

SIĞIRLARDA BOVINE VİRAL DIARRHEA (BVD) VİRUS ENFEKSİYONUNA KARŞI ANTİKOR VARLIĞININ ARAŞTIRILMASINDA NÖTRALİZASYON İMMUNPEROKSİDAZ (NPLA) VE SERUM NÖTRALİZASYON (SN) TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Mehmet ÇABALAR¹

Taner KARAOĞLU²

Comparison of Neutralization Peroxidase-Linked Antibody (NPLA) assay and Serum Neutralization (SN) test for detection of antibodies to Bovine Viral Diarrhea (BVD) virus in cattle sera

Summary: *In this study, 471 serum samples collected from dairy cattle which were housed in govermental and private herds located in Eastern and Southeastern of Anatolia, Turkey were tested for presence of BVD virus neutralizing antibodies with NPLA assay and SN test, respectively.*

A comparison was made between NPLA assay and SN test for the detection of BVDV neutralizing antibodies in serum samples. Out of 471 serum samples tested, 456 (96.8 %) were positive by the NPLA assay while 373 (79.2 %) were positive by the SN test. 83 (17.6 %) serum specimens detected as seronegative by means of SN test, were found to be seropositive at the end of the NPLA test. However, 15 (3.18%) serum samples were seronegative for both tests.

As a result, NPLA assay was found to be more sensitive and rapid than SN test interms of detection of antibodies against BVD virus.

Key words: *BVD virus, NPLA assay, SN test.*

Özet: *Bu çalışmada, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde kamuya ait işletmelerden ve halk elinde bulunan sığırlardan 471 adet serum örneklendi ve bu serum örneklerinde BVD virus nötralizan antikörlerinin tesbiti için Nötralizasyon İmmunperoksidaz (NPLA) ve Serum Nötralizasyon (SN) testleri uygulandı.*

NPLA testi ile 456 adet (% 96.8) sığırdan seropozitiflik saptanırken, aynı hayvanların serum örneklerine uygulanan SN testi sonucunda 373 adet (% 79.2) sığır seropozitif olarak tespit edildi. SN testinde seronegatif olarak değerlendirilen 83 adet serum örneği (% 17.6) NPLA testinde seropozitif olarak bulundu. Bununla birlikte, 15 adet (%3.18) serum örneği her iki testte de seronegatif olarak saptandı.

Sonuç olarak, NPLA testinin BVD virus antikörlerinin tesbiti için SN testinden daha duyarlı ve çabuk bir yöntem olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: *BVD virus, NPLA testi, SN testi.*

1. Yrd. Doç. Dr., Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Van.

2. Araş. Gör. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

Giriş

Bovine viral diarrhea (BVD) ve Mucosal disease (MD)'e neden olan bovine viral diarrhea virus (BVDV) enfeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Pestiviruslar grubunda sınıflandırılan etken, sığırlarda BVD olarak kabul edilen ve hafif klinik değişikliklere sebep olan iyi seyirli bir enfeksiyon oluşturabildiği gibi öldürücü MD'e de neden olabilmektedir (27).

Sığırlarda BVD virus enfeksiyonu daha çok subklinik olarak seyretmekte, hastalığın bu formunda kısa süreli iştahsızlık, depresyon, ateş, hafif ishal, geçici bir lökopeni ve bazen birkaç gün içinde iyileşme görülmektedir (5,25,27). İmmunkompetent virus negatif hayvanlarda postnatal pestivirus enfeksiyonları genellikle klinik olarak tespit edilememekte, serum nötralizan antikorların gelişimini takiben virusun eliminasyonu oluşmakta ve bu durumda çok sayıda hayvan seropozitif olarak saptanmaktadır (12). İmmuntolerant persiste enfekte hayvanların aynı virusun sitopatojen biyotipi ile süperenfeksiyonu sonucunda ise öldürücü MD gelişmekte (11,27) ve şiddetli ishal, burun akıntısı, aşırı salivasyon gibi ağır klinik bulgular ile 2 hafta içinde ölümler meydana gelmektedir (2,27).

Enfeksiyonun hem sürü içinde hem de sürüler arasında yayılmasında persiste enfekte hayvanlar önemli rol oynamaktadır (11,21,28). Persiste enfeksiyon bir jeneralize enfeksiyondur ve virus birçok dokuda, özellikle epiteliyal ve endoteliyal sistem hücrelerinde bulunmakta, burun akıntısı, gözyaşı, tükürük, süt, semen, gaita, idrar gibi tüm sekret ve ekskretler ile saçılmaktadır (3,21,27). Uterus akıntısı, amniyotik sıvı ve virus ile kontamine plasenta da bulaşmada rol oynamaktadır (28).

Sığır pestivirüs enfeksiyonlarının kesin teşhisi laboratuvar çalışmaları ile mümkün olabilmektedir. Direkt teşhiste, İmmunofloresan (IF) (2,6), Peroxidase Linked Antibody (PLA) (6,18), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (2,14,16,19), Elektronmikroskopi (EM) (9), Polymerase Chain Reaction (PCR) (20), İndirekt teşhiste ise, Serum nötralizasyon

(SN) (2,7), İndirekt İmmunofloresan (IIF) (23,24), ELISA (2,16), Nötralizasyon İmmunperoksidaz (NPLA) (13,15) testlerinden yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada, BVDV enfeksiyonuna karşı serolojik taramalarda yaygın olarak kullanılan NPLA ve SN testlerinin karşılaştırılmasının yapılması amaçlanmış ve örnekleme yapıldığı Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi sığırlarında BVD virus enfeksiyonunun seroprevalansının tesbitine çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Hücre Kültürü: Araştırmada BVD virus yönünden negatif olduğu saptanan Fötal dana böbrek (FDB) hücre kültüründen yararlanıldı. Gerek bu hücrelerin üretilmesinde kullanılan konvansiyonel dana serumu ve gerekse serolojik testlerde kullanılan Fötal dana serumu (FDS) (*Paesel, GmbH and Co., Frankfurt, Germany*) BVD virusunun varlığı yönünden kontrol edildi ve negatif oldukları saptananlar belirtilen amaçlar için kullanıldı.

Araştırmada Kullanılan Hayvanlar: Kan serumu örnekleri Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan 5 ilin 17 farklı yerleşim birimindeki süt sığırcılığı işletmelerinden toplandı. Örnekleme yapılan bölgeler ve örneklenen hayvan sayısı Tablo 1.'de gösterildi. BVD virusu spesifik antikorlarının varlığını tespit etmek üzere pulverize kaolin içeren tüplere (*Greiner, Nuertingen, Germany*) alınan kanların serumları ayrılarak steril serum tüplerine aktarıldı ve 56°C'de 30 dakika süre ile inaktive edildi. Serum örnekleri test edilinceye kadar -20°C'de saklandı.

Metot

Nötralizasyon İmmunperoksidaz (NPLA) Testi: NPLA testi Holm Jensen (13)'ün bildirdiği yöntemle yapıldı. Her serum örneğinin 1/5'lik sulandırılmaları hazırlandıktan sonra 96 gözlü mikroplyetlerin (*Greiner, Nuertingen, Germany*) 2'şer gözüne 0.05 ml konuldu. Serum örneklerinin üzerine Frey ve

Tablo 1. Örnekleme yapılan merkezler ve örneklenen hayvan sayısı.
Table 1. Localization of herd and number of animals sampled within them.

İşletme No	Bölgeler	Örneklenen Hayvan Sayısı
01	VAN Dönerdere (H)	26
02	Tarım Meslek Lisesi (K)	28
03	Bardakçı (K)	70
04	Altındere (K)	26
05	Merkez (H)	22
06	Otluca ₁ (H)	13
07	Otluca ₂ (H)	12
08	Otluca ₃ (H)	19
09	Otluca ₄ (H)	21
10	Köprüköyü (H)	32
11	AĞRI Merkez (H)	31
12	ŞANLIURFA Ceylanpınar (K)	100
13	DIYARBAKIR Scyrantepe (K)	14
14	Kamışek (H)	21
15	Fiskaya (H)	14
16	GAZIANTEP Beylerbeyi (H)	12
17	Kızılıhisar (H)	10
TOPLAM		471

(H): Halk elinde bulunan küçük işletmeler, (K): Kamu işletmelerine ait sürüler

Liess (7)'in bildirdiği yöntemle titre hesaplanan BVD virusun referans suşu NADL (100DKID₅₀: 10^{-2.3}/0.05 ml)'dan eşit hacimde ilave edildi ve 1 saat 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde nötralizasyona bırakıldı. FDB hücre kültürü, ELA + EMEM (Biochrom Kg, Berlin, Germany) + %10 FDS'lu vasat ile 300.000 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldı ve tüm gözlemlere 0.05 ml konuldu. Mikropleytlar 37°C'ye ayarlı %5 CO₂'li etüve kaldırılarak 48 saat inkube edildi. Süre sonunda mikropleytların içeriği dö-küldü ve hücre yüzeyleri 1/3'lük PBS ile 3 kez yıkandı. Pleytlar, gözleri aşağı gelecek şekilde 80°C'de 1 saat süreyle fizyasyona tabi tutuldu ve daha sonra hücre yüzeyleri PBS tween₂₀ ile ıslatıldı. Her göze heterotipik poliklonal BVD virus antikorunun horseradish peroxidase (HRP) ile işaretli konjugatından 0.05 ml konularak oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Süre sonunda konjugat ortamdaki uzaklaştırılarak hücre yüzeyleri 1/3'lük PBS ile 3 kez yıkandı. Testin değerlendirilmesi için her göze 0.1 M Asetat tamponu (pH 5.0) içinde hazırlanan substrattan (3-amino 9-etil karbazol / AEC) 0.05 ml konuldu ve oda sıcaklığında 30 dakika inkubasyonu takiben reaksiyon su ile dur-

duruldu. Test, pleyt gözlerinin doku kültürü mikroskobunda (Olympus, Tokyo, Japan) incelenmesi ile değerlendirildi.

Serum Nötralizasyon (SN) Testi: Serum nötralizasyon testi, Frey ve Liess (7) tarafından bildirilen yöntemle yapıldı. Her serum numunesinin 1/5'lik sulandırmaları hazırlandıktan sonra 96 gözlü mikropleytların 2'şer gözüne 0.05 ml konuldu. BVD virusun sitopatojen referans suşu olan NADL, yine aynı araştırmacılar (7) tarafından bildirilen yöntemle titre (100DKID₅₀: 10^{-2.0}/ml) hesaplandıktan sonra her göze eşit hacimde serum örnekleri üzerine ilave edildi. Mikropleytlar 37°C, % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı ve 1 saat nötralizasyona bırakıldı. Süre sonunda fetal dana böbrek hücre kültürü ELA + EMEM + %10 FDS'lu vasat ile 300.000 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldı ve tüm gözlemlere 0.05 ml konuldu. Mikropleytlar 37°C, % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı ve virus kontrol için ayrılan gözlerde cpe tesbit edilinceye kadar (3-4 gün) inkube edildi. Hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler doku kültürü mikroskobu ile değerlendirildi.

Bulgular

BVD virus spesifik antikorların varlığını tespit etmek amacıyla örneklenen 471 adet süt sığırının serum örneklerine uygulanan NPLA testi sonucunda 456 adet (% 96.8) sığırdaki seropozitiflik saptandı. Aynı hayvanların serum örneklerine uygulanan SN testi sonucunda ise, 373 adet (79.2) sığır seropozitif olarak tespit edildi. İşletmelere göre saptanan seroprevalans değerleri Tablo 2.'de gösterildi.

Seropozitif olarak değerlendirilen 456 adet serum örneğinin 373 adedi (% 79.2) hem NPLA, hem de SN testi ile seropozitif olarak tespit edilirken, 83 adet (% 17.6) serum örneği yalnızca NPLA testi ile seropozitif olarak saptandı. Onbeş adet (% 3.18) serum örneği ise her iki test sonucunda da seronegatif olarak değerlendirildi (Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada, sığırlarda BVD virus enfeksiyonuna karşı spesifik nötralizan antikorların varlığını tespit etmek amacıyla toplanan 471 adet serum örneğine NPLA ve SN

testleri uygulandı. NPLA testi sonucunda 471 adet serum örneğinin 456 adedinde (% 96.8) antikor varlığı tespit edildi. Aynı serum örneklerine uygulanan SN testinde ise 373 adet (% 79.2) serum örneği seropozitif olarak saptandı. Sürüler bazında NPLA testi ile BVD virusuna karşı seropozitifliğin %80-%100 arasında olduğu, bu oranın SN testinde ise %14.3-%100 arasında değişim gösterdiği belirlendi. NPLA testi ile seropozitif olarak tespit edilen 83 adet (%17.6) serum örneği SN testinde seronegatif olarak değerlendirildi. Onbeş adet (%3.18) serum örneği hem NPLA hem de SN testinde seronegatif olarak tespit edilirken, 83 adet serum örneği her iki test sonucunda farklılıklar gösterdi ve bu iki test arasında %17.6 (83/471) fark/uyumsuzluk olduğu görüldü. Toplam 388 serum örneği ise her iki testte de aynı sonucu verdi. Bu da her iki test sonuçları arasında %82.4 (388/471) oranında uyumluluk olduğunu göstermektedir.

NPLA testi ile SN testi arasındaki bu fark/uyumsuzluk her iki test prosedürü arasındaki farklılıktan ve testi değerlendirme kriterlerinden kaynaklanmaktadır. NPLA testinin değerlendirilmesi 3. günde yapılırken, test göz-

Tablo 2. Test edilen sürülerde NPLA ve SN ile tespit edilen BVDV seroprevalans değerleri.
Table 2. BVDV seroprevalence in the herds using NPLA and SN assays.

İşletme No	Örneklenen Serum Sayısı	NPLA		SN	
		Ak(+)	%	Ak(+)	%
01	26	26	100.0	16	61.5
02	28	23	82.1	4	14.3
03	70	70	100.0	69	98.6
04	26	23	88.5	21	81.0
05	22	22	100.0	22	100.0
06	13	12	92.3	11	84.6
07	12	10	3.3	8	66.6
08	19	19	100.0	19	100.0
09	21	21	100.0	21	100.0
10	32	31	96.9	21	65.6
11	31	30	96.8	30	96.8
12	100	100	100.0	71	71.0
13	14	14	100.0	13	92.8
14	21	21	100.0	21	100.0
15	14	14	100.0	14	100.0
16	12	12	100.0	8	66.6
17	10	8	80.0	4	40.0
Toplam	471	456	96.8	373	79.2

Tablo 3. Örneklenen sürülerde NPLA ve SN test sonuçlarının karşılaştırılması.
Table 3. Comparison of the results of NPLA assay and SN test.

İşletme No	Örneklenen Serum sayısı	Ak(+) Toplam Serum sayısı	NPLA Ak(+) SN Ak(+)	NPLA Ak(-) SN Ak(-)	NPLA Ak(-) SN Ak(-)
01	26	26	16	10	-
02	28	23	4	19	5
03	70	70	69	1	-
04	26	23	21	2	3
05	22	22	22	-	-
06	13	12	11	1	1
07	12	10	8	2	2
08	19	19	19	-	-
09	21	21	21	-	-
10	32	31	21	10	1
11	31	30	30	-	1
12	100	100	71	29	-
13	14	14	13	1	-
14	21	21	21	-	-
15	14	14	14	-	-
16	12	12	8	4	-
17	10	8	4	4	2
Toplam	471	456	373	83	15
(%)		96.8	79.2	17.6	3.18

lerinde hücre içi viral antijenin tesbiti kolaylıkla yapılabilmekte, tek bir enfekte hücrenin dahi görülmesi o numunenin seronegatif olarak değerlendirilebilmesi için yeterli olmaktadır. SN testinde ise değerlendirmenin yapılabilmesi, testte kullanılan cp referens BVD virusun sitopatolojik etkisini göstermesine bağlı olmakta, bu da testin değerlendirilme süresini uzatmaktadır. SN testinde, hücrelerde meydana gelen patolojik değişiklikler doku kültürü mikroskopu ile tesbit edildiğinde o örnek test prosedürü gereği seronegatif olarak değerlendirilmektedir. Bu da sitopatolojik etkinin görülebilmesi ve testin değerlendirilebilmesi için sürenin gecikmesine neden olmaktadır. SN testinin bir başka dezavantajı, hücrelerde meydana gelen morfolojik değişikliklerin yalnızca virusun varlığına bağlı olarak meydana gelmemesi, farklı birtakım faktörlerden kaynaklanabilecek morfolojik değişikliklerin de viral cpe olarak değerlendirilebilmesidir. Testi değerlendiren araştırmacının testi okumasındaki yorum hatası (29), testte kullanılan hücrelerin yaşlı olması (10,22) ve test örneği içinde bulunabilecek toksik etkili substanslardan kaynaklanabilecek morfolojik hücre değişiklikleri viral cpe olarak değerlendirilebilmekte, bu da

NPLA testi ile SN testi arasındaki farkı/uyumsuzluğu doğurmaktadır. Oysa NPLA testinde bu olumsuz faktörlerin hiçbirisi testin değerlendirilmesinde rol oynamamakta, tek bir enfekte hücre bile tesbit edilebilmektedir. Gerek testin değerlendirme süresinin kısa olması ve gerekse testin değerlendirilmesindeki hata payının neredeyse hiç olmaması, NPLA testini, SN testinin önüne geçirmekte ve onu daha avantajlı hale getirmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına benzer bir sonuç Hyera ve ark.(15)'nin yaptıkları bir çalışmada da elde edilmiş, araştırmacılar 425 adet sığır serumuna NPLA ve SN testlerini uygulamışlar ve NPLA testi ile % 48 olarak saptanan seropozitiflik oranını, SN testinde % 45 olarak tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, deneysel olarak BVD virusu ile intranasal yolla enfekte ettikleri hayvanlarda nötralizan antikorların SN testine oranla NPLA testi ile çok daha erken saptanabileceğini de bildirmişlerdir.

Bu çalışma, aynı zamanda Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi sığırlarında BVD virus enfeksiyonunun seroprevalansını da kapsamlı olarak ortaya koymaktadır. Türkiye'de

BVD virus enfeksiyonunun varlığına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır (1,4,8,17,26). Alkan ve Burgu (1) tarafından yapılan çalışmada BVD virus antikorlarının tespiti için SN testi kullanılmış ve 639 adet sığır serumunun 203 (%31.7)'ünde seropozitiflik saptanmıştır.

Gelferd (8) Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden elde ettiği serum örneklerinde NPLA testi ile BVD virusuna karşı spesifik antikor varlığını % 74 olarak bildirmiştir. Burgu ve Özkul (4) 50 adet gebe sığırın kan serumlarına uyguladıkları SN testi sonucunda, 40 adet (%80) sığırdaki BVD virusu nötralizan antikor varlığını tespit etmişlerdir. Özkul ve ark. (26) yaptıkları çalışmada ise, NPLA testi kullanılarak Türkiye'nin farklı bölgelerinden örnekledikleri 538 adet sığırın 370 adedinde (%68.7) seropozitiflik saptamışlardır. Karaoğlu (17), yine aynı yöntemle farklı bölgelerden örneklediği 183 adet sığır serum örneğinin 136 adedinde (%74.3) BVD virus antikoru tespit etmiştir.

Gerek bu araştırmada elde edilen serolojik bulgular ve gerekse Türkiye'de bu konuda çalışma yapmış diğer araştırmacıların (1,4,8,17,26) elde ettikleri serolojik veriler ülkemizde BVDV enfeksiyonunun yaygın olarak görüldüğünü ve hayvanların büyük bölümünün seropozitif olduğunu ortaya koymaktadır. Bir sürüde yüksek düzeyde seropozitifliğin tespit edilmesi o sürü içinde persiste enfekte hayvanların varlığını düşündürmekte ve persiste enfekte hayvanların varlığı ise sürü içinde yüksek düzeyde BVD virus prevalansına neden olmaktadır. Meyling ve ark. (21) yaptıkları çalışmada persiste enfekte hayvanların bulunduğu sürülerde BVD virus antikor prevalansını % 87, persiste enfekte hayvanların bulunmadığı sürülerde ise antikor prevalansını % 43 olarak saptamışlardır. Harkness ve ark. (12), yaptıkları serolojik taramalarda 1 yaşın üzerindeki sığırların % 60-80'inin virus nötralizan antikor taşıdığını göstermiş, bu kadar yüksek seropozitifliğin sürüdeki persiste enfekte hayvanların varlığına bağlı olduğunu bildirmiştir. Sürü içinde bulunan persiste enfekte hayvanların transplasental enfeksiyonlara neden olabileceği, bu hayvanların sürü içinde başka

persiste enfekte hayvanların oluşmasında önemli rol oynadığı ve persiste enfekte hayvanların epidemiyolojik önemleri gözönüne alındığında, sürü içindeki persiste enfekte hayvanların tesbitine ve bu hayvanların sürüden uzaklaştırılmalarına yönelik çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın da bir sonucu olarak, sürü içinde persiste enfekte hayvanların tesbitine yönelik olarak gerçekleştirilecek prosedürde NPLA testi daha duyarlı olması ve daha kısa sürede değerlendirilebilmesi nedeniyle öncelikli olarak tercih edilmelidir. Ancak bu testin uygulama olanağının bulunmadığı durumlarda SN testi, sözkonusu dezavantajları gözönüne alınarak uygulanabilecek serolojik bir yöntem olarak önerilmektedir.

Kaynaklar

1. Alkan, F., Burgu, İ. (1993). *Investigation on the incidence of Bovine Viral Diarrhea Virus in calves born with encephalopathy in Turkey*. Dtsch Tierärztlch Wschr. 100 : 107-109.
2. Baker, J.C. (1987). *Bovine Viral Diarrhea Virus: a review*. J Am Vet Med Assoc. 190 (11): 1449-1458.
3. Brownlie, J., Clarke, M.C., Howard, C.J., Pocock, D.H. (1987). *Pathogenesis and epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus infection of cattle*. Annls Rech Vet. 18: 157-166.
4. Burgu, İ., Özkul, A. (1993). *Detection of Bovine Virus Diarrhea (BVD) Virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey*. Dtsch Tierärztlch Wschr. 100: 361-363.
5. Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, M.J., White, D.O. (1993). *Veterinary Virology*. 2nd Ed., Academic Press, Inc., San Diego, 441-455.
6. Fernandez, A., Hewicker, M., Trautwein, G., Pohlenz, J., Liess, B. (1989). *Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus*. Vet Pathol. 26: 26-32.
7. Frey, H.R., Liess, B. (1971). *Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit einer zytopathogenen VD-MD Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-methode*. Zbl Vet Med. B. 18: 61-71.
8. Gelferd, C.C. (1991). *Epidemiologische untersuchungen über die Verbreitung des BVD-virus bei Rindern in der Türkei*. Inaugural Dissertation, Tierärztlich Hoch, Hannover
9. Gillespie, J.H., Schlafer, D.H., Foote, R.H., Quick, S., Dongherty, E., Schiff, E., Allen, S. (1990). *Comparison of persistence of seven bovine viruses on bovine embryos following in vitro exposure*. Dtsch Tierärztl Wschr. 97(2): 65-68.

10. Hafez, S.M. (1967). *Charakterisierung und Darstellung des Virus der 'Virusdiarrhoea-Mucosal Disease' des Rindes (VD-Virus)*. Inaugural Dissertation. Tierärztlich Hoch. Hannover
11. Harkness, J.W., Roeder, P.L., Wood, I. (1984). *Mucosal disease in cattle*. Vet Rec, 115 (8): 186.
12. Harkness, J.W., Sands, J.J., Richards, M.S. (1978). *Serological studies of mucosal disease virus England and Wales*. Res Vet Sci, 24: 98-103.
13. Holm Jensen, M. (1981). *Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays*. Acta Vet Scand, 22: 85-98.
14. Howard, C.J., Brownlie, J., Clarke, M.C. (1987). *Agriculture: Pestivirus infections of ruminants. A seminar in the CEC programme of coordination of research on animal husbandry*, 69-77.
15. Hyera, J.M.K., Liess, B., Frey, H.-R. (1987). *A direct neutralizing Peroxidase Linked Antibody Assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus*. J Vet Med, 34: 227-229.
16. Kahrs, R.F. (1973) *Effects of bovine viral diarrhoea on the developing fetus*. J Am Vet Med Ass, 163 (7): 877-878.
17. Karaoğlu, T. (1996). *Sahadan izole edilen bovine viral diarrhoea virus (BVDV) suşlarının immunplak test yardımı ile biyotip karakterlerinin (sitopatojen -cp ve sitopatojen olmayan-ncp) saptanması*. Ankara Üniv Sağlık Bil Enst Doktora tezi
18. Katz, J.B., Ludemann, L., Pemberton, J., Schmerr, M.J. (1987). *Detection of bovine virus diarrhoea virus in cell culture using an immunoperoxidase technique*. Vet Microbiol, 13: 153-157.
19. Le Comte, C., Pin, J.J., Moerlooze, L.D., Vanderberg, D., Lambert, A.F., Pastoret, P.P., Chapuis, G. (1990). *ELISA detection of bovine viral diarrhoea virus specific antibodies using recombinant antigen and monoclonal antibodies*. Vet Microbiol, 23: 193-201.
20. Lopez, O.J., Osorio, F.A., Donis, R.O. (1991). *Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol, 29 (3) 578-582.
21. Meyling, A., Houc, H., Jensen, A.M. (1990). *Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus*. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 9(1): 75-93.
22. Mills, H., Luginbuhl, R.E. (1965): *Third passage bovine kidney cell cultures. An excellent system for preparing the Oregon C24V Mucosal disease agent*. Cornell Vet, 55:344-354.
23. Mogar, R., Minoncha, H.C., Montpetit, C., Carman, P.S., Lecomte, J. (1998). *Typing of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus reference and Canadian field, strains using a neutralising monoclonal antibody*. Can J Vet Res, 52: 42-45.
24. Muvavarirwa, P., Munjeri, N. (1992). *A comparison of two methods for demonstrating antibodies to the virus of bovine virus diarrhoea-mucosal disease complex*. Zimbabwe Vet J, 23(4): 137-139.
25. Olafson, P., Mc Callum, A.D., Fox, F.H. (1946). *An apparently new transmissible disease of cattle*. Cornell Vet, 36: 205-213.
26. Özkul, A., Çabalar, M., Bilge, S., Akça, Y., Burgu, İ. (1995). *Süt sığırcılığı işletmelerinde rastlanan IBR/IPV ve BVD virus enfeksiyonlarının infertilite olgularındaki rolü*. Ankara Üniv Veteriner Fak Derg, 42: 381-387.
27. Radostits, O.M., Littlejohns, I.R. (1988). *New concepts in the pathogenesis. Diagnosis and control of disease caused by bovine viral diarrhoea virus*. Can Vet J, 29:513-528.
28. Roeder, P.L., Drew, T.W. (1984) *Mucosal disease of cattle: A late sequel to fetal infection*. Vet Rec, 114: 309-313.
29. Schepers, J. (1990): *Bovine Virus Diarrhoea: Suche nach 'matching Pairs' zytopathogener und nicht-zytopathogener Virusisolate bei individuellen Rindern und ihre Analyse mittels monoklonaler Antikörper*. Inaugural Dissertation, Tierärztlich Hochschule Hannover

Yazışma Adresi:

Dr.Taner Karaoğlu
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Viroloji Anabilim Dalı,
Dışkapı / ANKARA