

Persiste enfekte sığırlarda BVDV'nin organ dağılımı

Feray ALKAN¹, Kadir YEŞİLBAĞ², İbrahim BURGU¹

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara; ² Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Bursa

Özet: BVDV ile persiste enfekte (PI) sığırlarda virusun organ dağılımının virolojik olarak araştırıldığı bu çalışmada 8 adet PI sığırdan örneklenen toplam 75 organ/doku materyali değerlendirildi. Virus izolasyonu amacıyla peroksidaz bağlı antikor tekniği (PLA) kullanıldı. Akciğer, kalp, böbrek, dalak, beyin ve beyincik örneklerinin tamamından, lenfotiküler dokuların ise büyük bir çoğunluğundan virus izolasyonu gerçekleştirildi. Sindirim sisteminden alınan çeşitli örneklerde BVDV tespiti %50-%87.5 arasında belirlendi. Değerlendirilen bir ovaryumda enfektif virus varlığı saptandı. Buna karşın, uterus örneği BVDV yönünden negatif olarak değerlendirildi.

Anahtar kelimeler: BVDV, organ dağılımı, persiste enfeksiyon, sığır

The distribution of the bovine viral diarrhoea virus in tissue samples from persistently infected cattle

Summary: In this study, tissue distribution of BVD virus was investigated virologically in 75 tissue/organ samples from 8 persistently viremic cattle. For this purpose, peroxidase linked antibody assay (PLA) was used. BVD virus was detected from all samples of lung, kidney, spleen, heart, cerebrum and cerebellum, as well as from various lymph nodes. Virus was detected in 71% of liver samples. The detection rate of BVD virus from various parts of alimentary tract range between 50% and 87.5%. One sample of ovarium was found to be infected. Virus was not detected in one uterus sample.

Key words: BVDV, cattle, organ distribution, persistent infection

Giriş

Bovine viral diarrhoea (BVD) enfeksiyonu, sığırlarda sindirim sistemi enfeksiyonu ve transplasental enfeksiyonlar sonucu gelişen reproduktif performans düşüklüğüne bağlı olarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Klinik belgeler subklinik enfeksiyondan ölümcül mucosal disease (MD)'e kadar değişen bir seyir izler (1,6,13,22,29).

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) Flaviviridae familyasının *Pestivirus* genusunda yer almaktadır. Etken serolojik olarak tek tip olmasına karşın, biyotipik olarak iki farklı karakter sergiler. Bunlar; hücre kültüründe morfolojik değişimler oluşturarak üreyen sitopatojen (cp) biyotip ve herhangi bir değişiklik oluşturmadan üreyen sitopatojen olmayan (ncp) biyotiplerdir. Biyotipler arası ilişkinin enfeksiyonun seyri ve patogenezinde belirleyici rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (7,24).

İmmünkompetensin gelişimi öncesinde (fötal yaşamın 125. gününden önce) ncp BVD virus ile enfekte olan fötusta, BVDV bünyeleşmekte ve virus bütün fötusa yayılmaktadır. Bunun sonucu olarak, BVD virusu ile enfekte olarak doğan immuntolarant bireyler "persiste enfekte (PI)" olarak tanımlanırlar. Persiste enfekte hayvanlarda postnatal yaşamda da varlığını devam ettiren virus, çoğunlukla oral, nazal ve genital sekresyonlar ile etrafa saçılmakta, ayrıca gebe kalma çağına ulaşan hay-

vanlarda vertikal olarak yavruya aktarılabilir. Bu nedenle, persiste viremik bireyler, BVD virus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde en önemli kaynağı oluşturmaları (2,8,12,21).

Persiste viremik hayvanların epidemiyolojik rolü üzerine yapılan çalışmalar, kan, oküler ve nazal swap örneklerinden etken tespiti (2,8), immunohistokimyasal çalışmalarla etkenin organ ve hücre duyarlılığının belirlenmesi (10-12,19,20) ile persiste enfekte hayvanların bulunduğu sürülerde gelişen subklinik/akut enfeksiyonlar ve sonuçları (8,21,27) üzerinedir. Bu çalışmaların tümü persiste enfekte hayvanların buldukları sürüler için potansiyel bir risk olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, 8 persiste enfekte sığırdaki BVD virusun organ dağılımı virolojik olarak araştırılmış ve elde edilen veriler BVD virus enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve patogenezinin araştırıldığı çalışmalar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Örneklenen hayvanlar ve virus izolasyon materyalleri: Araştırmada, en az 3 hafta ara ile alınan iki kan örneğinde BVD virus tespitine dayanılarak persiste enfekte oldukları belirlenen ve bu nedenle işletme yetkilileri tarafından sürüden çıkartılan 8 sığıra ait otopsi materyalleri (karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, kalp, ovaryum, rumen,

uterus, kalın bağırsak, ince bağırsak, omazum, abomazum, beyin, beyincik ve çeşitli lenf yumruları) kullanıldı. Söz konusu 8 PI sığırdan sağlanan toplam 75 adet organ materyali kısa sürede laboratuvara nakledildi ve yöntemi-ne uygun olarak hazırlandı.

Bu amaçla son konsantrasyonu 1/10 olacak şekilde PBS içinde hazırlanan organ parçaları homojenizatörün tüplerine aktarılarak, homojenize edildi. Homojenat 3000 devirde 30 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantı alındı ve antibiyotik ilave edildi. Sterilite kontrolünü takiben süpernatant -80°C 'de saklandı.

Hücre kültürü: Araştırmada primer ve sekonder fetal dana böbrek (FDB) hücre kültürü kullanıldı. Hücreler standart yöntemle hazırlandı ve kullanıma alınmadan önce, BVD virusu yönünden PLA testi ile kontrol edildi. Hücrelerin üretilmesinde %10 fetal dana serumlu DMEM (Dulbecco's modified minimal essential medium) kullanıldı.

Virus: Organ materyallerinde BVD virus antijenlerinin belirlenmesi için kullanılan peroksidaz bağlı antikor (PLA) testinde kontrol virus olarak BVD virusun sitopatojen olmayan 0712/ Hannover suşu kullanıldı.

Konjugat: PLA testinde kullanılan BVD virusa spesifik konjugat, peroksidaz enzimi ile işaretli domuz anti-BVD virus IgG olup, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda hazırlandı.

Metot

Virus izolasyonu: BVD virus izolasyonu amacıyla organ örnekleri FDB hücre kültürüne adsorbsiyonsuz yöntemle inokule edildi. Ertesi gün vasatı değiştirilen kültürler, 37°C 'de 5 gün inkübasyonu takiben -80°C 'de dondurulup-çözdürüldü ve elde edilen kültür sıvıları PLA testinde BVD virus antijeni tespiti amacıyla kullanıldı.

Peroksidaz bağlı antikor testi (PLA): Test Hyera ve ark.(16)'nın bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Bu amaçla, 24 gözlü test tabletlerinin gözlerine fetal dana böbrek hücre süspanسیونundan (100.000 hücre/ml) 1'er ml konuldu. Yirmi dört saat sonra, daha önce elde edilmiş olan 1. pasaj kültür sıvılarından her materyal için 1 tablet gözüne 0,1 ml inokule edildi. Tabletlerin %5 CO_2 'li etüvde 3 gün süreyle inkübasyonunu takiben, hücreler phenol red içermeyen PBS ile yıkandı ve $+80^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat süreyle fikze edildi. Fikze olan hücreler tween-20 içeren PBS içerisinde tütresi oranında (1/100) sulandırılan konjugatla 1 saat süreyle oda sıcaklığında muamele edildi. Süre sonunda 3 kez yıkama yapıldı ve substrat solüsyonu (3-amino 9-etil karbazol+ H_2O_2) ilave edildi. Sonuçlar doku kültürü mikroskopunda, kırmızı kahverengi hücre içi boyanmanın görülmesi esasına göre değerlendirildi.

Bulgular

Örneklenen 8 PI sığırdan sağlanan toplam 75 organ materyalinden 64'ünde BVD virus varlığı saptandı (Tablo 1).

Elde edilen sonuçlara göre, karaciğer, dalak, böbrek, akciğer, kalp, ovarium, lenf yumruları (preskapular, bron-

şial, mediastinal), beyin ve beyincik örneklerinde %100, uterus dışındaki diğer organlarda ise %50-87.5 oranında BVDV varlığı saptandı. Değerlendirilebilen bir uterus materyali BVDV yönünden negatif bulundu (Tablo 1).

Tartışma ve Sonuç

Persiste enfekte hayvanlardan sağlanan çeşitli organlarda ncp BVD virusun varlığı etken izolasyonu ve/veya immunohistokimyasal çalışmalar ile saptanmış ve bunun sonucunda PI sığırların taşıyıcılığı ile bazı sistemler/organlara (örn. reproduktif sistem, akciğer) olan duyarlılığı ortaya konulmuştur (2,14,19,20). PI hayvanlarda BVDV'nin organ dağılımı ve etkenin lokalizasyonu, PI hayvandan virus saçılımı yolları, enfekte bireylerde immunsupresyon ve özellikle BVDV enfeksiyonu ile ilgili reproduktif problemlerin değerlendirilmesine ışık tutmaktadır.

BVD virusu lenforetiküler sistemde direkt tahribat yaparak ve enfekte ettikleri organlardan immunsupresif maddelerin salınımına yol açarak lenforetiküler sistemde etkili olmakta; bunun sonucunda immunsupresyona neden olmaktadır (4,15,17). Bu araştırmada immün sistem ile ilgili karaciğer, dalak ve çeşitli lenf yumrularında BVD virusu yüksek oranda (%100) saptanmıştır. Bu bulgular etkenin immün sisteme olan affinitesini bildiren birçok araştırmaya (19,20,29) paraleldir.

BVDV ile akut enfekte yada PI gebe sığırlarda fötusun enfeksiyonu abort ya da persiste viremik buzağı doğumu olgularına neden olabilmektedir (4,6,8). Enfekte bireylerden fötusa virus nakli, virusun hematogen yolla plasentayı geçmesi, genital mukoza yoluyla girip amniyonu geçmesi ve ovaryumlardaki gametlerin enfeksiyonu sonucu gelişebilmektedir (11,26,28).

Fray ve ark.(11) ovarium oocytlerinde BVDV lokalizasyonunu araştırdıkları çalışmalarında: primer ve sekonder oocytlerde BVD viral antijenlerinin varlığının saptanmasının persiste enfekte bireylerin yeni persiste enfekte yavrular doğurmasında önemli olduğunu bildirmişlerdir. Fredriksen ve ark. (12) PI hayvanlarda yaptıkları araştırmalarında ovaryum, uterus, plasentom ve fetal membranlarda BVDV spesifik antijenler saptamışlar ve ayrıca bu hayvanların fötuslarına ait dalak, karaciğer, akciğer ve bağırsak örneklerinde antijen lokalizasyonunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar (12), ayrıca gebe hayvanların uteruslarında gebe olmayanlara oranla daha yoğun antijen saptadıklarını ve buna göre gebeliğin uterus virus çoğalmasında teşvik edici bir faktör olduğunu belirtmişlerdir.

Bu araştırmada her ne kadar reproduktif sisteme ait organlardan sadece bir uterus ve bir ovarium örneği değerlendirilebilmiş ise de, BVDV varlığının uterusda saptanmamış olmasına karşın, ovaryumdan tespiti üzerinde durulacak bir bulgudur. Uterus örneği değerlendirilen 1 no'lu hayvanın gebe olmadığı tespit edilmiştir. Bu hayvanın ovaryum örneğinden virus izole edilirken uterus ör-

Tablo 1. Organ materyallerinde BVD virus izolasyonu ve oranları.
Table 1. The rate of the BVD virus detection in sampling tissue.

Organ	Hayvan no								Materyal sayısı (BVDV(+)/ Top.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Karaciğer	+	-		+	-	+	+	+	71 (5/7)
Böbrek	+	+						+	100 (3/3)
Dalak	+	+	+	+	+	+	+	+	100 (8/8)
Akciğer	+	+	+	+		+	+	+	100 (7/7)
Kalp	+	+				+	+	+	100 (5/5)
Kalın bağırsak	-	-				+	+	+	60 (3/5)
İnce bağırsak	+	-		+	+	+	+	-	62 (5/8)
Omazum	+	+							100 (2/2)
Rumen	-	+							50 (1/2)
Abomazum	-	+							50 (1/2)
Ovaryum	+								100 (1/1)
Mezenterik LY	+	+	+	+	-	+	+	+	87.5 (7/8)
Intramammar LY	+	+							100 (2/2)
Mediastinal LY	+	+	+	+		+	+	+	100 (7/7)
Bronşial LY	+	+							100 (2/2)
Üterus	-								0 (0/1)
Preskapuler LY	+								100 (1/1)
Beyin						+	+		100 (2/2)
Beyincik						+	+		100 (2/2)
TOPLAM									85 (64/75)

(+) : BVD Ag pozitif

(-) : BVD Ag negatif

LY : Lenf yumrusu

neğinden izolasyon yapılamamış olması, uterusu virus üremesini aktive edici bir faktör olan gebeliğin söz konusu olmamasına bağlı olabilir. Diğer taraftan izolasyon çalışmalarında olumlu sonuç alınmamış olmasına rağmen, doku kesitlerinde immunhistokimyasal çalışmalarla virusa özgün antijenlerin ortaya konulabilmesi de mümkün olabilir.

Bunlardan başka nörolojik bozukluklar ile doğan buzağuların beyin, deri, böbrek, karaciğer, dalak, testis ve spinal kordlarında, keza okülo-serebellar semptomlarla doğan buzağuların çeşitli dokularında da BDV antijeni tespiti birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (26,28). Merkezi sinir sisteminde yapılan immunohistokimyasal

çalışmalar ise nöronların enfeksiyonunu ortaya koymaktadır (10,14). Bu çalışmada da iki persiste enfekte bireye ait beyin ve beyincik materyalleri değerlendirilmiş olup, materyallerin tümünde BVDV varlığı belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; akciğer, kalp, ovarium, beyin, beyincik gibi organların tamamından virus izolasyonu yapıldığı görülmektedir. Buna karşın, omazum hariç sindirim sistemine ait organlarda virus izolasyonu oranı %50-62 olarak saptanmıştır.

Liebler ve ark. (18) deneysel MD olgularında bağırsaklarda cp ve ncp BVDV antijenlerinin dağılımlarını histokimyasal olarak incelemişler ve persiste enfeksiyon olgularında bağırsakların tamamında ve ilişkili dokularda

mucosal disease'e göre oldukça seyrek düzeyde antijen varlığının söz konusu olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada elde edilen virolojik sonuçlar Liebler ve ark. (18)'nin bulgularını desteklemekle birlikte, BVD virusun özellikle kan dolaşımının yoğun olduğu doku veya organlarda daha sıklıkla lokalizasyonunu da ortaya koymuştur.

Sığır popülasyonunda persiste enfeksiyonların oranı kesin olarak bilinmemektedir. Bununla beraber, sığırlarda persiste enfeksiyonların oranı %1-2 olarak bildirilmektedir (3,5,8). Ancak, BVDV enfeksiyonuna bağlı klinik tabloların yoğun olarak izlendiği sürülerde daha yüksek persiste enfeksiyon oranlarının saptandığı çalışmalar da (27,30) bulunmaktadır.

Bir sürüde BVD seropozitiflik oranına etki eden önemli faktörlerden birisi persiste viremik hayvanların varlığıdır (21). Meyling ve ark. (21), sürüde bulunan viremik bireylerin sürüdeki duyarlı hayvanlarda yüksek oranda immun yanıt oluşumuna sebep olduğunu bildirmişlerdir. Moerman ve ark. (23) ise yaptıkları geniş kapsamlı epidemiyolojik araştırmalarında; büyük bir sütçü sürüdeki hayvanların 4 yıl boyunca BVD virus yönünden seronegatif olduklarının saptandığını, ancak sürüye persiste viremik bir hayvanın girmesini takip eden 2 yıl içinde sürünün %85'inin enfeksiyonla tanıştığını ve sürüde çok yüksek oranlarda persiste viremik buzağı doğumlarının gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Burgu ve ark.(9)'nin çalışmalarında da PI hayvan varlığı saptanan sürülerde %78.6-82.1 seropozitiflik saptanırken, PI hayvan saptanmayan işletmede seropozitiflik oranı %7.7 olarak belirlenmiştir.

PI bireylerin katıldığı sürülerde yüksek seropozitiflik tespiti ile klinik ya da subklinik enfeksiyonların gelişmesi ve bu enfeksiyonların sonuçları (abort, anomalili doğum) bu bireylerin yoğun olarak sekret ve ekskretleri ile virus saçtığına açık göstergesidir. Nitelikim, bu durum nasal ve okular swap örneklerinden etken izolasyonu ile ortaya konulmuştur (2). Ayrıca, immunohistokimyasal çalışmalarda özellikle solunum sistemi organlarının epitel hücrelerinde etken varlığının yüksek oranda saptanmış olması da sisteme ilgili sekret ve ekskretler ile virus saçılmasına işaret etmektedir (19). Bu çalışmada kullanılan akciğer örneklerinin tümünde BVDV saptanmış olması akciğerlerin etkenin önemli lokalizasyon bölgelerinden olduğunu ve dolayısıyla solunum sekretlerinin önemini bildiren araştırmacıların (2) bulguları ile paralellik göstermektedir.

BVD virusun organ lokalizasyonuna ilgili çalışmaların çoğunluğu immunohistokimyasal araştırmalardır. Immunohistokimyasal çalışmalar organ lokalizasyonu yanı sıra virusun affiniteli olduğu hücreleri de ortaya koymaktadır (14,18,19,25). Bu çalışmada ise organ materyallerinden virus izolasyonuna ilgili olarak BVD virusun organ dağılımları belirlenmiş olup, bulgular immunohistokimyasal çalışmaların sonuçları ile paralellik

göstermiştir. Bununla birlikte, etkenin kan hücrelerinden yüksek oranda saptanabiliyor olması ve tüm dokularda kanın sirküle olduğu gerçeği gözden uzak tutulmamalıdır.

Sonuç olarak, bu araştırmada persiste enfekte hayvanlarda BVD virusun organ dağılımı virolojik olarak ortaya konulmuş ve elde edilen bulgulara göre PI hayvanların BVD enfeksiyonunun epidemiyolojisindeki rolü değerlendirilmiştir. Bu bilgiler ışığında sürülerdeki bireylerin BVD virusla persiste enfeksiyon yönünden kontrollerinin yapılması ve PI bireylerin sürüden çıkartılması önerilmektedir. Bundan başka, değişik sistemlere ilgili problemleri (fertilite problemleri, solunum sistemi enfeksiyonu bulguları gösteren) olan hayvanlarda yapılacak virolojik ya da immunohistokimyasal çalışmaların, bu olguların oluşumunda BVD virus enfeksiyonunun (akut enfeksiyon/PI enfeksiyon) rolü ve patogenezine ilgili verileri detaylı olarak ortaya koyacağını belirtmekte yarar görülmektedir.

Kaynaklar

1. Alkan F, Burgu İ (1993): *Investigation on the incidence of Bovine Viral Diarrhoea Virus in calves in Turkey*. Dtsch Tierarztl Wschr, **100**, 107-109.
2. Barlow RM, Nettleton PF, Gardiner AC, Greig A, Campbell JR, Bonn JM (1986): *Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull*. Vet Rec. **118**, 321-324.
3. Bock RE, Rodwell BJ, McGowan M (1997): *Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in sample of dairy calves in south-eastern Queensland*. Aust Vet J, **75**, 656-659.
4. Bolin SR, Mc Clurkin AW, Coria MF (1985): *Effect of bovine viral diarrhoea virus on percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle*. Am J Vet Res, **46**, 884-886.
5. Bolin SR, Mc Clurkin AW, Coria MF (1985): *Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds*. Am J Vet Res, **46**, 2385-2387.
6. Brownlie J (1985): *Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle*. Farm Prac. **11**, 195-202.
7. Brownlie J (1991): *The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease*. Arch Virol. Suppl **3**, 79-96.
8. Burgu İ, Alkan F, Yeşilbağ K (1999): *Türkiye'de sığırlarda persiste BVD virus enfeksiyonu*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **46**, 169-177.
9. Burgu İ, Özkul A (1993): *Detection by cultural isolation of Bovine Virus Diarrhoea (BVD) Virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey*. Dtsch Tierarztl Wschr, **100**, 361-363.
10. 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 viral diarrhoea virus*. Vet Pat, **26**, 26-32.
11. Fray MD, Prentice H, Charleston B (1996): *Localization of bovine viral diarrhoea virus p80 antigen in germ cells recovered from persistently infected heifers*. Third ESVV

- Symposium on Pestivirus Infections. Lelystad, The Netherlands, pp 125-126 (Abstract).
12. **Fredriksen B, Press C McL, Loken T, Odegaard SA** (1999): *Distribution of viral antigen in uterus, plasenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus.* Vet Microbiol, **64**, 109-122.
 13. **Fritzmayr J, Haas L, Liebler E, Moening V, Grieser-Wilke I** (1997): *The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms.* Arch Virol, **142**, 1335-1350.
 14. **Hewicker M, Wöhrmann T, Fernandez A, Trautwein G, Liess B, Moening V** (1990): *Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies.* Vet Microbiol, **23**, 203-210.
 15. **Howard CJ** (1990): *Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections.* Rev Sci Tech Off Int Epiz, **9**, 95-103.
 16. **Hyera JMK, Liess B, Frey HR** (1987): *A direct neutralizing peroxidase-linked antibody assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus.* J Vet Med B, **34**, 227-239.
 17. **Ketleson AT, Johnson DW, Muscoplat CC** (1979): *Depression of bovine monocyte chemotaxis by bovine viral diarrhoea virus.* Infect Immun, **25**, 565-568.
 18. **Liebner EM, Waschbüsch J, Pohlenz JF, Moening V, Liess B** (1991): *Distribution of antigen of non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease.* Arch Virol, suppl **3**, 109-124.
 19. **Liebner-Tenorio EM, Greiser-Wilke I, Pohlenz JF** (1997): *Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease.* Arch Virol, **142**, 1613-1634.
 20. **McClurkin AW, Bolin SR, Coria MF** (1985): *Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea.* JAVMA, **186**, 568-569.
 21. **Meyling A, Houe H, Jensen AM** (1990): *Epidemiology of BVDV.* Rev Sci Tech Off Int Epiz, **9**, 75-93.
 22. **Moening V, Frey HR, Liebler E, Pohlenz J, Liess B** (1990): *Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro.* Vet Rec, **127**, 200-203.
 23. **Moerman A, Straver PJ, De Jong MCM, Quak J, Banvinger T, Van Oirschot JT** (1992): *A long-term epidemiological study of bovine virus diarrhoea virus infections in a large herd of dairy cattle.* Proc Second Symp on Pestiviruses. 1-3 October 1992, Annecy, France.
 24. **Nakajima N, Fukuyama S, Hirahara T, Takamura K, Okada N, Kawasu K, Ui S, Kodama K** (1993): *Induction of mucosal disease in cattle persistently infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus.* J Vet Med Sci, **55**, 67-72.
 25. **Ohmann HB** (1988): *BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: Implications for the pathogenesis of clinically fatal disease.* Acta Vet Scand, **29**, 77-84.
 26. **Ohmann HB, Jensen MH, Sorensen KJ, Dalgaard K** (1982): *Experimental fetal infection with bovine viral diarrhoea virus. I. Virological and serological studies.* Can J Comp Med, **46**, 357-362.
 27. **Shimizu M, Satou K** (1987): *Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in epidemic areas.* Jpn J Vet Sci, **49**, 1045-1051.
 28. **Straver PJ, Journee DHJ, Binkhorst GJ** (1983): *Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus. II. Virology and epizootiology.* Vet Quart, **5**, 156-164.
 29. **Spagnuolo-Weaver M, Allan GH, Kennedy S, Foster JC, Adair BM** (1990): *Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection.* J Vet Diagn Invest, **9**, 287-297.
 30. **Taylor LF, Jansen ED, Ellis JA, Van den Hurk JV, Ward P** (1997): *Performance, survival, necropsy and virological findings from calves persistently infected with the bovine viral diarrhoea virus originating from a single Saskatchewan beef herd.* Can Vet J, **38**, 29-37.

Yazışma adresi:

Prof. Dr. Feray Alkan
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Viroloji Anabilim Dalı
06110 Dışkapı, Ankara