

## Farklı laboratuvarlarda aynı adla kullanılan BVDV suşları arasında antijenik farklılıklar

Kadir YEŞİLBAĞ<sup>1</sup>, Aykut ÖZKUL<sup>2</sup>, İbrahim BURGU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dalı, Bursa; <sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara

**Özet:** Aynı adla bilinen fakat değişik laboratuvarlarda farklı pasaj geçmişine sahip olan virüslerin antijenik yapılarında farklılıklar oluşabileceği savunulmaktadır. Bu araştırmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarında kullanılmakta olan cp BVDV NADL-Ank.Lab ve ncp BVDV suşu 0712/80/Hannover-Ank.Lab virüslerinin 15 değişik Moab'a karşı streptoavidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle test edilerek antijenik karakterizasyonunun yapılması ve elde edilecek bulguların daha önce Hannover Veteriner Yüksek Okulu Viroloji Enstitüsü'nde (HVI) aynı adla kullanılan virüslerle elde edilmiş verilerle karşılaştırılarak farklılıkların saptanması amaçlanmıştır. Araştırma neticesinde NADL-Ank.Lab ile HVI'daki NADL'lar (NADL-Ames ve NADL-Hannover) arasında birer epitopta farklılık olabileceği, 0712/80/Hannover-Ank.Lab ile elde edilen verilerle, HVI'da 0712/80/Hannover virüsüyle yapılmış çalışmalarda elde edilmiş veriler arasında ise farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Antijenik karşılaştırma, BVDV suşları, monoklonal antikorlar

### Antigenic differences among BVDV strains known under same name in different laboratories

**Summary:** In this research, antigenic characterization results of NADL-Ank.Lab and 0712/80/Hannover Ank.Lab strains of BVDV, which are being used in Virology Laboratory of Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, with results taken from the studies with viruses known under the same name in Virology Institute of Hannover Veterinary High School (HVI) were compared using Moab based streptoavidin-biotin-peroxidase technique. It is pointed out that NADL-Ank.Lab has difference just in one epitop from NADL-Ames and NADL-Hannover, are being used in HVI, according to results of previous studies. 0712/80/Hannover-Ank.Lab gave patterns which include differences from patterns of 0712/80/Hannover (HVI) derived from the same studies.

Key words: Antigenic comparison, BVDV strains in different laboratories, monoclonal antibodies

### Giriş

Bovine viral diarrhoea (BVD) virus pestiviruslar genusuna dahil, pozitif polariteli ve zarlı bir RNA virüsüdür (11). Etken tüm dünyada sığır ve koyun popülasyonlarında yaygın olarak gözlenmekte, klinik veya subklinik enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Hastalık hafif bir enteritisle karakterize sindirim sistemi enfeksiyonundan, abort, mumifiye fötüs, fötal anomaliler ve repeat breeding'e varan genital sistem enfeksiyonları ile solunum sistemi enfeksiyonlarına kadar uzanan bir akut enfeksiyon tablosuna sahiptir (1,9). Ayrıca, fötal hayatın 45-120. günleri arasında sitopatogen olmayan (ncp) BVD virüsü enfekte olan sığır fötüslerinde persiste enfeksiyon (PI) gelişmekte ve bu bireyler postnatal yaşamlarında mucosal disease (MD) riski taşımaktadır (2). MD, ncp BVD virüsü biyotipiyle PI olan sığırın postnatal yaşamda homolog sitopatogen (cp) biyotiple süperenfekte olması ile ortaya çıkan ölümcül bir tablodur.

Olafson (14)'ün 1946 yılında BVD'yi ilk kez tanımlamasından bugüne BVD virüsü yapılan çalışmalarda oldukça önemli yol alınmıştır. Öncelikle, virüsün iki farklı biyotipinin varolduğu (6,7) ve bu biyotipler arasındaki ilişkinin MD'nin patogenezi şekillendirdiği (3), ayrıca virüsün özgün bir PI modelinin olduğu ortaya ko-

ulmuştur. Son 20 yılda ise virolojide monoklonal antikorlar (Moab) ve polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanılması önemli virolojik gelişmelerdir.

Bu süreç içerisinde dünyanın değişik bölgelerindeki laboratuvarlarda BVD virüsü suşlarının izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolatların zaman zaman laboratuvarlar arasında veya yeni kurulan laboratuvarlara nakli ve buralarda üretilerek kullanımı söz konusu olmaktadır. Referenz suş olarak kabul edilen NADL (National Animal Disease Laboratory) ile birlikte New York-1, Osloss, Oregon C24 ve Singer gibi suşlar değişik laboratuvarlardaki çalışmalarda en çok kullanılan BVD virüsü suşları olarak göze çarpmaktadır.

Farklı laboratuvarlarda aynı adla kullanılan, fakat farklı hücre kültürlerine adapte edilmiş ve yıllar içerisinde değişen sayıda pasajlama işlemine tabi tutulmuş virüslerin antijenik kompozisyonlarında farklılıklar olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, Cay ve ark. (4) uluslararası bir workshopta elde ettikleri verilere göre farklı laboratuvarlardan temin edilen aynı adlı virüsler (örneğin farklı laboratuvarlarda kullanılan NADL veya Oregon C24 suşları) arasında antijenik farklılıkların tespit edildiğini bildirmişlerdir. Benzer bulgular Grieser-Wilke ve ark. (8) tarafından da kaydedilmiştir.

Bu araştırmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarında kullanılmakta olan cp BVDV referenz suşu BVD-NADL ve ncp BVDV suşu olarak kullanılan 0712/80 Hannover suşlarının Moab'lar kullanılarak antijenik karakterizasyonun yapılması ve elde edilecek verilerin yurt dışında yapılmış çalışmalarda elde edilmiş olan verilerle karşılaştırılarak aralarındaki farklılıkların tespiti amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

#### Hücre kültürü

Araştırmada devamlı bir hücre kültürü olan MDBK (Madin Darby bovine kidney) hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürleri kullanılmadan önce intrinsik BVDV enfeksiyonu yönünden peroksidaz bağlı antikor (PLA) tekniği ile kontrol edildi. Hücre kültürlerinin gerek idamesi gerekse testlerde kullanımında %5 fetal dana serumu ilave edilmiş olan DMEM (Dulbecco's minimal essential medium) kullanıldı.

#### Viruslar

Araştırma kapsamında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarında kullanılmakta olan cp BVDV referenz suşu NADL ve bir ncp BVDV suşu olan 0712/80/Hannover suşları kullanıldı. Her iki virus da Anabilim Dalı stoklarına 1991 yılında Hannover Veteriner Yüksek Okulu Viroloji Enstitüsü'nden (HVI) liyofilize olarak getirilmiş ve bu tarihten itibaren pasajlanarak kullanılmıştır. Daha önce HVI'da elde edilmiş olan verilerle bu araştırmada elde edilen verilerin karşılaştırmasında karışıklık olmaması için bu viruslar NADL-Ank.Lab ve 0712/80/Hannover-Ank.Lab olarak gösterildi.

#### Monoklonal antikorlar (Moab)

Araştırmada kullanılan Moab'lar Hannover Veteriner Yüksek Okulu Viroloji Enstitüsü/Almanya'dan temin edildi. Bu Moab'ların listesi protein spesifiteleri ile birlikte Tablo 1'de sunulmuştur.

#### HRPO konjugatı

Peroksidaz bağlı antikor tekniğinde (PLA) konjugat olarak, BVD virusa spesifik ve horseradish peroksidaz (HRPO) enzimi ile işaretli poliklonal hiperimmün serum kullanıldı. Konjugatın titresi 1/100 olarak hesaplandı.

#### Streptoavidin-biotin-peroksidaz sistemi

Araştırmada epitop karakterizasyonu aşamasında konjugat olarak kullanılan streptoavidin-biotin-peroksi-

daz kompleks sistemi (Amersham, Germany) ticari yolla temin edildi.

#### Substrat

Gerek streptoavidin-biotin-peroksidaz kompleks yöntemiyle gerekse PLA yöntemiyle yapılan testlerde substrat solüsyonu olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) + 3 amino 9-ethyl-carbazol (AEC) + dimethylformamid (DMF) kullanıldı.

#### Virusların üretilmesi ve enfeksiyözite güç tespiti

Her iki virusun üretilmesi amacıyla MDBK hücre kültürü kullanıldı. Adsorbsiyonlu yöntemle yapılan inokulasyonu takiben, NADL-Ank.Lab, enfekte edilen hücrelerin %80'ninde CPE oluşturduğu anda, 0712/80/Hannover-Ank.Lab ise inokulasyonun 5. gününde dondurma-çözdürme yöntemiyle toplandı. Üretilen ve  $-80^{\circ}C$ 'de muhafaza edilen virusların titrasyonu Frey ve Liess (5)'in bildirdiği şekilde yapıldı. Değerlendirme aşamasında ise Holm-Jensen (10) tarafından bildirilen peroksidaz bağlı antikor tekniği kullanıldı.

#### Peroksidaz bağlı antikor tekniği (PLA)

Her iki virusun Log<sub>10</sub> tabanına göre titrasyonunun yapıldığı mikrotitrasyon tabletlerindeki vasatlar dökülerek hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı ve  $+80^{\circ}C$ 'de 3 saat süreyle fikze edildi. Tabletler oda ısısına soğutularak her bir test gözüne 0,05 ml, titresi oranında sulandırılmış HRPO konjugatı ilave edildi. Bir saat  $37^{\circ}C$ 'de inkübasyonu takiben tablet gözleri boşaltıldı ve hücre yüzeyleri 3 kez PBS ile yıkandı. Son yıkamayı takiben tüm test gözlerine 0,05 ml substrat solüsyonu eklenerek, 20 dk beklendikten sonra ışık mikroskopunda kırmızı-kahverengi hücre içi boyanmanın gözlenmesi esasına göre değerlendirme yapıldı.

#### Hücre kültürlerinin viruslarla enfeksiyonu

Test edilecek viruslar 100DKID<sub>50</sub> oranında sulandırılarak mikrotitrasyon tabletinde test için ayrılan gözlerle 0,1 ml hacimde konuldu. Takiben tüm gözlerle 300000 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan MDBK hücre süspansiyonundan 0,05 ml hacimde ilave edildi. Tabletler %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 2 gün süreyle inkübe edildi. Üçüncü gün tabletlerdeki vasatlar dökülerek hücreler  $+80^{\circ}C$ 'de 3 saat süreyle fikze edildi.

#### Antijenik karakterizasyon

Viruslarla enfekte ve daha sonra fikze edilmiş olan hücreler 1/3 PBS ile ıslatıldıktan sonra, tabletler üzerinde

Tablo 1. Araştırmada kullanılan monoklonal antikorlar ve protein spesifiteleri.

Table 1. Monoclonal antibodies and protein specificities.

Moab	Homolog virus suşu	Protein spesifitesi
C16	NADL	p125/80
CT2, CT3, CT6, CT9	A1138/69	gp53
CA1, CA3	NADL	gp53
CA25, CA34, CA36, CA39	7443	gp53
CA73, CA78, CA80, CA82	Singer	gp53

15 Moab için ikiye göz ayrıldı. Her Moab'dan kendisi için ayrılan gözlerle 0,05 ml konuldu. Bir saat 37°C'de inkübasyonu takiben hücre yüzeyleri 3 kez 1/3 PBS'le yıkandı ve biotinle işaretli sekonder antikor (antimouse) ilave edildi. Takibeden basamakta ise streptoavidin-biotin-peroksidaz kompleksi eklendi. Her basamakta 1 saat inkübasyon ve sonrasında yıkama işlemi uygulandı. Son olarak, substrat solüsyonu ilave edildi. Değerlendirme, 20 dk beklendikten sonra, ışık mikroskopunda kırmızı-kahverengi hücre içi boyanmanın tespitine göre yapıldı.

## Bulgular

### Virusların üretilmesi ve enfeksiyözite güçleri

MDBK hücre kültürüne inokule edilen viruslardan NADL-Ank.Lab, inokulasyonu takiben 3. günde %80 düzeyinde CPE oluşturdu ve toplandı. 0712/80/Hannover-Ank.Lab ise CPE oluşturmadı ve inkübasyonun 5 güne tamamlanmasıyla toplandı. Log<sub>10</sub> tabanına göre yapılan ve PLA boyama ile değerlendirilen titrasyonlarında NADL-Ank.Lab'ın titresini DKID<sub>50</sub>=10<sup>-4,25</sup>/0,1 ml, 0712/80/Hannover-Ank.Lab'ın titresini ise DKID<sub>50</sub> = 10<sup>-6,0</sup> / 0,1 ml olarak hesaplandı. Hesaplamalar, Spearmann-Karber metoduna göre yapıldı.

### Antijenik karakterizasyon sonuçları

Monoklonal antikorlar kullanılarak streptoavidin-biotin-peroksidaz kompleks tekniği ile yapılan antijenik karakterizasyon işleminde elde edilen bulgular Tablo 2'de sunulmuştur.

Her iki virus da bir panpestivirus Moab olan C16 ile reaksiyon verirken, NADL-Ank.Lab'ın ayrıca Moab CT3, CT6, CA1, CA3, CA34, CA39, CA73, CA80 ve CA82 ile 0712/80/Hannover-Ank.Lab'ın ise Moab CT3, CT6, CA3 ve CA34 ile reaksiyon verdiği saptanmıştır.

### Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarında kullanılmakta olan BVDV cp referenz suşu olan NADL ve bir ncp BVDV suşu olan 0712/80/Hannover suşlarının p125/80 ve gp53 proteinleri üzerindeki antijenik kompozisyonlarının monoklonal antikorlar yardımıyla belirlenmesi ve aynı isimle diğer laboratuvarlarda kullanılan virusların daha önce tespit edilmiş olan antijenik yapılarıyla karşılaştırılarak farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çay ve ark. (4) 6 ülkeden orijin alan ve 5 farklı laboratuvarından temin ettikleri 33 pestivirus suşu ile yap-

ıtları çalışmalarında, özellikle farklı laboratuvarlardan gelen NADL ve Oregon C24V viruslarından elde ettikleri verilere göre, değişik laboratuvarlarda aynı adla kullanılan viruslar arasında önemli farklılıklar olabileceğini saptamışlardır. Araştırmacılar (4) bu antijenik farklılığın muhtemelen farklı kültür ortamlarında yapılan pasajlama işlemleri sırasında meydana gelen genetik değişimlerden köken aldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar (4) ayrıca, fetal dana serumundan gelebilecek viral kontaminasyon sebebiyle orijinal virus stoğunun tamamen değişmiş olabileceği yada genetik materyalde değişiklik oluşabileceği ihtimalinin de gözardı edilmemesi gerektiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, değişik laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar serolojik metodlar ve test materyallerinin standardizasyonunun gerekliliğini gündeme getirmiştir.

Benzer nitelikte ancak kalitatif bulgular sunan bir araştırma da Grieser-Wilke ve ark. (8) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar (8) Amerika'dan (National Animal Disease Centre-NADC) temin edilen NADL veya Oregon suşları ile enfekte edilen hücrelerin Moab C38 ile %80-100 oranında bağlanma reaksiyonu verdiğini, oysa Hannover Veteriner Yüksek Okulu Viroloji Enstitüsü'nde kullanılan NADL ve Oregon suşları ile enfekte edilen hücrelerin aynı Moab'la yaklaşık %50 oranında bağlanma verdiğini bildirmişlerdir. Her iki laboratuvarından temin edilen Singer suşu ise %100 bağlanma vermiştir. Aynı çalışmada (8) paralel bulgular virusların CPE oluşturmasında da gözlenmiştir. NADL (NADC) infeksiyon sonrası 72. saatte kültürdeki bütün hücrelerin parçalanmasına sebep olurken, NADL (Hannover) aynı sürede hücrelerin sadece %30'unda parçalanmaya sebep olmuştur. Araştırmacılar bu durumu, farklı pasaj geçmişlerinin olması ve özellikle (+) polariteli RNA genomlarında yüksek oranda mutasyonların gözlenmesi sebebiyle, Moab C38'in spesifik olduğu epitopta meydana gelen mutasyonel değişikliklere bağlamışlardır.

Bu çalışmada streptoavidin-biotin-peroksidaz tekniği kullanılarak elde edilen Moab reaksiyon kalıplarına göre NADL-Ank.Lab, Moab C16, CT3, CT6, CA1, CA3, CA34, CA39, CA73, CA80 ve CA82 ile 0712/80/Hannover-Ank.Lab ise Moab C16, CT3, CT6, CA3 ve CA34 ile reaksiyon vermiştir. Araştırmada kullanılan Moab'lar arasında C38 mevcut olmadığından Grieser-Wilke ve ark. (8)'nin bulgularıyla bu çalışmada elde edilen bulguları karşılaştırma olanağı bulunmamaktadır. Ancak, aynı Enstitüde yapılmış olan 3 doktora tezinde (12,13,15) elde edilen bulgularla, bu çalışmada elde edilen verilerin karşılaştırılması mümkündür. Adı geçen

Tablo 2. NADL-Ank.Lab ve 0712/80/Hannover-Ank.Lab'a ait Moab reaksiyon sonuçları.

Table 2. Moab reaction patterns of NADL-Ank.Lab and 0712/80/Hannover-Ank.Lab.

Virus	Moab															
	C16	CT2	CT3	CT6	CT9	CA1	CA3	CA25	CA34	CA36	CA39	CA73	CA78	CA80	CA82	
NADL-Ank.Lab	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	
0712/80/Hannover-Ank.Lab	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	

Tablo 3. NADL-Ank.Lab ve 0712/80/Hannover-Ank.Lab'ın Moab reaksiyonlarının Hannover Veteriner Yüksek Okulu Viroloji Enstitüsü'ndeki aynı adlı viruslarla elde edilmiş olan sonuçlarla karşılaştırılması.

Table 3. Comparison of Moab reaction patterns of NADL-Ank.Lab and 0712/80/Hannover-Ank.Lab → results taken from viruses in Virology Institute of Hannover Veterinary High School.

Araştırma	Virus	Moab													
		CT2	CT3	CT6	CT9	CA1	CA3	CA25	CA34	CA36	CA39	CA73	CA78	CA80	CA82
M. Rosell (1988)	NADL-Ames					+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
	NADL-Hann.		Veri			+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
	0712/80 Hann.		Yok			-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Pituco (1995)	0712/80 Hann.					+	+	-	VY	-	+	+	-	-	-
Körke (1989)	NADL-Ames	-	+	+	-										
	NADL-Hann.	-	+	+	-										
	0712/80 Hann.	-	+	+	-										
Bu araştırma	NADL-Ank.Lab	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
	0712/80 Hann-Ank.Lab	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

doktora tezleri ve bu çalışmada elde edilen veriler Tablo 3'te karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Körke (12) NADL-Ames, NADL-Hannover ve 0712/80/Hannover suşlarının Moab CT2 ve CT9 ile reaksiyon vermezken, Moab CT3 ve CT6 ile reakte olduğunu bildirmiştir. Benzer bulgular bu çalışmada kullanılan NADL-Ank.Lab ve 0712/80/Hannover-Ank.Lab virusları ile de elde edilmiştir (Tablo 3).

Mateo-Rosell (13)'in bulgularına göre NADL-Ames ile NADL-Hannover arasında Moab CA36 ve CA78 ile reaksiyon vermelerine göre farklılıklar olabileceği gözlemlenmektedir. Bu çalışmada kullanılan NADL'nin (NADL-Ank.Lab) her iki Moab'la da reaksiyon vermediği tespit edilmiştir. Araştırmacı (13) 0712/80 suşunun CA serisi Moab'lardan sadece CA34 ile reaksiyon verdiğini bildirirken, Pituco (15) bu suşun CA1, CA3, CA39 ve CA73 ile reaksiyon verdiğini saptamıştır. Bu çalışmada test edilen 0712/80 suşunun (0712/80/Hannover-Ank.Lab) CA serisi Moab'lardan sadece Moab CA3 ve CA34 ile reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Tablo 3).

Bu çalışmada elde edilen veriler ve Mateo-Rosell (13)'in bulguları kıyaslanarak NADL-Ank.Lab'ın NADL-Ames ve NADL-Hannover'in her biri ile birer epitopta (CA36 ve CA78) farklılık gösterdiğini söylemek mümkündür. Dolayısıyla, söz konusu viruslar arasında araştırılan epitoplar yönünden çok önemli farklılıklar olmadığı ve özellikle NADL'nin referenz suş olarak serolojik çalışmalarda kullanıldığı göz önüne alındığında, bu çalışmalarda elde edilen verilerin güvenilirliği teyit edilmektedir.

Bu çalışmada 0712/80/Hannover-Ank.Lab ile elde edilen verilerin daha önce yapılan 2 çalışmada (12,13,15) CA grubu Moab'larla elde edilen verilere göre farklı olduğu gözlemlenmektedir. Mateo-Rosell (13) 0712/80/Hannover virusunun sadece Moab CA34 ile, Pituco (15) ise 4 Moab'la (CA1, CA3, CA39 ve CA73) reaksiyon verdiğini bildirmiştir. 0712/80/Hannover-Ank.Lab ise 2 Moab'la (CA3 ve CA34) reaksiyon vermiştir. Bu veriler 0712/80/Hannover-Ank.Lab ve Hannover Veteriner Yük-

sek Okulu Viroloji Enstitüsü'nde bulunan 0712/80/Hannover virusları arasında antijenik farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu farklılıkların sebebi olarak, gerek Cay ve ark. (4) ve gerekse Grieser-Wilke ve ark. (8) tarafından öngörülen farklı pasaj geçmişi ve şartlarının mevcut olması ile birlikte, DNA polimeraz enziminden yoksun olmaları sebebiyle proofreading mekanizması taşımayan RNA viruslarındaki yüksek mutasyon olasılığı (16) düşünülmektedir.

Sonuç olarak, belli bir laboratuvarında özellikle moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda aynı laboratuvarında üretilen virus suşlarının kullanılmasında, sonuçların standardizasyonu ve birbirini takip eden araştırmaların güvenilirliği açısından yarar görülmektedir.

### Kaynaklar

1. Baker JC (1987): *Bovine viral diarrhoea virus: A review*. JAVMA, **190**, 1450-1458.
2. Brownlie J (1991): *The pathways for bovine viral diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease*. Arch Virol, **Suppl 3**, 79-96.
3. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ (1984): *Experimental production of fatal mucosal disease in cattle*. Vet Rec, **114**, 535-536.
4. Cay B, Chappuis G, Coulibaly C, Dinter Z, Edwards S, Grieser-Wilke I, Gunn M, Have P, Hess G, Juntti N, Liess B, Mateo A, McHugh P, Moennig V, Nettleton P, Wenswoort G (1989): *Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: Report of an international workshop*. Vet Microbiol, **20**, 123-129.
5. Frey HR, Liess B (1971): *Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytotoxischen VD-Md Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotitermethode*. Zentbl Vet Med B, **18**, 61-71.
6. Gillespie JH, Baker JA, McEntee K (1960): *A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus*. Cornell Vet, **50**, 73-79.
7. Gillespie JH, Bartholomew PT, Thompson J, McEntee K (1966): *The isolation of noncytopathogenic bovine viral*

- diarrhea virus from four aborted bovine fetuses. *Cornell Vet.* **57**, 564-571.
8. **Grieser-Wilke I, Liess B, Schepers J, Stahl-Hennig C, Moening V** (1991): *Correlation of bovine viral diarrhoea virus induced cytopathic effects with expression of a biotype-specific marker.* *Arch Virol, Suppl* **3**, 55-65.
  9. **Harkness JW, van der Lugt JJ** (1994): *Bovine Viral Diarrhoea and Mucosal Disease.* 642-650. In: JAW Coetzer, GR Thompson, RC Tustin (Eds), *Infectious Disease of Livestock.* Oxford Univ Press, Oxford.
  10. **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.
  11. **Horzinek MC** (1991): *Pestiviruses-taxonomic perspectives.* *Arch Virol, Suppl* **3**, 1-5.
  12. **Körke J** (1989): *Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörper gegen den stamm A1138/69 des virus der Bovinen Virus Diarrhoe.* Inaugural-dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
  13. **Mateo-Rosell AM** (1988): *A topological and functional map of epitopes on the major surface glycoprotein of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV).* Inaugural-dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
  14. **Olafson P, Mc Callum AP and Fox FH** (1946): *An apparently new transmissible disease of cattle.* *Cornell Vet.* **36**, 205-213.
  15. **Pituco EM** (1995): *Untersuchungen über die antigene Diversität von Feld isolaten des Virus der Bovinen Virus diarrhoe (BVD) aus den Jahren 1959 bis 1994 mittels monoklonaler Antikörper.* Inaugural-dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
  16. **Ramig RF** (1990): *Principles of Animal Virus Genetics.* 95-144. In: BN Fields et al. (Eds), *Virology.* 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press Ltd, London.

**Yazışma adresi:**

Doç.Dr. Aykut Özkul  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Viroloji Anabilim Dalı  
Dışkapı, Ankara