lucchini, R.; Valorz, C.; Moresco, A.; Dal Zotto, R. and Costanzi, C. (2008): Dynamic of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for infectious bovine rhinotrachitis (IBR). Preventive Veterinary Medicine, 85: 68-80.

Rai, A. (2005): Methods in veterinary virology, Indian Veterinary research Institute, India, PP:50-52.

Serpil, Y. (2005): Acomparative evaluation of bovine herpesvirus -1 infection by Enzyme Linked Immunosorbant assay and serum Neutralization test in Konya Province. Hayvancihk Arastrima Dergisi, 15: 5-8.

Tikko, S.K.; Campos, M. and Babiuk, L.A. (1995): Bovine herpes virus 1 (BHV1): Biology, Pathogenesis, and Control. Adv. Virus. Res., 45: 191-223.

Tolga, M.T.; Yakup, Y.; Nural, E. and Burak, A.G. (2006): The prevalence of bovine herpesvirus type 1(BHV-1) and bovine Leukemia virus (BLV) in selected dairy cattle herds in Aydin Province, Turkey. Turk Journal Veterinary Animal Science, 30: 353-357.

Winkler, M.T.; Doster, A. and Jones, C. (2000): Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latency infected calves. Journal Of Virology, 74(11): 5337-5346.