

KLİNİK OLARAK SAĞLIKLI SIĞIR SÜRÜLERİNDE PERSİSTE BOVİNE VİRAL DİARRHEA VİRUS ENFEKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI VE EPİZOOTİYOLOJİK ÖNEMİ*

Atilla Şimşek¹

Feridun Öztürk¹

Investigation of Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Clinically Healthy Cattle Herds and Its Epizootiologic Importance

Summary: A total of 142 clinically healthy cattle in five herds were examined serologically and for persistent infection with Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Konya. Leucocyte and blood sera samples were obtained from the animals. BVDV antigens were determined in total of two animals in two herds after examination by immunofluorescence test (IFT) of the 142 leucocyte samples. Second leucocyte samples were obtained from 2 cattle two months after the initial sampling and BVDV antigens were not detected. The 142 first blood sera samples were tested against BVDV by sera neutralisation (SN) test. Antibodies to BVDV were detected in 113 (%79. 5) of 142 samples. Although viremic cattle and high seropositivity were found in two herds, persistent infected (PI) cattle couldn't be detected in this study.

Key words: Bovine Viral Diarrhea virus, Cattle, Persistent infection, Serology.

Özet: Klinik olarak sağlıklı sığırlardan oluşan 5 sürüdeki 6-24 aylık, toplam 142 adet hayvan persiste Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) enfeksiyonu ve BVDV antikorları yönünden incelendi. Hayvanların tümünden hem lökosit hem de kan serumu örnekleri alındı. 142 adet lökosit numunesinin immunofloresan testi (IFT) ile incelenmesi sonucu 2 sürüde yer alan 2 adet sığırdan BVDV antijenleri tespit edildi. İlk örneklemeden 2 ay sonra bu iki sığırdan alınan ikinci lökosit örneklerinde BVDV antijenlerine rastlanmadı. 142 adet kan serumu örneği BVDV antikorları yönünden serum nötralizasyon (SN) testine tabi tutuldu. İlk örneklemede 142 numuneden 113 tanesi (%79. 5) BVDV antikorları yönünden pozitif bulundu. Araştırmada iki sürüde viremik hayvanlar saptanmış ve seropozitiflik oranı oldukça yüksek bulunmuş olmasına rağmen persiste enfekte (PI) hayvan tespit edilememiştir.

Anahtar kelimeler: Bovine viral diarrheavirus, Sığır, Persiste enfeksiyon, Seroloji.

Giriş

Gebe ineklerin BVDV ile enfekte olmalarından sonra meydana gelebilecek sonuç; ineğin immun durumu, fötusun yaşı, enfekte eden virusun biyotipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Underdahl ve ark., 1957; Braun ve ark., 1973; Brownlie ve ark., 1980; Oirschot, 1983; Liess, 1985; Baker, 1987). Persiste enfeksiyonun gelişmesindeki en büyük sebep BVDV'unun sitopatojenik olmayan (ncp) tipi ile fötusun intrauterin enfeksiyonudur. Bu biyotip plasentayı geçebilmekte ve her yaştaki fötusu enfekte edebilmektedir (Casaro ve ark., 1971; Moennig ve ark., 1990).

Yapılan çeşitli araştırmalar (Casaro ve ark., 1971; Braun ve ark., 1973; Done, 1980; Liess ve

ark., 1984) sonucunda sığır fötusunun BVDV'una karşı gebeliğin yaklaşık 90-120. gününde immunolojik olarak yanıt verebilir hale geldiği saptanmıştır. Bu süreden önce fötal hücrelerle karşılaşılan gelen virus, herhangi bir immunolojik cevapla karşılaşmadığı için rahatlıkla çoğalmakta ve ileride fötus immun yanıt verebilme yeteneğine ulaşsa bile organlarına yerleşen bu etkeni yabancı bir materyal olarak tanıyamamaktadır. Neticede bu hayvanlar BVDV'una karşı immuntolerant persiste viremik ve klinik yönden normal ya da zayıf olarak doğmakta, bünyelerine yerleşen virusu sekret ve ekstretleriyle etrafa saçmaktadırlar (Finci, 1972; Braun ve ark., 1973; Coria ve McClurkin, 1978; Barlow ve ark., 1986; Edwards ve ark., 1987; Peters ve ark., 1987; Rae ve ark., 1987; Bak ve ark., 1992).

Geliş Tarihi : 06.08.1997

*Aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

I. S. Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, KONYA.

Persiste enfekte (PI) hayvanların, büyümelerinde gerileme ve neonatal ölüm oranlarında bir artış gözlenmesine rağmen, normal görünümü olup seksüel olgunluğa kadar uzun süre farkedilmeden yaşayabilmeleri, BVDV enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde anahtar role sahip olduklarını ortaya koymaktadır (McClurkin ve ark., 1979; Orban ve ark., 1983; Alenius ve ark., 1986; Barlow ve ark., 1986; Bezek ve Mechor, 1992). Seksüel olgunluğa ulaşmış çiftleşen hayvanlardan doğan yavrular büyük ihtimalle klinik olarak sağlıklı görünmelerine rağmen persiste enfekte olarak doğmaktadırlar (Binkhorst ve ark., 1983; Straver ve ark., 1983). Bu hayvanların da çiftleşmeleri sonucu nesiller boyu sürecek maternal viremik aileler oluşabilmekte ve sürü içinde virusun endemik olarak muhafazası için temel mekanizmalardan biri sağlanmış olmaktadır (McClurkin ve ark., 1979; Straver ve ark., 1983; Radostits ve Littlejohns, 1988).

Türkiye'deki persiste BVDV enfeksiyonlarının araştırılması ile ilgili Alkan (1989), Gelfert (1991) ve Özkul (1992) yaptıkları çalışmalarda çok az sayıda hayvanın persiste enfeksiyona sahip olabileceğini bildirmişlerdir. Fakat araştırmacıların (Alkan, 1989; Gelfert, 1991; Özkul, 1992) persiste enfeksiyondan şüphelendikleri hayvanlardan ikinci örneklemeyi yapamamaları, hayvanların PI olup olmadıklarının kesin olarak kanıtlanamamasına neden olmuştur. Farklı ülkelere ait sürülerde çeşitli araştırmacılar (Bolin ve ark., 1985; Alenius ve ark., 1986; Howard ve ark., 1986; Peters ve ark., 1987; Shimizu ve Satou, 1987; Howard ve ark., 1990; Meyling ve ark., 1990) tarafından yapılan taramalarda PI sığırların insidansının düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çeşitli ruminantlarla kontakt (Carlson, 1991; Depner ve ark., 1991) PI sığırlar (Casaro ve ark., 1971; McClurkin ve ark., 1979; Harkness, 1986), virüsle kontamine sperma (Kahrs ve ark., 1980; Barlow ve ark., 1986; Revell ve ark., 1988; Afshar ve Eaglesome, 1990; McGowan ve ark., 1993), embriyo transferi (Afshar ve Eaglesome, 1990; Howard ve ark., 1990), virüsle enfekte malzemeler (Harkness, 1986; Gunn, 1993), çeşitli sinek türleri (Tarry ve ark., 1991; Gunn, 1993) vasıtasıyla bulaşmanın

meydana gelebilmesi ve gebe hayvanlarda modifiye canlı aşılardan kullanılması (Orban ve ark., 1983; Liess ve ark., 1984) gibi birçok sebepten dolayı BVDV'undan tamamen arındırılmış bir sürüyü uzun süre enfeksiyondan korumak oldukça zor olmaktadır.

Enfeksiyonun en iyi kontrolü, PI hayvanların identifikasyonu ve sürüden eradike edilmesi, bununla beraber transplasental enfeksiyonların önlenmesi ile sağlanabilir (Baker, 1987).

Bazı araştırmacılara (Harkness, 1986; Morvan ve ark., 1991; Bezek ve Mechor, 1992) göre vücut sekresyon ve ekskresyonları ile büyük miktarda virüsü devamlı olarak etrafa saçan ve enfeksiyonu yeni meydana gelen generasyonlara aktaran PI hayvanlar, BVDV enfeksiyonlarının yayılmasında ve sürü içinde enfeksiyonun devamında en önemli rolü üstlenmektedir. Bu durum karşısında BVDV enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonunda ilk adım, PI hayvanların saptanması ve sürüden çıkarılmasıdır.

Bu çalışmada, hayatları boyunca BVDV'ünü taşıyan ve etrafa saçan, buldukları sürü içinde devamlı bir enfeksiyon kaynağı olarak görev yapan, hatta çiftleşme yaşına ulaşabilen ve enfeksiyonu yavrularına taşıyabilen ayrıca Mucosal Disease (MD)'e maruz kalma oranı yüksek olan PI hayvanların prevalansının, virüs izolasyonu ve serolojik testlerin desteğiyle sürü içindeki rollerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Virus: Direkt immunofloresan testi (IFT) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinde sitopatojenik (cp) BVDV'unun referans NADL suşu kullanıldı. Virüsün titrasyonu Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntemle yapıldı.

Hücre Kültürü: Virüs izolasyonu, IF ve SN testlerinde; kullanılmadan önce BVDV kontaminasyonu yönünden direkt IFT ile kontrol edilerek negatif olduğu tespit edilen fetal dana böbrek (FDB) hücre kültürü kullanıldı.

Konjugat: Araştırmada direkt IFT'nde kullanılan

BVDV konjugatı, A. Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

Virus İzolasyon Materyalleri: Virus izolasyonu amacıyla araştırmada kullanılan beş sürüye ait klinik olarak sağlıklı toplam 142 adet sığırın lökosit örnekleri, FDB hücre kültüründe yapılan bir kör pasajı takiben IFT ile BVDV antijeni yönünden kontrol edildi. Test sonucunda pozitif olduğu ortaya çıkan sığırlardan yaklaşık 2 ay sonra ikinci kez alınan lökosit örnekleri BVDV antijeni yönünden tekrar IFT ile kontrol edildi. Bu amaçla EDTA'lı tüplere alınan kan 2000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan lökosit tabakası pastör pipeti ile toplanarak 5 ml. hacminde Phosphat Buffer Solution (PBS) ile yıkandı. Yıkamayı takiben lökositler 3 ml. PBS içinde sulandırıldıktan sonra sterilite kontrolü yapıldı. % 10 dimethyl sulphoxide (DMSO) ilave edilen numuneler kullanılabildiği kadar derin dondurucuda saklandı.

Virus izolasyonu amacıyla hazırlanan lökosit örnekleri, daha önce BVDV yönünden kontrol edilerek negatif olduğu saptanan FDB hücre kültüründe bir kez pasajlandı. Bu amaçla hücre kültürü tüplerine %5 fetal dana serum (FDS) kapsayan Eagle's MEM (EMEM) ve Hank's Laktalbumin (HLA) vasatı içinde 1×10^5 /ml. olacak şekilde sulandırılmış FDB hücrelerinden 2 ml konularak 37 °C de 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda hücre yüzeyleri 37 °C de ısıtılmış PBS ile yıkandıktan sonra her numuneden 0.2 ml hacimde olmak üzere, birer adet tüpe inokule edilip, üzerine EMEM+HLA vasatı eklendikten sonra 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Inkubasyonu takiben içerikleri dökülen tüpler PBS ile yıkandıktan sonra tekrar 2 ml. hacimde idame vasatı ilave edilerek 5-7 gün süreyle 37 °C de tekrar inkubasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler dondurulup çözülerek 3000 devirde santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı, BVDV antijenlerinin tespiti amacıyla IFT'ne tabi tutuldu.

Direkt İmmunofloresan Testi:Bu amaçla Orban ve ark. (1983)'nin bildirdikleri yöntemden yararlanıldı.

Tabanına lamel yerleştirilmiş altı gözlü pleytlere EMEM+HLA vasatı ve %5 FDS içeren 1×10^5 /ml. olacak şekilde hazırlanan BVDV yönünden negatif FDB hücre süspansiyonundan 2 ml. kondu. 37 °C

de 24 saat süren inkubasyonu takiben lökositlerin pasajından sağlanan sıvılardan 0.2 ml. miktarında inokule edildi. 72 saat inkubasyondan sonra 0.1 M NaCl+Tween 20 ile yıkanan hücreler aseton ile 10 dak. fikzasyona bırakıldı. Titresi oranında sulandırılan konjugat 0.2ml oranında lamellerin üzerine damlatıldı ve 37 °C lik nemli ortamda 1 saat süreyle inkube edildi. Yıkanan lameller %20 gliserin yardımıyla lamlara kapatılarak floresan mikroskopta incelendi. Test, hücre kontrol ve virus kontrolleri ile birlikte yürütüldü.

Serum Mikronötralizasyon Testi: Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntemine göre yapıldı. Kontrol edilecek serumlar 1:5 oranında sulandırılarak teste tabi tutuldu. Mikronötralizasyon testi sonunda pozitif bulunan serum örneklerindeki antikor titreleri, yine mikronötralizasyon yöntemi ile tespit edildi.

Bulgular

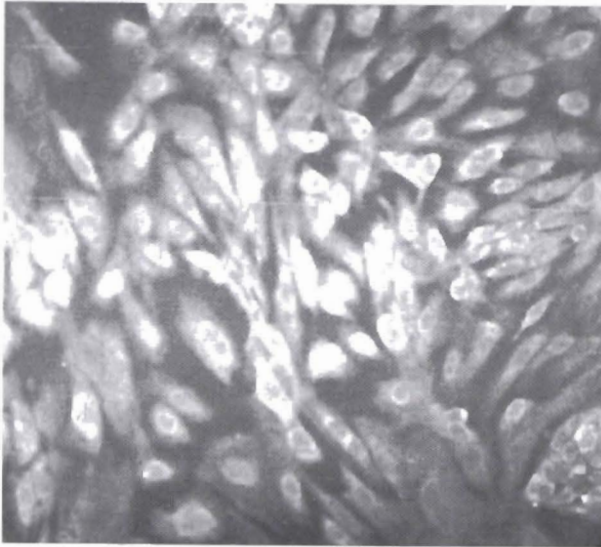
Virusun Titresi:Araştırmada kullanılan BVDV'unun NADL suşunun FDB hücre kültüründe mikrotitrasyon testi sonunda titresi $DKID_{50}=10^{5.5}/0.1$ ml. olarak tespit edildi.

Konjugat Titresi: FDB hücre kültüründe ve 1000 $DKID_{50}/0.1$ ml oranında sulandırılmış NADL suşu ile yapılan IFT sonucunda konjugat titresi 1:30 olarak saptandı.

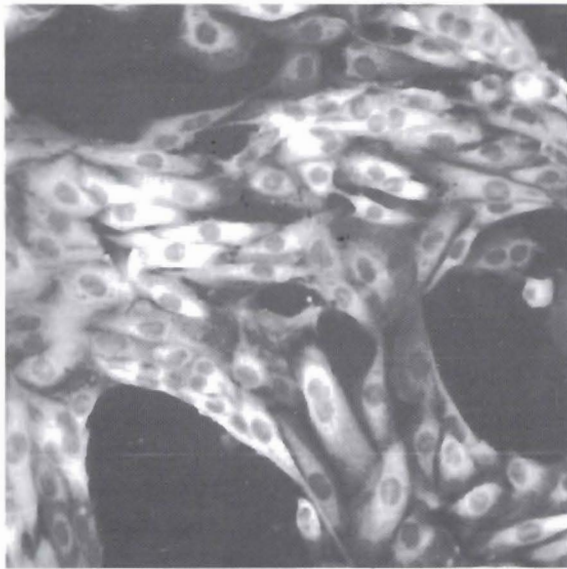
Direkt İmmunofloresan Testi Sonuçları: Birinci örneklemede IFT'ne tabi tutulan 142 adet hayvandan; bir tanesi III. sürüye, diğeri IV. sürüye ait toplam iki hayvanda BVDV antijeni tespit edildi (Resim 1, 2). BVDV antijeni yönünden pozitif bulunan 2 hayvanın akut bir enfeksiyon mu geçirdikleri yoksa persiste bir enfeksiyona mı sahip olduklarını ayırt etmek maksadıyla ilk örneklemeden yaklaşık 2 ay sonra alınan lökosit numunelerinin ikinci kez IFT'ne tabi tutulmaları sonucu her iki hayvanda da BVDV antijeni tespit edilemedi (Tablo 1). İkinci örneklemede BVDV antijeni tespit edilemeyen bu hayvanların birinci örnekleme esnasında akut subklinik bir enfeksiyon geçirmekte oldukları düşünüldü.

İlk örnekleme esnasında IFT ile BVDV antijeni yönünden pozitif bulunan 2 hayvana ait izolatın,

FDB hücre kültüründe 5 kör pasajı neticesinde ncp karakterde olduğu kanısına varıldı.



Şekil 1. FDB hücre kültürü kontrol (IF mikroskopta).



Şekil 2. III. sürüde akut enfekte hayvana ait lökosit numunesi inokule edilmiş FDB hücre kültüründe immunofloresan.

Mikronötralizasyon Testi Sonuçları: Araştırmada 142 adet sığırdan alınan kan serumunun 113 adedi (%79. 5) 1:5 sulandırmada BVDV antikorları yönünden pozitif bulundu. 2 ay sonra ikinci kez alınan kan serumlarında III. sürüye ait hayvanda BVDV'na karşı 1:56. 3. IV. sürüye ait hayvanda ise 1:112 oranında spesifik antikorlar saptanmıştır.

Tablo 1. IFT ile BVDV antijeni yönünden kontrol edilen sığır adedi ve PI yüzdeleri.

Sürü No	Hayvan Sayısı	I. Test	II. Test	PI (%)
I	28	0	-	-
II	22	0	-	-
III	24	1	0	0
IV	38	1	0	0
V	30	0	-	-
Toplam	142	2	0	0

Tartışma ve Sonuç

BVDV ile PI hayvanlar, özellikle homolog virusa karşı immuntolerant olup, etkeni yaşam boyu taşımaları ve tüm vücut salgılarıyla etrafa saçmaları (Braun ve ark., 1973; Bolin ve ark., 1985; Barlow ve ark., 1986; Edwards ve ark., 1987; Shimizu ve Satou, 1987; Qvist ve ark., 1991; Bak ve ark., 1992; Bezek ve Mechor, 1992) nedeniyle BVDV'unun en önemli kaynağı olarak rol oynamaktadır. Aynı zamanda cp BVDV ile süperenfeksiyon sonucu meydana gelebilecek olan MD'e karşı hassas olmaları (Bolin ve ark., 1985; Liess, 1985; Littlejohns ve Walker, 1985; Brownlie ve ark., 1987; Horzinek, 1990; Moennig ve ark., 1990), PI hayvanları bu enfeksiyon açısından da önemli kılmaktadır.

Ülkemizde Alkan (1989), Gelfert (1991) ve Özkul (1992) tarafından yapılan araştırmalarda birkaç hayvanın persiste enfeksiyona sahip olabileceğinden şüphelenilmekle beraber çeşitli sebeplerden ikinci kez örnek alınamaması, bu hayvanların gerçekten persiste enfekte oldukları düşüncesini ihtimalden öteye götürmemiştir.

Bu araştırma, sınırlı sürü ve hayvan sayısına rağmen PI hayvanların varlığının ve bu hayvanların sürü içerisindeki rollerinin araştırılmasına yönelik bir çalışma olarak amaçlanmıştır. Araştırma, test edilen sürü ve hayvan adedi az olmakla beraber Konya Bölgesindeki BVDV enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi hakkında da bir bilgi vermektedir.

Lökositlerden her zaman virusun tespit edilebildiği PI'ların aksine, akut enfeksiyonları takiben sadece ortalama 4-7. günlerde lökositlerden virus

izole edilebilmekte ayrıca akut enfeksiyona sahip hayvanlar immün cevap verebilme yeteneğinde olduklarından serumlarındaki antikor seviyelerinde 2. haftadan itibaren başlayan ve 10-12. hafta civarında maksimuma ulaşan bir yükselme gözlenmektedir (Brownlie ve ark, 1987). Bu nedenle araştırmada BVDV antijeni yönünden pozitif, serolojik yönden negatif olduğu tespit edilen 2 sığırdan ilk örnekleme tarihinden yaklaşık 2 ay sonra ikinci kez alınan lökosit ve serum numuneleri tekrar teste tabi tutulmuştur. Test sonucunda bu iki hayvanda BVDV antijeni saptanamamış ve kan serumlarında nötralizan antikorların tespit edilmiş olması sonucu bu hayvanların ilk örnekleme tarihinde akut subklinik bir enfeksiyona sahip olduğu kanısına varılmıştır. Böylece araştırmada kullanılan 142 hayvan arasında PI hayvan tespit edilememiştir.

Araştırmada, sığırlardan elde edilen lökosit numunelerinin BVDV antijeni yönünden IFT'ne tabi tutulmadan önce FDB hücre kültürlerinde sadece bir tek pasajı yapılmıştır. Alkan (1989) ncp BVDV izole ettiği 3 materyalin tümünün birinci pasajdan sonra IF testinde pozitif sonuç verdiğini, Meyling (1984) BVDV yönünden pozitif olarak tespit ettiği 462 numuneden 455'inin (% 91) birinci pasajda pozitif olarak belirlendiğini, Özkul (1992) IFT ile antijen tespit ettiği 12 numuneden 11 tanesinin birinci pasajda, kalan bir tanesinin ise ikinci pasajda pozitif olarak saptandığını bildirmişlerdir.

Beş sürüye ait 142 hayvanın serolojik durumlarının saptanması amacıyla yapılan SN testi sonuçlarına göre ilk örneklemede 113 hayvanın (% 79. 5) seropozitif olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçların Erhan ve ark. (1971)'nin %70'lik, Bolin ve ark. (1985)'nin % 89'luk, Meyling ve ark. (1990)'ünün % 64'lük, Gelfert (1991)'in % 60'lık, Özkul (1992)'un tespit ettiği % 80'lik oranlara yakınlık gösterdiği saptanmıştır.

Seropozitiflik oranının III no'lu sürüde %91. 6, IV no'lu sürüde %97. 3 gibi yüksek oranda olması ve bu sürülerde akut enfekte hayvanlara rastlanması ölüm ya da satış nedeniyle sürüden ayrılan hayvanların arasında persiste enfekte hayvan olabileceği düşüncesini akla getirmiş olsa da ülkemiz şartlarında enfeksiyonun bulaşmasında bir çok fak-

tör rol aldığından dolayı enfeksiyonun kaynağı kesin olarak tespit edilememiştir. Bu araştırmada olduğu gibi bir çok araştırmada karşılaşılan, test tarihinden önce ölüm, satış gibi çeşitli sebeplerden dolayı sürülerden hayvanların ayrılması yine test edilecek hayvanların ikinci örnekleme tarihindeki yapılmasındaki değişik zorluklar nedeniyle PI hayvanları bir an önce tespit etmek amacıyla pratik bir yöntem olmasa da yeni doğan buzağılardan prekoloztral kan örneklerinin alınmasının ve lökositlerinde BVDV antijeni tespit edilen buzağıların PI yönünden şüpheli sayılıp sürüden hemen ayırt edilmelennin en etkili yol olacağı düşünülebilir.

Sonuç olarak, ülkemizde BVDV enfeksiyonlarının önlenmesi amacıyla, tüm yurt genelindeki daha büyük hayvan populasyonlarının, BVDV'unun yayılmasında primer rol oynadığı sanılan persiste enfeksiyon yönünden sistemik olarak test edilmeleri ve bu işlemde çabukluk sağlamak amacıyla ucuz ve az zaman alan yöntemlerin kullanılması önerilebilir. Persiste enfeksiyona sahip olduğu saptanan sığırların izole edilip hemen kesime gönderilmeleri ile, serolojik araştırmalar neticesinde oldukça yüksek yayılıma sahip olduğu saptanan BVDV enfeksiyonlarının önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, sığır sürüleri içinde oldukça düşük oranda tespit edilebilen PI hayvanları, enfeksiyonun epizootiyolojisindeki rollerini üstlenmeden, mümkün olduğu kadar küçük yaşta yakalayabilmek için önlemler geliştirilmelidir.

Kaynaklar

- Afshar, A. and Eaglesome, M. D. (1990): Viruses associated with bovine semen. *Vet. Bull.*, 60, 2, 93-109.
- Alenius, S., Jacobsson, S. O. and Cafaro, E. (1986): Frequency of bovine viral diarrhoea virus infections in Sweden among heifers selected for artificial insemination. In "Proc. 14 th World Cong. Dis. of Cattle", 204-207, Dublin.
- Alkan, F. (1989): Arthrogrippythphosa ve hydra-nencephaly'li buzağı doğumlarında bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD)'in insidensi üzerinde araştırmalar. A. Ü. Sağ. Bil. Enst., Doklora tezi, Ankara.
- Bak, A., Callesen, H., Meyling, A. and Greve, T. (1992): Calves born after embryo transfer from donors persistently infected with BVD virus. *Vet. Rec.*, 131, 37.

- Baker, J. (1987): Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J. A. V. M. A.*, 190, 1449-1458.
- Barlow, R. M., Nettleton, P. F., Gardiner, A. C., Greig, A., Campbell, J. R. and Bonn, J. M. (1986): Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *Vet. Rec.*, 118, 321-324.
- Bezdek, D. M. and Mechor, G. D. (1992): Identification and eradication of bovine viral diarrhoea virus in a persistently infected dairy herd. *J. A. V. M. A.*, 201, 4, 580-586.
- Binkhorst, G. J., Journee, D. L. H., Wouda, W., Straver, P. J. and Vos, J. H. (1983): Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Quart.*, 5, 4, 145-155.
- Bolin, S. R., McClurkin, A. W. and Coria, M. F. (1985): Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 11, 2385-2387.
- Bolin, S. R., McClurkin, A. W., Cutlip, R. C. and Coria, M. F. (1985): Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 3, 573-576.
- Braun, R. K., Osburn, B. I. and Kendrick, J. V. (1973): Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 34, 9, 1127-1132.
- Brownlie, J., Clarke, M. C. and Howard, C. J. (1987): Clinical and experimental mucosal disease-defining a hypothesis for pathogenesis. In "Pestivirus infections of ruminants" Ed. J. W. Harkness, 147-157, CEC, Luxemburg.
- Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, C. J. and Pocock, D. H. (1987): Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Am. Rech. Vet.*, 18, 157-166.
- Brownlie, J., Nuttall, P. A., Stott, E. J., Taylor, G. and Thomas, L. H. (1980): Experimental infection of calves with two strains of bovine virus diarrhoea virus: certain immunological reactions. *Vet. Immun. Immunopath.*, 1, 371-378.
- Carlson, U. (1991): Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 128, 145-147.
- Casaro, A. D. E., Kendrick, J. W. and Kennedy, P. C. (1971): Response of the bovine fetus to BVD-MD virus. *Am. J. Vet. Res.*, 32, 10, 1543-1562.
- Coria, M. F. and McClurkin, A. W. (1978): Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172, 449-451.
- Depner, K., Hübschle, O. J. B. and Liess, B. (1991): BVD-virus infection in goats-experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. *Arch. Virol.*, 3, 253-256.
- Done, J. T., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J. W., Sands, J. J., Patterson, D. S. P., Sweasey, D., Shaw, I. G., Winkler, C. E. and Duffel, S. J. (1980): Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Rec.*, 106, 473-479.
- Edwards, S., Drew, T. W. and Bushnell, S. E. (1987): Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viremia. *Vet. Rec.*, 120, 3, 71.
- Erhan, M., Onar, B., Csantos, L. and Hopkins, I. G. (1971): Serological survey on some virus and babesia disease of cattle, sheep and horse. *J. Vet. Cent. Res. Inst. (Pendik)*, 4, 2, 56-58.
- Finci, E. (1972): Türkiye'de mucosal disease (Virusi Diyare) üzerinde araştırmalar. *A. Ü. Vet. Fak., Doç. Tezi*, Ankara.
- Frey, H. R. und Liess, B. (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark zytopathogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. *Zbl. Vet. Med. B*, 18, 61-71.
- Gelfert, C. C. (1991): Epidemiological investigation of the distribution of BVD virus among cattle in Turkey. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Gunn, H. M. (1993): Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 132, 584-585.
- Horzinek, M. C. (1990): Bovine virus diarrhoea virus : an introduction. *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 1, 13-23.
- Howard, T. H., Bean, B., Hillman, R and Manke, D. R. (1990): Surveillance for persistent bovine viral diarrhoea virus infection in four artificial insemination centers. *J. A. V. M. A.*, 196, 12, 1951-1955.
- Howard, C. J., Brownlie, J. and Thomas, L. H. (1986): Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viremia in

- cattle in the UK. *Vet. Rec.*, 119, 628-629.
- Kahrs, R. F., Gibbs, E. P. J. and Larsen, R. E. (1980): The search for viruses in bovine semen. *Theriogenology*, 14, 151-165.
- Liess, B. (1985): The significance of immune tolerance for the pathogenesis of bovine viral diarrhoea (BVD). *Berl. Münch. tierärztli. Wschr.*, 98, 420-423.
- Liess, B., Orban, S., Frey, H. R., Trautwein, G., Wiefel, W. and Blindow, H. (1984): Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows. *Zbl. Vet. Med. B*, 31, 669-681.
- Littlejohns, E. R., and Walker, K. H. (1985): Aetiology and pathogenesis of mucosal disease of cattle: current concepts, observation and speculation. *Aust. Vet. J.*, 62, 101-103.
- McClurkin, A. W., Coria, M. F. and Cutlip, R. C. (1979): Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. A. V. M. A.*, 174, 10, 1116-1119.
- McGowan, M. R., Kirkland, P. D., Richards, S. G. and Littlejohns, I. R. (1993): Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet. Rec.*, 133, 39-43.
- Meyling, A. (1984): Detection of BVD virus in viremic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. Recent Advances in virus diagnosis. CEC seminar, Belfast, Sept. 22-23, 37-46.
- Meyling, A., Houe, H. and Jensen, A. M. (1990): Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 1, 75-93.
- Moennig, V., Frey, H. R., Liebler, E., Pohlenz, J. and Liess, B. (1990): Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet. Rec.*, 127, 200-203.
- Morvan, H., Leforban, Y., L'Hostis, B., Caquineau, L., Lecoane, J. et Douart, A. (1991): Comparaison de cinq tests serologiques pour la detection des anticorps anti-maladie des muqueuses dans les serums bovins. *Rec. Med. Vet.*, 167, 6, 501-505.
- Oirschot, J. T. V. (1983): Congenital infections with nonarbo Togaviruses. *Vet. Microbiol.*, 8, 321-361.
- Orban, S., Liess, B., Hafez, S. M., Frey, H. R., Blindow, H. and Patzer, B. S. (1983): Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. *Zbl. Vet. Med. B*, 30, 619-634.
- Özkul, A. (1992): Gebe ineklerde ve fütüslerinde bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD). A. Ü. Sağ. Bil. Enst., Doktora tezi, Ankara.
- Peters, W., Liess, B., Frey, H. R. and Trautwein, G. (1987): Incidence and impact of persistent infections with BVD virus in the field. In "Pestivirus infections of ruminants". Ed. J. W. Harkness, 133-144, CEC, Luxembourg.
- Qvist, P., Houe, H., Aasted, B. and Meyling, A. (1991): Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 3, 660-661.
- Radostits, O. M. and Littlejohns, I. R. (1988): New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can. Vet. J.*, 29, 513-528.
- Rae, A. G., Sinclair, J. A. and Nettleton, P. F. (1987): Survival of bovine viral diarrhoea virus in blood from persistently infected cattle. *Vet. Rec.*, 120, 504.
- Revell, S. G., Chasey, D., Drew, T. W. and Edwards, S. (1988): Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 123, 122-125.
- Roeder, R. L. and Harkness, J. V. (1986): BVD virus infection: prospects for control. *Vet. Rec.*, 118, 143-147.
- Shimizu, M. and Satou, K. (1987): Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in epidemic areas. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49, 6, 1045-1051.
- Straver, P. J., Journee, D. L. H. and Binkhorst, G. J. (1983): Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus II. *Virology and epidemiology*. *Vet. Quart.*, 5, 4, 156-164.
- Tarry, D. W., Bernal, L. and Edward, S. S. (1991): Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet. Rec.*, 128, 82-84.
- Underdahl, N. R., Grace, O. D. and Hoerlein A. B. (1957): Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from BMD. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94, 795-797.