

GEBE SIĞIRLARDA VE BUNLARIN BUZAĞILARINDA PERSİSTE BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) ENFEKSİYONUNUN İMMUNFLORESANS VE İMMUNPEROKSİDAZ TESTLERİ İLE ARAŞTIRILMASI*

Orhan Yapkiç^{@1} Sibel Yavru¹

Investigation of Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection at the Pregnant Cows and Their Calves by Immunofluorescence and Immunoperoxidase Tests

Özet: Araştırmada, özel bir işletmede bulunan 62 adet gebe inek doğumdan önce, doğumları sırasında hem inek hem de prekolozal buzağılardan ve doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde buzağılardan virus izolasyonu amacıyla EDTA'lı tüplere, serolojik amaçla normal tüplere kan örnekleri alındı. Lökosit numunelerinden virus izolasyonu amacıyla direkt immunfloresans (DIF) ve direkt immunperoksidaz (DPLA) testleri kullanıldı. BVDV'una karşı oluşan antikorların tespit edilmesi amacıyla serum nötralizasyon (SN) testi kullanıldı. Gebe ineklerin ve buzağuların tümü birinci ve ikinci örneklemelerde BVDV antijenleri yönünden negatif olarak tespit edildi. BVDV'una karşı oluşan antikorları tespit etmek için uygulanan: SN testi sonucunda gebe ineklerin tümü birinci ve ikinci örneklemelerde pozitif bulunurken, prekolozal buzağılardan 7 adedi pozitif, 55 adedi negatif, buzağuların doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde gerçekleştirilen ikinci örneklemede ise tümü pozitif olarak tespit edildi. Doğumdan önce örneklenen gebe annelerin SN₅₀ titreleri 1/7,5 - 1/160 arasında, doğum sırasında örneklenen annelerin SN₅₀ titreleri 1/7,5 - 1/160 arasında tespit edildi. Doğumu takiben örneklenen ve seropozitif bulunan 7 adet prekolozal buzağının SN₅₀ titreleri 1/20 - 1/120 arasında, doğumdan sonra ilk 3 ay içinde örneklenen buzağuların SN₅₀ titreleri 1/5 - 1/160 arasında tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: BVDV, pregnant cattle, persistent infection, calves, DIF, DPLA, SN

Summary: Blood samples which were collected with and without EDTA were taken from 62 prenatal pregnant cows, from both cows and precolostral calves at the time of birth and, after approximately 3 months, from postnatal calves which were all present in a private management in this research. Direct immunofluorescence (DIF) and direct immunoperoxidase (DPLA) tests were used for virus isolation from leucocyte samples, serum neutralisation test was used to detect antibodies against BVDV. Viral antigen wasn't detected in BVDV from first and second blood samples obtained both all pregnant cows and all calves. By SN testing which was used to detect antibodies against BVDV, while all the pregnant cows were found to be positive after both sampling, 7 precolostral calves were positive and 55 precolostral calves were negative all the calves, from which the second sampling was carried out approximately during 3 months after birth, were detected as positive. SN₅₀ titers of the pregnant cows from which sera samples were collected before birth were noted between 1/7,5 and 1/160≤. However, SN₅₀ titers of sera taken from cows just after giving birth were detected between 1/7,5 and 1/160≤. The sera samples obtained from 7 precolostral - seropositive calves immediately following birth, SN₅₀ titers were found to be between 1/20 and 1/120. The samples taken from calves within 3 months after birth SN₅₀ titers were detected between 1/5 and 1/160.

Key Words: BVDV, pregnant cattle, persistent infection, calves, DIF, DPLA, SN

Giriş

Bovine Viral Diarrhea Mucosal Disease (BVD-MD) tüm dünyada sığırlar arasında yaygın bir enfeksiyondür. Sığır yetiştiriciliğinde oluşturduğu ekonomik kayıplarla önemini ve güncelliğini korumaktadır (Radostits ve Littlejohns 1988).

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)'undan etkilenen gebe ineklerin fütüslerinde abort (Thur ve ark. 1997) ve fütal ölümler (Brownlie ve ark.1998) oluşabileceği gibi fütal bozukluklarda şe-

killenebilmektedir. Fütal gelişim bozuklukları arasında konjenital anomaliler (Casaro ve ark. 1971), fütal ölüm, mumifikasyon (Weiss ve ark.1994) ve persiste enfekte (PI) buzağı doğumu (Brusckhe ve ark.1998) sayılabilir.

Seronegatif gebe anneler gebelikleri boyunca BVDV'unu transplasental olarak fütüslerine aktarabilmektedir. Anne karnında enfekte olan fütüs, yaşına bağlı olarak, ya immun sistemi virusa karşı uyararak antikor oluşturabilmekte ya da immun sis-

Geliş Tarihi : 24.01.2000 @ : oyapkiç@hotmail.com

* Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir (Proje No : SABE - 96/049).

1. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, KONYA

temi virusa karşı antikor oluşturamadığından virusu yabancı olarak tanımamaktadır. Bunun sonucunda virüs enfekte olarak doğan buzağular hayatları boyunca çevreye virus saçmakta ve enfeksiyon kaynağı olarak kabul edilmektedirler (Thur ve ark.1997).

Fötüs, gebeliğin 120. gününden sonra BVDV'u tarafından enfekte edilmiş ise immun sistemi yanıt oluşturma yeteneğine sahip olduğundan virusa karşı antikor şekillendirebilmekte ve seropozitif olarak doğmaktadır (Casaro ve ark. 1971).

Seronegatif ineklerin gebeliklerinin erken dönemlerinde BVDV'undan etkilenmeleri sonucunda persiste enfekte doğan buzağuların BVDV'u ile tekrar enfekte olmalarıyla öldürücü Mukozal Disease (MD) şekillenebilmektedir (Liebler -Tenorio ve ark.1997).

Bu çalışmada, özel bir işletmede bulunan gebe ineklerin BVDV'u ile olabilecek doğal bir enfeksiyonu sonucu, fütusta gelişebilecek fütal lezyonlarla birlikte gebe ineklerin doğum öncesi ve doğum anında, prekolozal buzağuların ve koloztrum almış buzağuların virusa karşı antikor varlığı ve virus yönünden araştırılmalarının yanında uygulanan testlerle persiste enfeksiyonları belirlemek ve varsa böyle hayvanların sürüden uzaklaştırılmasını tavsiye etmek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Direkt immunfloresans (DIF) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinde BVDV'unun sitopatojen (cp) NADL suşu, Direkt immunoperoxidase (DPLA) testinde ise BVDV'unun nonsitopatojenik (ncp) olan 0712 suşu kullanıldı.

Araştırmada Fötal Dana Böbrek (FDB) hücre kültürü kullanıldı. FDB hücreleri Ankara Çubuk mez-bahasında kesilen gebe ineklerden alınan fütuslardan hazırlandı. DIF, DPLA ve SN testlerinde kullanılan FDB hücrelerinin BVDV kontaminasyonu yönünden negatiflikleri kullanılmadan önce DPLA testiyle kontrol edildi.

Araştırmada DIF ve DPLA testinde kullanılan BVDV konjugatı AÜ Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından temin edildi.

Virus izolasyonu amacıyla çalışmada 62 adet gebe inekten, bu ineklerin doğumu sırasında koloztrum almamış buzağulardan ve annelerinden, son olarak doğumu takiben ortalama 3 ay içinde buzağulardan olmak üzere 124 adet hayvandan elde edilen toplam 248 adet kan örneği ethylenediamine tetraaceticacide (EDTA)'li tüplere alınarak lökositleri elde edildi.

Virus izolasyonu amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerine paralel olarak, serum elde etmek amacıyla normal tüplere kan örnekleri alındı. Normal tüplere alınan kan örnekleri 1500-2000 devirde 15-20 dk santrifüj edildi. Serumlar elde edildi. Bu serumlar kullanılmaya kadar -25°C'lik dipfrizde saklandı. BVDV antikorları yönünden SN testine tabi tutulacak olan bu serumlar kullanılmadan önce 56 °C'lik su banyosunda 30 dk inaktivasyon işlemine tabi tutuldu.

BVDV'unun cp biotipi olan NADL suşunun titresi Frey ve Liess (1971) 'in bildirdiği yöntemle, ncp biotipi olan 0712 suşunun titresini ise Orban ve ark (1983) 'nın bildirdiği yöntemle göre yapıldı.

Lökosit elde etmek amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan 2000 devirde 10-15dk santrifüj edildi. Santrifüj süresi sonunda en alt kısımda yer alan eritrositler ve en üst kısımda yer alan plazma tabakasının ortasında beyaz bulutlanma tarzında Buffy Coat adı verilen lökosit tabakası pastör pipetiyle çekildi. 3 kez phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. Son yıkamayı takiben lökositler 2 ml Earle's Lactalbumin (ELA)+Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) + %10 Dimethylsulphoxide (DMSO) ilavesi ile virus saklama tüplerine aktarıldı ve kullanılmaya kadar -80°C'lik dipfrizde saklandı.

Konjugat titrelerinin hesaplanması amacıyla Hyera ve ark. (1987)'in bildirdiği yöntem kullanıldı.

Direkt immunfloresans (DIF) testi, Orban ve ark. (1983)'nin bildirdiği yöntemle göre uygulandı. Cell Culture Staining Chamber (CCSC) sistemi hazırlandı ve ultraviyole de 2 saat tutularak son sterilizasyonu gerçekleştirildi. BVDV yönünden negatifliği DPLA testiyle belirlenmiş ve ELA+EMEM + %5 FDS ile 1×10^5 hücre/ml olarak sulandırılan FDB hücrelerinden lameller üzerine 2'şer ml konuldu. 48 saat 37°C'lik etüvde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra lökosit numunelerinin 1. pasaj sıvılarından her göze 0.2 ml inokule edildi. 1 saat adsorbsiyon süresinden sonra hücre yüzeyleri PBS ile yıkılarak tüm gözlere 2 ml virus üretme vasatı ilave edildi. 3. günün sonunda vasatlar pastör pipeti ile çekilerek hücre yüzeyleri NaCl + Tween-20 ile yıkandıktan sonra hücreler aseton ile 10 dk fikzasyona bırakıldı. Titresi oranında (1/30) sulandırılmış konjugattan tüm gözlere 0.2 ml ilave edildi. 1 saat inkubasyona bırakıldı. Inkubasyon süresi sonunda pastör pipeti yardımıyla konjugat çekilerek hücre yüzeyleri 3 kez NaCl+Tween-20 ile yıkandı. Lökosit üzerine damlatılan %20'lik gliserin damlaları üzerine CCSC sistem lamelleri pens yardımıyla ters çevrilerek kapatıldı. Sonuçlar immunfloresan (IF) mikroskopunda belirlendi. Aynı

zamanda hücre kontrol ve virus kontrol için de gözler hazırlandı ve incelendi.

Direkt immunperoksidaz (DPLA) testi, Hyera ve ark. (1987)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı. Bu amaçla 24 gözlü pleytler kullanıldı. BVDV'ü yönünden negatifliği kontrol edilmiş FDB hücreleri 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ELA+EMEM + %5 FDS ile sulandırılarak tüm gözlere 1 ml miktarında taksim edildi ve 37°C 'lik etüvde inkubasyona bırakıldı. Ertesi gün lökosit 1. pasaj sıvılarından her göze 0.2'şer ml miktarında inokule edildi. 3 gün CO_2 'li etüvde inkubasyona bırakıldı.

Süre sonunda tüm gözlerdeki vasatlar boşaltılarak hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı. Yıkama işlemini takiben pleytler ters olarak kurutma kağıdı üzerine alınarak 80°C 'de 1 saat süreyle bekletildi. Hücrelerin pleyt yüzeyine fizkasyonu sağlandı. Fizkasyon işlemini takiben pleytler soğumaya bırakıldı. Konjugat ilavesi yapılmadan önce hücre yüzeyleri PBS + Tween 20 ile hafifçe ıslatıldı. Konjugat titresi oranında (1/30) PBS + Tween 20 ile sulandırılarak tüm gözlere 0.2 ml olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra shaker'a alınarak 1 saat süreyle konjugatın hücreye adsorbsiyonu için bekletildi. Bu sürenin sonunda konjugat gözlerden uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyleri 3 kez PBS+Tween 20 ile yıkandıktan sonra her göze 0.2 ml substrat ilavesi yapıldı. Substrat olarak 4.7 ml Na asetat + 0.3 ml Aminoetil Karbazol - Dimetil formarniol + 2 damla H_2O_2 karışımı kullanıldı. 20-25 dk sonra doku kültürü mikroskopunda pozitif olarak kabul edilen kahverengimsi-kırmızı boyanmaların olup olmadığı kontrol edildi.

Serum nötralizasyon (SN) testi, Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntemle yapıldı. 5.günde hücrelerde meydana gelen sitopatolojik değişiklikler doku kültürü mikroskopunda incelenerek sonuçlar değerlendirildi.

Mikronötralizasyon testinde, pozitif olarak tespit edilen serumlar Serum Nötralizasyon₅₀ (SN₅₀) testine tabi tutularak sonuçlar Kaerber (1964) metoduna göre hesaplandı.

Bulgular

BVD-MD virusunun cp NADL suşunun FDB hücre kültürlerine inokulasyonu sonucu 1. günde ve 3.günün sonunda hücrelerde tipik CPE oluşturduğu gözlemlendi.

BVD-MD virusunun ncp suşu olan 0712 de

FDB hücre kültürüne inokule edildi. 5 günlük bir inkubasyon süresi sonucu virus elde edildi.

BVDV'unun NADL suşunun FDB hücre kültüründe mikrotitrasyon yöntemiyle yapılan titrasyonunda enfeksiyözite gücü Doku Kültürü Enfeksiyöz Doz 50 (DKID₅₀) = $10^{-7,5/0,1}$ ml olarak hesaplandı. 0712 suşunun enfeksiyözite gücü DIF testi ile DKID₅₀ = $10^{-4,5/0,1}$ ml olarak tespit edildi.

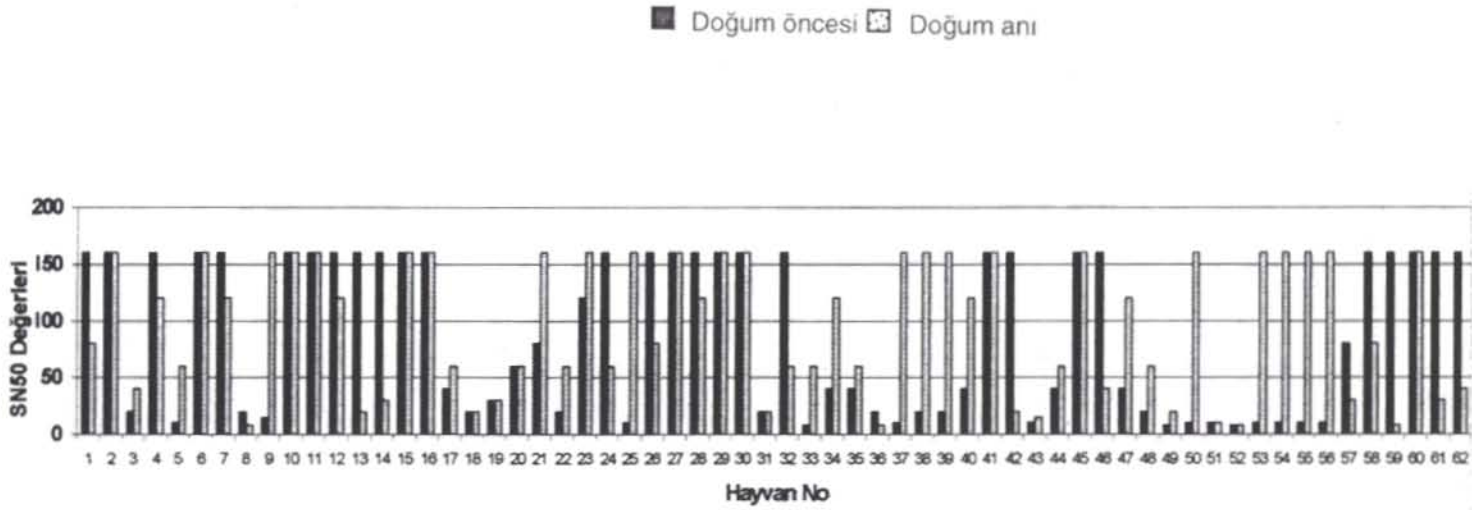
Flourescein Isothiocyanate (FITC) konjugatın titresini 1000 DKID₅₀/0,1 ml oranında sulandırılmış 0712 suşu ile yapılan DIF testi sonucunda 1/30 olarak tespit edildi. Peroksidaz konjugatın titresini 1000 DKID₅₀ /0,1 ml oranında sulandırılmış 0712 suşu ile yapılan DPLA testi sonucunda 1/30 olarak tespit edildi.

Orban ve ark. (1983)'nin bildirdiği metoda göre CCSC sisteminde gerçekleştirilen DIF testinde virus kontrol pozitif ve hücre kontrol negatif olmasına rağmen, işlenen toplam 248 adet lökosit numunelerinde viral antijen yönünden pozitif sonuç elde edilemedi.

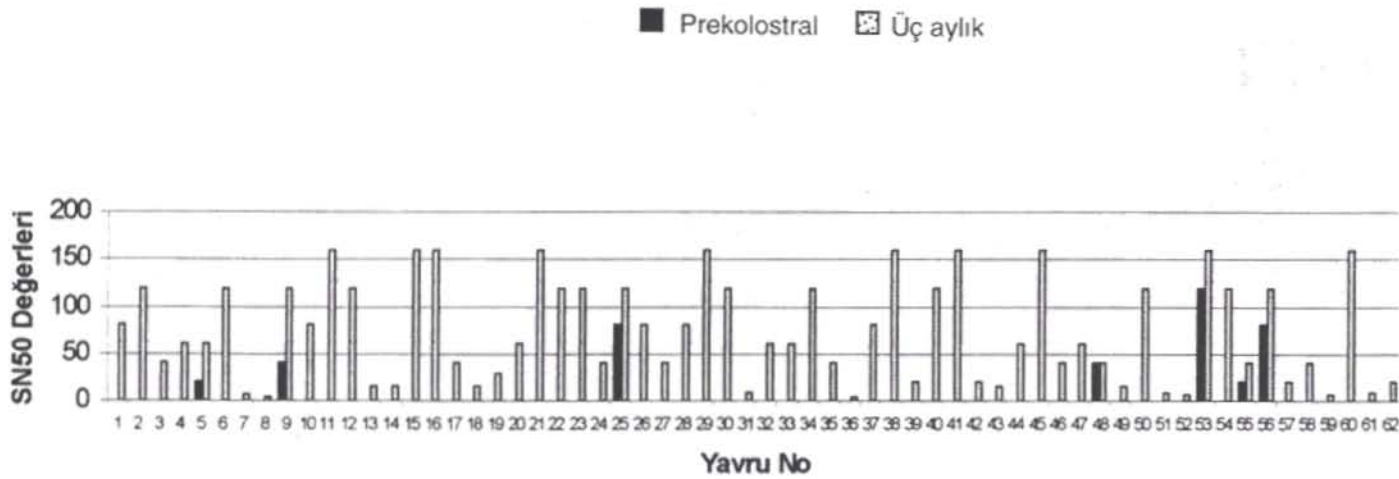
Hyera ve ark. (1987), bildirdiği yöntemle yapılan DPLA testinde toplam 248 adet lökosit numunesinin FDB hücre kültürlerinde yapılan pasajları sonucu elde edilen 1. pasaj sıvıları 24 gözlü pleytlerde BVDV antijenleri yönünden kontrol edildi. Virus kontrolün pozitif ve hücre kontrolün de negatif olmasına karşın, incelenen lökosit numunelerinde viral antijen yönünden pozitif bir sonuç elde edilemedi.

Gebe hayvanlardan alınan serum numunelerinin hepsi nötralizasyon testi ile BVDV'una karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif olarak tespit edildi. Doğumu takiben prekoloztral buzağılardan alınan kan serumlarından 7 tanesi pozitif, 55 tanesi negatif olarak belirlendi. Doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde örneklenen buzağların kan serumlarının hepsi pozitif olarak tespit edildi (Tablo 1).

Pozitif olarak tespit edilen hayvanların serumları SN₅₀ testine tabi tutuldu. Çalışmada pozitif serumların SN₅₀ değerlerinin doğumdan önce örneklenen gebe hayvanlarda 1/7,5 - 1/160 arasında, doğum sırasında tekrar örneklenen annelerde 1/7,5 - 1/160 arasında, doğum sırasında kolostrum almadan örneklenen buzağılardan pozitif olarak tespit edilen 7 tanesinin de 1/20 - 1/120 arasında, doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde örneklenen aynı buzağılarda ise 1/5 - 1/60 arasında olduğu tespit edildi. Elde edilen sonuçlar tablo 1 ve grafik 1-2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Doğumdan önce ve doğum anında örneklenen gebe ineklerin SN₅₀ değerleri



Şekil 2. Buzağuların prekolostral ve doğumdan sonra ortalama üç ay içinde örneklenen kan serumlarının SN₅₀ değerleri

Gebe sığırlarda ve bunların buzağlarında...

Tablo1.Örneklenen gebe hayvanların ve buzağlarının serum nötralizasyon testi sonucu tespit edilen SN50 değerleri ve buzağların ortalama 3 ay içindeki örnekleme zamanları.

HAYVAN NO	DOĞUM ÖNCESİ	DOĞUM ANI		DOĞUM SONRASI YAVRU	
	ANNE SN 50 Değeri	ANNE SN 50 Değeri	YAVRU SN 50 Değeri	Örnekleme Zamanı (Ay)	SN 50 Değeri
1	1/160<	1/80	0	1	1/80
2	1/160<	1/160<	0	1,5	1/120
3	1/20	1/40	0	1	1/40
4	1/160<	1/120	0	1	1/60
5	1/10	1/60	1/20	2,5	1/60
6	1/160<	1/160	0	1,5	1/120
7	1/160	1/120	0	1	1/7,5
8	1/20	1/7,5	0	1,5	1/5
9	1/15	1/160	1/40	3	1/120
10	1/160<	1/160<	0	1	1/80
11	1/160<	1/160<	0	3	1/160
12	1/160	1/120	0	2	1/120
13	1/160<	1/20	0	1	1/15
14	1/160<	1/30	0	1	1/15
15	1/160<	1/160<	0	3	1/160
16	1/160	1/160<	0	3	1/160
17	1/40	1/60	0	1,5	1/40
18	1/20	1/20	0	1,5	1/15
19	1/30	1/30	0	2	1/30
20	1/60	1/60	0	2	1/60
21	1/80	1/160<	0	2,5	1/160
22	1/20	1/60	0	1	1/20
23	1/120	1/160	0	2	1/120
24	1/60	1/60	0	1,5	1/40
25	1/10	1/160	1/80	2	1/120
26	1/160	1/80	0	1,5	1/80
27	1/160	1/60	0	1	1/40
28	1/160	1/120	0	1	1/80
29	1/160	1/160<	0	2,5	1/160
30	1/160<	1/160<	0	2	1/120
31	1/20	1/20	0	1	1/10
32	1/160	1/60	0	1,5	1/60
33	1/7,5	1/60	0	1,5	1/60
34	1/40	1/120	0	2	1/120
35	1/40	1/60	0	1	1/40
36	1/20	1/7,5	0	1	1/5
37	1/10	1/160	0	1	1/80
38	1/20	1/160	0	3	1/160
39	1/20	1/60	0	1,5	1/20
40	1/40	1/120	0	1	1/120
41	1/160<	1/160	0	2,5	1/160
42	1/160	1/20	0	1	1/20
43	1/10	1/15	0	1,5	1/15
44	1/40	1/60	0	2	1/60
45	1/160<	1/160<	0	3	1/160
46	1/160<	1/40	0	1	1/40
47	1/40	1/120	0	1	1/60
48	1/20	1/60	1/40	1	1/40
49	1/7,5	1/20	0	1	1/15
50	1/10	1/160	0	2	1/120
51	1/10	1/10	0	1	1/10
52	1/7,5	1/7,5	0	1,5	1/7,5
53	1/10	1/160	1/120	3	1/160
54	1/10	1/160	0	2	1/120
55	1/10	1/60	1/20	1,5	1/40
56	1/10	1/160	1/80	2	1/120
57	1/80	1/30	0	1	1/20
58	1/160<	1/80	0	1	1/40
59	1/160<	1/7,5	0	2	1/7,5
60	1/160<	1/160	0	3	1/160
61	1/160<	1/30	0	1	1/10
62	1/160<	1/40	0	1	1/20

Tartışma ve Sonuç

BVD enfeksiyonları tüm dünyada yaygındır ve sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Enfeksiyon; depresyon, ateş, hafif diyare, geçici leukopeni ile karakterizedir (Radostits ve Littlejohns 1988).

BVDV'unun ncp biyotipi ile gebeliğin çeşitli dönemlerinde enfekte olan seronegatif gebe sığırlarda virus fötüsü gebeliğin dönemine bağlı olarak çeşitli şekillerde etkileyebilmektedir. Oluşan fötal lezyonlar; konjenital anomaliler, abort, mumifikasyon, beyin ve göz lezyonları ve persiste enfekte buzağı doğumu olarak ifade edilmektedir (Casaro ve ark.1971, Brownlie ve ark. 1998, Brusckke ve ark.1998, Kahrs ve ark. 1980, Liess 1990)

BVDV'unun ncp biyotipi ile gebeliğin 120. gününden önce yani fötüs henüz antijeni tanıyacak düzeyde yeterli immun yanıt oluşturma yeteneğine sahip değilken enfekte olan hayvanlar, persiste enfekte buzağılar dünyaya getirmekte ve bu hayvanlar ömür boyu virus kaynağı olarak sürüler için enfeksiyon riski oluşturmaktadırlar. (Thur ve ark. 1997).

Özkul (1992), gebe sığırlarda ve bunların buzağılarında BVDV'unun transplasental enfeksiyonu sonucu oluşan etkileri hakkında yapmış olduğu çalışmada, BVDV'unun transplasental aktarımını ve fötüsün çeşitli organlarına (böbrek, dalak, akciğer) yerleşen virus antijenlerini tespit ederek, BVDV enfeksiyonunun anneden fötusa bulaştığını rapor etmiştir.

Araştırmada özel bir süt sığırı işletmesinde bulunan çeşitli gebelik dönemlerindeki, 62 adet sığırdan virus izolasyonu amacıyla EDTA'lı tüplere, antikor tespiti için normal tüplere kan örnekleri alındı. Gebelik süreleri boyunca işletme veterinerleri ile iletişim sağlanarak hayvanların klinik durumları ve abort olup olmadığı konusunda bilgi alındı. Aynı hayvanların doğumları sırasında hem anne hem de prekoloztral buzağılardan virus izolasyonu ve antikor tespiti için de kan örnekleri alındı. Konjenital anomalili ya da normalden zayıf buzağuların olup olmadığı kontrol edildi. Annelerden, birinci örnekleme sırasında virus ya da antikor negatif bir hayvan varsa bu durumun doğum anına kadar devam edip etmediğini tespit etmek amacıyla ikinci örnekleme yapıldı. Prekoloztral buzağılardan ise eğer varsa seronegatif annelerin BVDV'unun ncp biyotipi ile enfekte olması halinde fötusa olan etkileri, fötüsün immunolojik durumuna göre oluş-

turacağı antikorları belirlemek amacı ile numuneler alındı. Buzağılardan ortalama 3 ay içinde tekrar hem virolojik hem de serolojik amaçlı kan örneklerinin alınmasının sebebi ise doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde hayvanların virus yönünden tetkiki ve koloztrum almadan önce ve aldıktan sonra antikor titrelerinin tespiti ve karşılaştırılmasıdır.

Çeşitli araştırmacılar (Meyling 1984, Alkan 1989, Burgu ve Özkul 1993, Karaoğlu 1996) BVDV'unu araştırmak üzere DIF ve DPLA testlerini yaygın olarak kullanmışlar ve yaptıkları çalışmalarda her iki testin de paralel sonuçlar verdiğini ifade etmişlerdir. Çalışmada BVDV'unun FDB hücre kültürlerindeki antijen varlığını belirlemek amacı ile DIF ve DPLA testleri kullanılmıştır.

Meyling (1984), çalışmasında BVDV'u izole etmek amacıyla 132 adet lökosit örneklerini DIF ve PLA testlerine tabi tutmuş ve her iki test ile kontrol ettiği örneklerden 126 tanesinin pozitif olduğunu bildirmiş, DIFT ve PLA'nın birbiri ile uyumlu testler olduğunu ifade etmiştir.

Alkan (1989), tarafından yapılan bir çalışmada 6'sı kör buzağılara, 4'ü kör buzağuların annelerine ait lökosit örneklerinde olmak üzere 10 adet cp BVDV, biri kör bir buzağıya, diğer ikisi ise abort yapmış ve kör buzağı doğurmuş annelere ait lökosit örneklerinden olmak üzere 3 adet ncp BVDV izole etmiştir. Alkan (1989), çalışması dahilinde örneklediği ve BVDV antijeni yönünden negatif olarak tespit ettiği 15 ve 28 nolu annelerin antikor titresini sırasıyla 1/5 ve 1/160 olarak tespit etmiştir. Her iki anneye ait buzağı BVDV antijeni yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Annelerin gebeliğin erken dönemlerinde yani fötüs henüz immunolojik yanıt verme yeteneğinde değilken virusla enfekte oldukları araştırmacı tarafından ifade edilmiştir.

Özkul (1992), 50 adet gebe inek ve fötüslerinde yaptığı çalışmasında sadece 1 anneye ait lökosit numunesini BVDV antijeni yönünden pozitif olarak değerlendirmiştir. Araştırmacı (1992), bu annenin örneklenmesi sırasında akut-geçici veya persiste bir vireminin varlığını gösterebileceğini ifade etmiş, örneklenen hayvanların kısa sürede kesilmeleri nedeniyle ikinci kez örnekleme yapılamaması bu durumun akut veya persiste bir enfeksiyonun sonucu olup olmadığının belirlenememesine neden olduğunu bildirmiştir.

Şimşek (1994), BVDV'u ile persiste enfeksiyonu araştırmak üzere test ettiği 142 adet sağlıklı hayvandan elde ettiği lökosit numunelerini DIFT ile kontrol ederek 2 adet akut enfeksiyon belirlendiğini bildirmiştir.

Karaoğlu (1996), sindirim veya solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren 183 adet sığıra ait gaita, lökosit ve serum numunelerinin hücre kültürü pasajları sonucunda elde edilen 1. pasaj sıvılarını DPLA testine tabi tutmuş ve 3 adet lökosit numunesinden BVDV antijenini tespit ettiğini bildirmiştir. Aynı araştırmacı bu 3 numunenin 1. pasaj sıvılarını DIF testine tabi tutarak aynı sonuçları elde ettiğini ifade etmiştir. Karaoğlu (1996), aynı çalışma içinde daha önceden Alkan (1989) tarafından DIF testi ile antijen pozitif olarak tespit edilen 5 izolata ve Burgu ve Özkul (1993) tarafından yine DIF testi ile antijen pozitif olarak tespit edilen 12 izolata DPLA testi uygulayarak aynı sonuçları elde ettiğini ifade etmiştir.

Çalışmada BVDV'u tespit etmek amacıyla gebeliğin çeşitli dönemlerindeki 62 adet inekten, aynı hayvanların doğumları sırasında hem anne hem de prekoloztral buzağılardan ve doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde aynı buzağılardan tekrar alınan toplam 248 adet lökosit numunesinin FDB hücre kültüründe gerçekleştirilen 1.pasaj sıvılarının DIFT'ne tabi tutulmaları sonucu BVDV antijen varlığı belirlenememiştir. Aynı numuneler DPLA testine tabi tutularak DIFT'ne paralel sonuçlar elde edilmiştir. Hem DIFT hem de DPLA testinin uygulanması sırasında virus kontrol olarak ayrılan gözlerde pozitif sonuçlar elde edilmiş, hücre kontrol olarak ayrılan gözlerde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Elde edilen bulgular yukarıda bildirildiği gibi her iki testinde birbiri ile paralel sonuç verdiğini göstermektedir.

SN testi, BVDV'una karşı oluşan antikorları belirlemek amacıyla birçok araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Alkan (1989) tarafından yapılan çalışmada pozitif bulunan serumların büyük bir kısmı 1/40 ve daha yüksek oranlarda nötralizan aktivite göstermiştir. Gelferd (1991) tarafından Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılan bir çalışmada, BVDV yönünden seropozitif olan hayvanların (1/40 ve üzeri antikor içeren) ortalaması %74 olarak belirlenmiştir. Özkul (1992), yaptığı çalışmada seropozitif olarak belirlediği 40 adet hayvandan 35 tanesinde nötralizan antikor titresini 1/30 ve daha yüksek olarak belirlediğini ifade etmiştir. Şimşek (1994), seropozitif olarak belirlediği 113 hayvanın 73 adedeki nötralizan antikor titresini 1/39,8 ve daha yüksek oranlarda olduğunu tespit etmiştir. Karaoğlu (1996), Ceyhan ve Acıpayam'daki kapalı işletmelerde örneklenen sığırların tamamını (%100) seropozitif olarak belirlerken, Akyurt'taki özel işletmeden örneklediği hayvanların %89,5'ini, Çubuk mezbanasında örneklenen sığırların ise %92,5'ini

seropozitif olarak belirlediğini ifade etmiştir.

Bu çalışmada BVDV'una karşı oluşan antikorları belirlemek amacıyla SN testi kullanılmıştır. Çalışmada, örneklenen sürüdeki gebe annelerin hepsinin BVDV yönünden SN testi ile antikor taramaları sonucu seropozitif olduğu belirlenmiştir. Kısaca belirtmek gerekirse; 62 adet gebe anneden %100 oranında seropozitiflik tespit edilirken, doğumdan önce örneklenen gebe ineklerin SN₅₀ testi sonucunda antikor titrelerinin 1/7,5 - 1/160 arasında değiştiği ve 35'inin 1/40 ve üzerinde antikor titresi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Çalışmada annelerde tespit edilen antikor titreleri Türkiye'de daha önce BVDV'u üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir

Çalışmada doğumu takiben hemen örneklenen prekoloztral buzağılardan büyük bir kısmı (55 adedi) seronegatif olarak belirlenmiştir. Prekoloztral buzağılardan seropozitif olan 7 adedinin antikor titreleri 1/20-1/120 arasında tespit edilmiştir (Tablo 1). Casaro ve ark (1971), gebeliğin çeşitli dönemlerinde bulunan 26 sığırla yaptıkları bir çalışmada gebeliğin 168. gününden daha sonraki dönemlerde bulunan 5 adet fötüsü intraperitoneal ya da intramuskuler yolla direkt olarak BVDV'u ile enfekte ettiklerini ve fötuslardan 1 tanesinde antikor gelişmezken 4 tanesinde tespit edilen antikor titrelerinin gebeliğin 190. günündeki fötusta 1/3, 210. günündeki fötusta 1/1.450, 240. günündeki fötusta 1/2.048, 280. günündeki fötusta 1/4.096 olduğunu belirtmişlerdir.

Classick ve Fernelius (1970), gebeliğin son döneminde bulunan 4 yaşındaki seronegatif bir sığırı BVDV'u ile enfekte etmişler, doğumu takiben prekoloztral buzağıdan aldıkları serum örneğinde yüksek titrede nötralizan antikor tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Kendrick (1971), gebeliğin 40-235. günlerinde BVDV'u ile enfekte edilen sığırlardan doğan buzağılara ait 17 prekoloztral serum numunesinin 12 tanesinde nötralizan antikor belirlemiştir. En erken nötralizan antikor oluşturma süresini Kendrick (1971) 93. gün olarak, Casaro ve ark. (1971) 168. gün olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Orban ve ark (1983), gebeliğin 190-265. günleri arasında bulunan seronegatif 36 adet sığırı canlı BVDV aşısı ile aşıladıktan sonra doğan buzağılardan kolostrum almadan önce serum örnekleri alarak 34 tanesinde 1/80 ile 1/216 titre arasında nötralizan antikorlar tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar 2 adet buzağıda BVDV'una karşı antikor tespit edememişlerdir. Aynı araştırmacılar seropozitif

olan 48 adet gebe sığırı canlı BVDV aşısı ile aşılamışlar ve buzağuların 44 tanesinde nötralizan antikor belirlenemezken, 4 tanesinde 1/20 - 1/180 titrede nötralizan antikorlar tespit ettiklerini ifade etmişlerdir

Yukarıda bahsedilen BVDV'unun gebe aneden fütüsüne geçişiyle ilgili çalışmalarda (Classick ve Fernelius 1970, Kendrick 1971, Casaro ve ark. 1971, Orban ve ark. 1983) gebeliğin 120. gününden sonra gelişen fütal immün cevabın sonucu olarak, sezeryanla alınan ya da normal doğan buzağılardan yapılan prekoloztral örneklemelerle fütusun immün yeteneğine ve virus miktarına bağlı olarak çeşitli oranlarda antikor titreleri tespit edilmiştir. Orban ve ark.(1983)'nin 48 adet seropozitif gebe sığırla yaptıkları çalışma sonucunda doğan 4 adet seropozitif buzağıdan prekoloztral örneklemeye elde ettikleri antikor titreleri ile (1/20 - 1/180) bu çalışmada 7 adet seropozitif prekoloztral buzağıda tespit edilen antikor titreleri (1/20 - 1/180) uyumlu bulunmuştur.

Bu çalışmada annelerin antikor titrelerinin oldukça yüksek olması ve doğumu takiben prekoloztral buzağılardan yapılan örneklemenin virus negatif olarak tespit edilmesi annelerin virusla gebelikten önce enfekte olduklarını göstermektedir. Gebelik sırasında virusla ikinci kez karşılaşmalar bile birinci enfeksiyonu takiben gelişen antikorlar hayvanları enfeksiyona karşı koruyacak ve gebeliğin erken döneminde bile olsa virusun fütusa geçişi engellenecektir. Doğumu takiben annelerinden aldıkları kolostrumla maternal antikorlar buzağılara aktarılmış ve örnekleme süresi içinde ortalama 3 ay - bu antikorlar buzağıları BVDV enfeksiyonuna karşı korumuştur.

Çalışmada doğumu takiben 3 ay içinde örneklenen buzağıların hepsinin seropozitif olması kolostrumla aktarılan maternal antikorlara bağlıdır. Doğumdan önce ve doğum sırasında antikor titreleri yüksek olan annelerin -kolostrumla aktarılan maternal antikorlara bağlı olarak- buzağılarının da antikor titreleri yüksek bulunmuştur. Palfi ve ark (1993), yaptıkları bir çalışmada, 11 adet persiste enfekte buzağı ve 1 adet immünkompetans buzağıyı BVDV'u ve BVDV antikorları yönünden araştırmışlardır. Araştırmacılar persiste enfekte buzağıların hepsinde virus tespit ederken immünkompetans buzağıda virus tespit edemediklerini bildirmişlerdir. 20 hafta süren araştırma periyodunda immünkompetans buzağının antikor titresi 1/1024 olarak belirlenirken 4. haftada 1/512, 8. haftada 1/96, 12. haftada 1/48, 18. haftada ise 1/32 olarak belirlediklerini ayrıca maternal an-

tikorların buzağıyı 18 hafta boyunca koruduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada kolostrum aldıktan sonra örneklenen buzağıların antikor titreleri 1/5-1/160 arasında tespit edilmiştir. Doğum anında seropozitif bulunan buzağıların örnekleme zamanları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada doğumu takiben kolostrum alan buzağılardan ilk 3 ay içinde belirlenen nötralizan antikor titrelerinde maternal antikorların rolü büyüktür. Bu anlamda elde edilen sonuçlar Palfi ve ark. (1993)'larının çalışması ile paralellik göstermektedir.

Toplam 248 adet numune BVDV'u tespit etmek üzere DIF ve DPLA testleri ile kontrol edilmiştir. Testlerin sonucunda virus izole edilememiştir.

Bu çalışmada, gebe sığırların BVDV'u yönünden virolojik ve serolojik tetkikleri ile gebelik dönemine bağlı olarak enfeksiyonun fütusa aktarılması ve fütusun yaşına bağlı olarak gösterdiği tepkilerin ve oluşan anormalliklerin saptanması, doğumu takiben prekoloztral örneklemelerle buzağıların ve annelerinin etkilenme yaşlarına göre serolojik ve virolojik pozisyonları incelenerek ilk 3 ay içindeki durumları belirlenmiştir. Yüksek antikor titresine sahip annelerden doğan seronegatif buzağıların doğumu takiben ilk 3 ay içindeki örneklemelerinde tespit edilen antikor titreleri, annelerinden aldıkları kolostrumla geçen maternal antikorlara bağlı olarak, 1/5-1/160 arasında tespit edilmiştir. Buzağılardan 24'ü doğumu takiben ilk 1 ay, 12'si ilk 1.5 ay, 10'u ilk 2 ay, 3'ü ilk 2.5 ay ve 6'sıda 3. ayda örneklendi. Yüksek antikor titresine sahip annelerin buzağılarında antikor titreleri yüksek bulunmuştur. Doğumdan sonra ilk 3 ay içinde örneklenen buzağılarda viral antijenlerin belirlenmemesi, buzağıların bu süre zarfında BVDV'u ile enfekte olsalar bile kolostrumla aldıkları maternal antikorlar tarafından korunmalarına bağlanmıştır.

Doğum anında seropozitif olarak tespit edilen 7 adet buzağının annelerinin doğum öncesi örneklemelerinde antikor titreleri 1/10-1/20 arasında tespit edilmiştir. Seropozitif olan buzağıların annelerinin ilk örnekleme gebeliğin 6.-6.5. aylarında gerçekleştirilmiştir. Yedi annenin gebelikleri esnasında gerçekleştirilen örneklemelerinde antikor titreleri düşük seviyede tespit edilmesine rağmen doğum anında gerçekleştirilen 2. örneklemede antikor titreleri oldukça yüksek (1/60-1/160) bulunmuştur. Bu sonuç; 7 adet buzağının annelerinin gebelikten çok daha önce BVDV'u ile enfekte olduklarını ve birinci örnekleme anına kadar nötralizan antikor seviyelerinin düşmüş olabileceğini, doğum anında tekrar örneklenen bu annelerin an-

tikor seviyelerinin birinci örnekleme göre yüksek bulunması da bu iki periyot arasında BVDV'u ile tekrar enfekte olduklarını ya da annelerin 1. örnekleme esnasında enfeksiyonu henüz çok yeni geçirdiklerini akla getirebilir. Birinci örnekleme esnasında düşük antikor seviyesine sahip 7 adet annenin reenfeksiyonu ya da akut enfeksiyonu sonucu virus plasentayı geçerek fôtusa ulaşmış olabilir. Gebeliklerinin 6-6,5. aylarında örneklenen bu annelerin buzağılarının immun sistemi antikor oluşturabildiği için 7 adet buzağı seropozitif olarak doğmuştur. 7 buzağının prekoloztral örneklemleri yapılarak SN testi uygulanmış ve antikor titreleri 1/20 - 1/120 oranında tespit edilmiştir. Prekoloztral örneklemlerinde seropozitif olan 7 adet buzağının koloztrum aldıktan sonraki ortalama 3 ay içindeki örneklemleri sonucu antikor titreleri 1/60 - 1/120 oranında tespit edilmiştir. Buzağuların nötralizan antikor seviyesindeki artış koloztrumla annelerinden aldıkları maternal antikorlarca sağlanmıştır.

Doğum anındaki örneklemlerinde seronegatif olan buzağuların annelerinin büyük bir bölümünün gebelik dönemindeki ilk örneklemlerinde yüksek antikor titresine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu hayvanlar BVDV'u ile reenfeksiyona maruz kalsalar bile var olan antikor seviyeleri virusu elemine ederek fôtusa geçmesine izin vermez. Virus fôtusa ulaşmadığı için buzağı seronegatif olarak doğar. Birinci örneklemlerinde düşük antikor titresine sahip annelerin 2. örneklemlerinde belirlenen yüksek antikor seviyeleri annelerin immun sistemleri ile ilgilidir. Zira bu annelerin prekoloztral buzağularını SN testi ile seronegatif olarak tespit edilmiştir. Buzağulardan hiç birisinde viral antijen ve nötralizan antikor belirlenmemiştir. Bir reenfeksiyon söz konusu değildir.

Bu çalışmanın amacı pesiste enfeksiyonu tespit etmek olduğundan gebe hayvanların büyük bir bölümü gebeliklerinin ilk 3. - 3,5. aylarında örneklendirilmiştir. Bununla birlikte örnekleme gebeliklerinin 6. - 6,5. aylarına kadar uzayan hayvanlar mevcuttur. Gebeliğin erken dönemlerinde örnekleme amacı fôtusların immun sistemlerinin yaklaşık 120. günden sonra gelişmesi ve antikor oluşturabilmesidir. İmmun sistemleri gelişmemiş olan fôtuslar antikor oluşturamaz, virusu yabancı olarak tanımaz ve seronegatif olarak doğar.

Seronegatif ya da seropozitif doğan tüm buzağular koloztrum aldıktan sonra maternal antikorlarca BVDV enfeksiyonuna karşı korunmuşlardır. Ortalama 3 ay içindeki örneklemede seronegatif buzağuların antikor seviyeleri an-

nelerinden aldıkları maternal antikor titresine bağlı olarak 1/7,5 - 1/160 olarak tespit edilmiştir (Şekil 2).

Persiste enfeksiyonları ve fôtusun yaşına bağlı olarak virusun fôtus üzerine etkilerini belirlemek üzere gerçekleştirilen bu çalışmada annelerin ve yavruların antikor düzeyleri de değerlendirilerek tartışılmıştır. Pasif immunitede maternal antikorların önemi vurgulanmıştır.

Persiste enfekte hayvanlar sığır yetiştiriciliğinde sürekli bir enfeksiyon kaynağı olmaktadır. Sürü içindeki gebe hayvanlara da virusu bulaştırabilmekte ve transplasental enfeksiyonlar sonucu gebeliğin dönemine bağlı olarak fôtusu çeşitli şekillerde etkileyebilmektedirler. BVDV'u ile mücadelede sürüdeki PI hayvanlar belirlenerek sürüden uzaklaştırılmalıdır. Özellikle büyük sürülerde tüm hayvanlardan tek tek virus izole etmeye çalışmak zahmetli ve uzun süreli bir yöntemdir. Bu yüzden serolojik taramayla seronegatif hayvanlar tespit edilmelidir. Seronegatif hayvanlar BVDV antijeni yönünden sürekli kontrol edilerek, antijen pozitif olanlar sürüden ayrılmalıdır.

Kaynaklar

- Alkan, F. (1989). Arthrogrippythypso ve hydranencephaly'li buzağı doğumlarında bovine viral diarrhoea buzağı doğumlarında bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD)'in insidensi üzerinde araştırmalar, A.Ü. Sağ. Bil. Enst., Doktora tezi, Ankara.
- Brownlie, J., Hooper, L.B., Thompson, I., Collins, M.E. (1998). Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) the bovine pestivirus, Clin. Diagn. Virol., 10,2-3, 141-150.
- Bruschke, C.J., Haghparast, A., Hoek, A., Rutten, V., Wentink, G.H., Rijn, P.A., Oirschot, J.T. (1998). The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV, Vet. Immunol. Immunopathol., 62, 1, 37-50.
- Burgu, İ., Özkul, A. (1993). Detection of bovine virus diarrhoea (BVD) virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey, Dtsch. Tierärztl. Wschr., 100, 361-363
- Casaro, A.P.E., Kendrick, J.W., Kennedy, P.C. (1971). Response of bovine fetus to BVD-MD virus, Am. J. Vet. Res., 32, 10, 1534-1562.
- Classick, L.G., Fernelius, A.L. (1970). Bovine viral diarrhoea virus: Neutralizing antibodies in a calf obtained by cesarean section from cow which was infected, Am. J. Vet. Res., 31, 2, 393-395
- Frey, H.R., Liess, B. (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode, Zbl. Vet. Med., 18, 61-71.

- Gelferd, C.G. (1991). Epidemiologische untersuchungen über die verbreitung des BVD-virus bei Rindern in der Türkei, Inaugural Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 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. B.*, 34, 227-239.
- Kaerber, G. (1964). In diagnostic procedues for virus and rickettsial disease, *Public. Health. Assoc.*, 3, 48-50.
- Kahrs, R.F., Gibbs, E.P.J., Larsen, R.E. (1980). The search for viruses in bovine semen: A review, *Theorogenology*, 14, 151-165.
- Karaoğlu, M.T. (1996). Sahadan izole edilen bovine viral diarrhoea virus (BVDV) suşlarının immunoplak test yardımı ile biyotip karakterlerinin (sitopatojen-çp ve sitopatojen olmayan-ncp) saptanması, A.Ü. Sağ. Bil. Enst., Doktora Tezi, Ankara.
- Kendrick, J.W. (1971). Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows, *Am. J. Vet. Res.*, 32, 533-544.
- Liebler-Tenorio, E.M., Greiser-Wilke, I., Pohlenz, J.F. (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.
- Liess, B. (1990). Bovine viral Diarrhoea virus. IN "Virus Infections of Ruminant". Ed. Dinter, Z., Morein, B., Elsevier Science Publisher B.V., Netherlands, 247-266.
- Meyling, A. (1984). Detection of BVD virusin viremik cattle by an indirect immunoperoxidase technique, *Recent Advances in virus diagnosis. CEC seminar, Belfast, Sept.* 22-23, 37-46
- Orban, S., Liess, B., Hafez, S.M., Frey, H.R., Blindow, H., Sasse-Patzer, B. (1983). Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 256th day of gestation), *Zbl. Vet. Med. B.*, 30, 619-634.
- Özkul, A. (1992). Gebe ineklerde ve fötüslerinde bovine viral diarrhoea -mucosal disease (BVD-MD), A.Ü. Sağ. Bil., Doktora tezi, Ankara.
- Palfi, V., Houe, H., Philipsen, J. (1993). Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves, *Acta. Vet. Scand.*, 34, 105-107.
- Radostits, O.M., 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.
- Şimşek, A. (1994). Klinik olarak sağlıklı sığır sürülerinde persiste bovine viral diarrhoea virus enfeksiyonlarının saptanması ve epizootiyolojik önemi, S.Ü. Sağ. Bil. Enst., Doktora Tezi, Konya.
- Thur, B., Hilbe, M., Strasser, M., Ehrensperger, F. (1997). Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death, *Am. J. Vet. Res.*, 58, 12, 1371-1375
- Weiss, M., Hertig, C., Strasser, M., Vogt, H.R., Peterhans, E. (1994). Bovine virus diarrhoea/mucosal disease: A review, *Schwerz. Arch. Tierheilkd.*, 136, 5, 173-185.