



Immunohistochemistry and PCR methods for the Diagnosis of BVDV in Cattle with Pneumonia in Erzurum Region

Mustafa ÖZKARACA¹ Mehmet Özkan TİMURKAN²

¹ Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Erzurum, Turkey

² Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Erzurum, Turkey

Received: 04.03.2016

Accepted: 20.04.2016

SUMMARY

This study was aimed to present *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) in bovine pneumonias with PCR and immunohistochemistry in Erzurum region, also aimed to determine what is the prevalence of agent in sampling term (01 December 2015-15 February 2016). For this purpose 600 bovine lungs were investigated in slaughterhouses that operated in Erzurum and surrounding counties. Due to evaluation of 72 (12%) lungs with pneumonia diagnosed macroscopically, the interstitial pneumonia n=43, suppurative bronchopneumonia n=23, and fibrinous pneumonia n=3 were classified according to histopathological findings. Immunopositivities of BVDV antigens were observed in 4 out of 72 (5.5%) samples. Same positive samples were confirmed with pestivirus genus specific primers to differentiate cross binding and dyeing in immunohistochemical procedures. Immunopositivity of the samples were located in bronchial epithelium, peribronchial, peribronchioler, inflammatory cells in intersitital areas; intima layer of arterioles; lymphoid cells in BALT. As a result we found that BVDV is found in 5.5% of the mature cattle pneumonia cases in Erzurum Region an it is an aetiological agent in natural cases of pneumonia in our sampling time.

Key Words: Cattle, Bovine Viral Diarrhea Virus, Immunohistochemistry, Pneumonia

ÖZET

Erzurum Yöresinde Pnömonili Sığırlarda BVDV' nin Teşhisinde İmmunohistokimya ve PCR Yöntemleri

Bu çalışmada *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVD)'nin Erzurum yöresi sığır pnömonilerindeki varlığının immunohistokimyasal yöntemle teşhisi ve PCR ile konfirmasyonu ayrıca örneklenen dönem içerisinde ne oranda bulunduğu tespiti amaçlanmıştır. Bu amaçla ilgili dönem içerisinde (01 Aralık 2015 - 15 Şubat 2016) Erzurum ve çevre ilçelerine hizmet veren bir mezbahada kesime alınan 600 sığır akciğer örneği incelendi. Makroskopik olarak pnömoni bulgusu gösteren 72 (%12) örneğin histopatolojik incelemesinde farklı türlerde pnömoni oldukları (43=intersitisyel pnömoni, 23=suppuratif bronkopnömoni, 3= fibrinöz bronkopnömoni) belirlendi. BVD yönünden immunohistokimyasal yöntemle tespiti yapılan 72 pnömoni örneğinden 4 (%5.5)'ünde immunpozitiflikler görüldü. Aynı pozitiflikler çapraz bağlanma ve boyanmaları ayırt etmek amacıyla pestivirus genus spesifik primerler kullanılarak PCR ile de doğrulandı. Bu dokulardaki immunpozitifliklere bronş epitel hücrelerinde, peribronşial, peribronşioler, intersitisyel alanlardaki yangısal hücrelerde, arteriollerin intima tabakasında, BALT'taki lenfoid hücrelerde rastlandı. Sonuç olarak; BVD' nin ilgili dönem içerisinde Erzurum yöresinde erişkin sığır pnömonilerinde %5.5 oranında bulunduğu ve doğal pnömoni olgularında rol oynayan etiyolojik ajanlardan birisi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Bovine Viral Diarrhea Virus, İmmunohistokimya, Pnömoni

GİRİŞ

Bovine viral diarrhea (BVD) virusu, *Flaviviridae* ailesinde *pestivirus* genusunda bulunan bir virustur (Ridpath ve Bolin 1998). Dünya genelinde sığır endüstrisi için oldukça önemli olan bu enfeksiyon, özellikle fertilitate kaybına sebep olarak ekonomik kayıplara, gebelerde abortlara, ishale, yine solunum sistemi semptomlarına ve diğer etkenlerle karışarak şiddetli pnömonilere en son olarak ta gebe

hayvanlarda yavruya geçerek persite enfekte yavru doğumlarına sebep olmaktadır (Hilbe ve ark. 2007). Enfeksiyon ile mücadelede en büyük sorun persite olma durumudur. Persite yani kalıcı enfeksiyon sığırların yaklaşık olarak %1-3'ü oranında tespit edilmiştir. Bu hayvanlar klinik belirti göstermeksizin, hayatları boyunca sürüdeki diğer hayvanlara enfeksiyonu bulaştırırlar (Kahrs 2001) Özellikle akciğer enfeksiyonlarında bu durum sürü sağlığı açısından önem taşımakta, klinik belirti

göstermeyen hayvanlar sürekli virusu saçarak sürünün sağlığını tehlikeye sokmaktadırlar. Bu yüzden hızlı ve güvenilir bir yöntemle teşhis yapıp hasta hayvanların sürülerden uzaklaştırılması, bu enfeksiyonda bir kat daha önem arz eder.

Virüs vücuda ağız veya burun yolu ile girer. İlk replikasyonu üst solunum yolu ve barsak epitel hücrelerinde gerçekleşir (Houe 1999). Salivasyon, nazal akıntılar, mukozada ülserler ile kriptom hücrelerinde, kolon, rektum ve ileum lenfoid dokularında nekrozlar şekillenir (Odeón ve ark. 1999). Virüsün, fagositik hücreler ile lenfoid dokulara taşındığı ve bu bölgelerde primer çoğalma ardından viremi ile tüm vücuda yayılarak ateş, ishal, lökopeni ve immünosupresyona neden olduğu bildirilmiştir (Brownlie 1991). Etken solunum sisteminde ise bazen şiddetli pnömonilere neden olabilmektedir (Yeşilbağ ve ark. 2014). Şiddetli enfeksiyon durumlarını tetikleyen bazen viral ve bakteriyel ajanlar olabilmektedir. Bunlar içerisinde Bovine herpesvirus 1, Bovine parainfluenza virus 3, Bovine respiratory syncytial virus ve *Pasteurella haemolyticaviral* ve bakteriyel ajanlar olarak sayılabilir. Bu ajanların çoğunlukla da birlikte ve mikis olarak seyrettiği ifade edilmiştir (Reggiardo ve Kaaberle 1981; Potgieter ve ark. 1984).

Hastalığın kesin tanısında direk teşhis için immunofloresans (IF) (Baker 1987; Fernandez ve ark. 1989), peroxidase linked antibody (PLA) (Fernandez ve ark. 1989), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Fernandez ve ark. 1989; Tan ve ark. 2006), elektronmikroskopi (EM) (Gillespie ve ark. 1990), immunohistokimya (IHC) (Wilhelmsen ve ark. 1991), revers transcriptaz- polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Oğuzoğlu ve ark. 2012) , indirek teşhiste ise serum nötralizasyon (SN) (Çabalar ve Karaoğlu 1999), İndirek immunofloresans (IIF) (Mogar ve ark. 1998), nötralizasyon immunperoksidaz (NPLA) (Hyera ve ark. 1987) testlerinden yararlanılmaktadır.

Yapılan literatür taramalarında etkenin Erzurum yöresinde sığır pnömonilerinde varlığının immunohistokimyasal yöntemle teşhisine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sunulan çalışmada BVD'nin Erzurum yöresi sığır pnömonilerindeki varlığının hem immunohistokimyasal yöntemle teşhisi ve PCR ile konfirmasyonu ayrıca örneklenen dönem içerisinde ne oranda bulunduğu tespitini amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Çalışma materyalini Erzurum ilinde faaliyet gösteren bir mezbahada kesimi yapılan sığırlara ait 600 adet akciğer örneği oluşturdu.

Histopatolojik İncelemeler

Makroskobik olarak pnömoni tanısı konulan 72 adet sığır akciğerine ait örnekler %10' luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Rutin alkol ksilol serilerinden geçirilen dokular parafin bloklara alındı. Bloklardan 5 µ kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda fibrinöz bronkopnömoni, suppuratif bronkopnömoni, intersitisyel pnömoni, granülatoz pnömoni ve embolik pnömoni şeklinde sınıflandırıldı (Lopez 2007).

İmmunohistokimyasal İncelemeler

Streptavidin-Biotin Kompleks metoduna göre ilgili firmanın önerdiği şekilde yapıldı (LSAB+ System- HRP, DAKO Carpinteria, USA). Bu amaçla polilislinli lamlara alınan 5 µm' lik kesitler ksilol ve alkol serilerinden

geçirildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra %3'lük H₂O₂' de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu ile 2x5 dk 500 watt' da muamele edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan dokular Anti-BVD antiserumu (VMRD, Katalog no. 210-70-BVD) ile 37° C de 1/500 dilüsyon oranında 30 dk süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda PBS ile yıkanan dokular biyotinlenmiş antikor ve Streptavidin-HRP'de 15'er dk bekletildi. Kromojen olarak 3,3 diaminobenzidine (DAB) kullanıldı. Yaklaşık 2 dk kromojende bekletilen kesitler saf su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Kesitler üzerine entellan damlatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

İmmunohistokimyasal olarak pozitif belirlenen örnekler konfirmasyon amacıyla PCR ile incelendi. Ekstraksiyon öncesi akciğer doku örnekleri 25 mg olarak küçültüldü ve bir Ependorf tüpe konuldu. Üzerine çelik boncuklar ve lizis buffer konularak Tissue Lyser LT (Qiagen, Almanya) doku homojenizatörü ile 5000 rpm'de 15 dk boyunca parçalandı. Süre sonunda santifüj edilen örneklerin sıvı kısmı toplanarak supernatanta ekstraksiyon işlemi uygulandı. Çalışma materyalini oluşturan örneklerden pestivirus RNA'sının izolasyonu viral nükleik asit ekstraksiyon kiti (Vivantis, Malezya) ile firmanın belirttiği yöntemle uygun olarak gerçekleştirildi. İzolasyon sonunda elde edilen nükleik asitler cDNA eldesi için kalıp olarak kullanılmak üzere saklandı. RT amacıyla kullanılacak olan viral RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi amacıyla Revertaid First Strand cDNA kiti (Thermo Scientific, Almanya) kullanıldı. Firmanın öngördüğü şekilde yapılan prosedür sonunda cDNA elde edildi.

PCR reaksiyonu için Vilcek ve ark. (1994) tarafından bildirilen primerler (324 ve 326), yöntem ve optimizasyon koşulları kullanıldı. Reaksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutularak moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılıp ardından UV ışık altında 288 bp büyüklüğünde bantlar pestivirus genüsü 5'UTR gen bölgesi yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

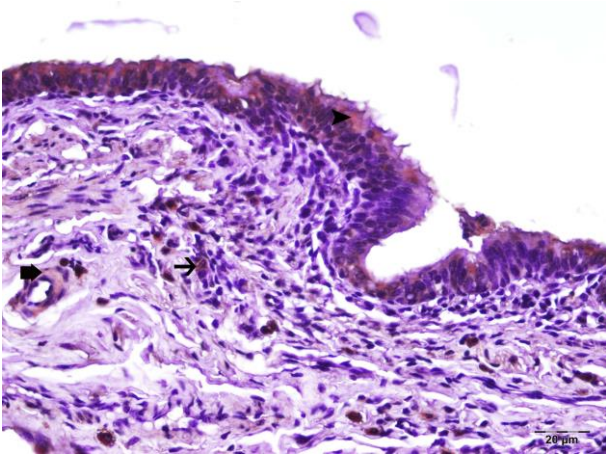
BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Makroskobik olarak pnömoni tanısı konulan 72 akciğer örneğinin histopatolojik incelemesinde 43'ü intersitisyel pnömoni, 23'ü suppuratif bronkopnömoni, 3'ü ise fibrinöz bronkopnömoni olarak sınıflandırıldı.

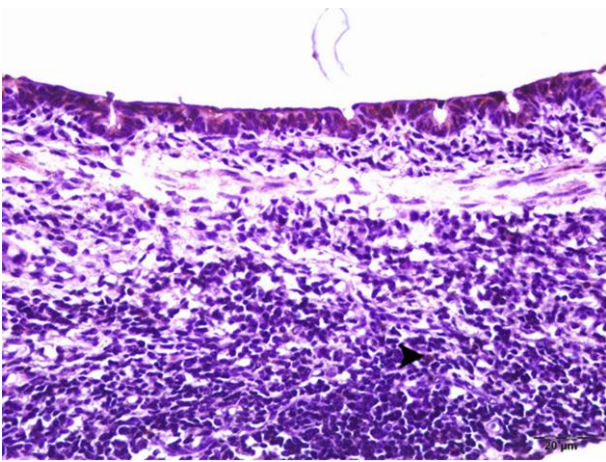
İmmunohistokimyasal Bulgular

BVD yönünden immunohistokimyasal boyama yapılan 72 pnömoni örneğinden 4 (%5.5)'ünde immunpozitiflikler görüldü. İmmunpozitiflikler intersitisyel pnömoni olarak sınıflandırılan örneklerde tespit edildi. Olguların tamamında immunpozitiflikler en şiddetli olarak, bronş epitel hücrelerinde, peribronşial alanlardaki yangısal hücrelerde sitoplazmik yerleşimli olarak ve arteriollerin intima tabakasında tespit edildi (Şekil 1). BALT' taki lenfoid hücrelerde ise daha hafif düzeyde immunpozitiflikler belirlendi (Şekil 2). Bunlara ek olarak peribronşioler ve intersitisyel alanlardaki yangısal hücrelerde de immunpozitifliklere rastlandı (Şekil 3,4).



Şekil 1. Bronş epitelinde (ok başı) ve yangısal hücrelerde (küçük ok), arteriol'ün intimasında (büyük ok) BVD immunpozitifliği.

Figure 1.BVD immunopositivity in bronch epithelium (arrowhead), inflammatory cells (small arrow), intima of arteriol (big arrow).

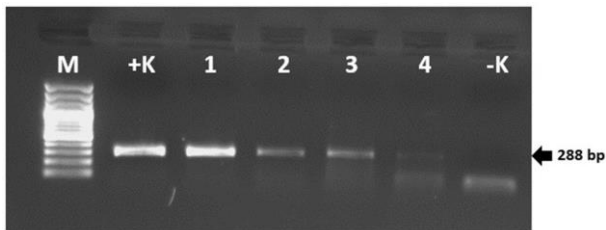


Şekil 2. BALT'taki lenfoid hücrelerde (ok başı) BVD immunpozitifliği.

Figure 2.BVD immunopositivity in lymphoid cells (arrowhead) of BALT.

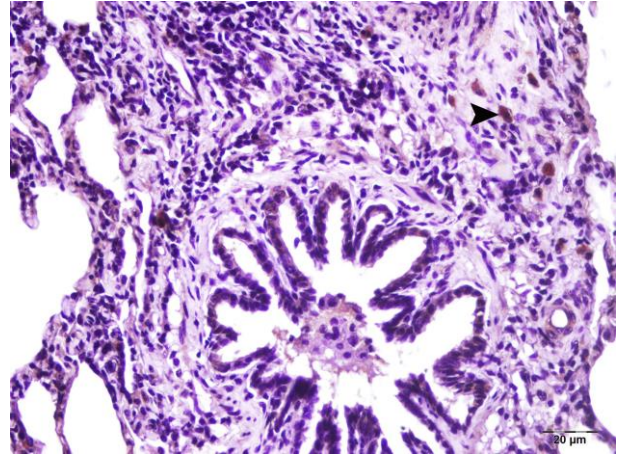
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Bulguları

İmmunohistokimyasal incelemede BVD immunpozitif olarak tespit edilen 4 örneğin tamamında viral nükleik asit tespit edildi (Şekil 5).



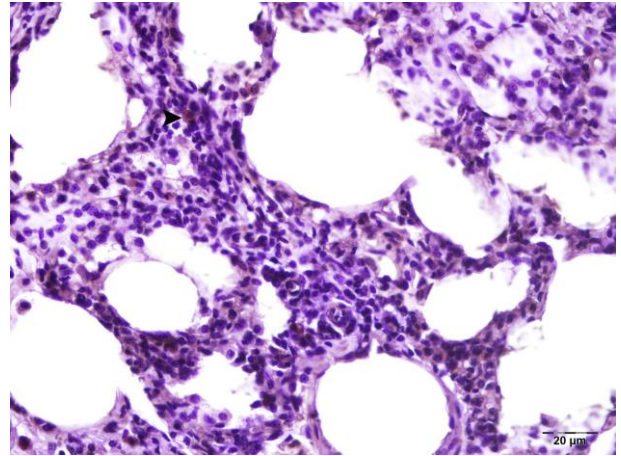
Şekil 5. Pestivirus genus 5'UTR gen bölgesi yönünden PCR sonuçları. 1, 2, 3, 4 pozitif örnekler, +K: Pozitif kontrol, -K:Negatif kontrol, M:Marker (100 bp DNA merdiveni, Thermo Scientific, Almanya), bp: Base-pair

Figure 5. PCR results of Pestivirus genus 5'UTR. 1, 2, 3, 4 positives samples. +K: Positive control., M: Marker (100 bp DNA ladder, Thermo Scientific, Germany), bp: Base-pair



Şekil 3. Peribronsioler alanlardaki yangısal hücrelerde (ok başı) BVD immunpozitifliği.

Figure 3.BVD immunopositivity in inflammatory cells of peribronchiolar.



Şekil 4. İntersitisyel alanlardaki yangısal hücrelerde (ok başı) BVD immunpozitifliği.

Figure 4.BVD immunopositivity in inflammatory cells of interstitial area.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sunulan çalışmada 72 pnömoni örneğinden 4 (%5.5)'ünde BVD immunpozitifliği görülmüş ve immunpozitiflikler intersitisyel pnömoni olarak sınıflandırılan örneklerde tespit edilmiştir.

BVD'nin daha önce solunum sistemi hastalıklarından izole edildiği bildirilmiştir (Fulton ve ark. 2000). Sığırlardaki deneysel çalışmalarda BVD ile solunum sistemi enfeksiyonu oluşturulmuştur (Baker 1985). Bununla birlikte bazı çalışmalarda diğer viral ve bakteriyel ekenlerle sinerjistik olarak enfeksiyona dahil olduğu bildirilmiştir (Potgieter ve ark. 1984; Stott ve ark. 1980).

Sunulan çalışmada BVD pozitif 4 olgunun intersitisyel pnömoni karakterinde bulunduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Ellis ve ark. (1998)'da buzağılarda yaptıkları deneysel BVD enfeksiyonunda intersitisyel pnömoni şekillendiğini bildirmişlerdir.

Literatür taramalarında BVD' nin immunohistokimyasal yöntemle teşhisi ile ilgili olarak bazı çalışmalar yapılmıştır (Wilhemsen ve ark. 1990; Ellis ve ark. 1998; Shahriar ve

ark. 2002; Gagea ve ark. 2006; Yeşilbağ ve ark. 2014). Shahriar ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada pnömonili sığır olgularında *Mycoplasma spp.* *Haemophilus somnus* ve BVD gibi etkenleri incelemişler ve çoğunlukla *Mycoplasma spp* ile birlikte BVD'nin bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle viral antijenlerin akciğerde yıkılanmış olan damar duvarlarında bulunduğunu tespit etmişlerdir. Gagea ve ark. (2006)'da *Mycoplasma spp.* ve *Haemophilus somnus* gibi bazı bakteriyel etkenlerle birlikte BVD'nin varlığını incelemişler ve alveolar makrofajlar, intersitisyel alanlar, damar duvarları ve bronşiol epitel hücrelerinde bulunduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada ise bronş epitel hücrelerinde immunpozitiflikler görülmüştür (Yeşilbağ ve ark. 2014). Wilhemsen ve ark. (1990) ise akciğerde herhangi bir lezyon görülmemesine rağmen, BALT' ta viral antijenlerin bulunduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmada da BALT, bronş epitel hücreleri, peribronşial, peribronşioler, intersitisyel alanlardaki yangısal hücreler ve arter duvarlarında tespit edilmiş olması önceki çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

Ellis ve ark. (1998) yaptıkları bir çalışmada viral antijenleri arter duvarlarına ek olarak alveolar makrofajlarda da tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada alveolar makrofajların bulunmaması akut bir enfeksiyon döneminde olmadığından kaynaklandığı düşündürmüştür. Ellis ve ark. (1998)'nin çalışmalarındaki gibi Shahriar ve ark. (2002)'da viral antijenlerin arter duvarlarında bulunduğunu tespit etmişlerdir. Fakat Shahriar ve ark. (2002)'nin çalışmalarında BVD'nin *Mycoplasma spp.* ve *Haemophilus somnus* gibi diğer bakteriyel etkenlerle miks olarak bulunduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde sunulan çalışmada da arter duvarlarında immunpozitiflik görülmesi, BVD'nin başka bir etken ile miks olarak bulunabileceğini düşündürmüştür.

İmmunohistokimyasal olarak elde edilen pozitif olgular PCR ile konfirme edilmiştir. Çünkü BVD'nin teşhisinde kısa sürede antijen tespiti ve karakterizasyonu için PCR yönteminin son yıllarda yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiş (Sandvik 2005; Hilbe ve ark. 2007) ve etkenin tespitine yönelik hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğu ifade edilmiştir (McGoldrick ve ark.1999). Ülkemizde daha önceden yapılan çalışmalarda pestivirus genusu içerisinde bulunan border disease için hem immunohistokimya hemde PCR konfirmasyon çalışmaları mevcuttur (Kul ve ark. 2008; Oğuzoğlu ve ark. 2009; Toplu ve ark. 2011; Toplu ve ark. 2012). Bu çalışmalarda border disease enfeksiyonu için hedef organizma olarak kuzular olduğundan koyun ve kuzular açısından ülkemizde tespit edilen coğrafyalar içerisinde pozitif reaksiyonlar ve konfirmasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada solunum sistemi hedef organı olarak akciğerler ve duyarlı hayvan türü olarak sığırlar seçilmiştir. Daha önce değinildiği gibi Yeşilbağ ve ark. (2014) Marmara bölgesinde bir hemorajik enteritis ve ciddi pnemoni salgınında yine IHC ve PCR birlikteliğini kullanarak teşhise gitmişlerdir. Ancak çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz Erzurum yöresi için böyle bir çalışmanın yapılmamış olması ve ilgili dönem içerisinde hastalık varlığının oransal olarak gösterildiği ilk çalışma niteliğindedir.

Sonuç olarak; bölgemizde BVD'nin doğal sığır pnömonilerindeki varlığı immunohistokimyasal yöntemle ilk kez ortaya konulmuştur. Ek olarak etkenin Erzurum yöresinde sığır pnömonilerinde %5.5 oranında bulunduğu ve doğal pnömoni olgularındaki etiyolojik ajanlardan birisi olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Baker JC (1985).** The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11, 425-445.
- Baker JC (1987).** Bovine viral diarrhoea virus. A review, *J Am Vet Med Assoc*, 190 (11), 1449-1458.
- Brownlie J (1991).** The pathways for bovine virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol*, 3, 9-96.
- Çabalar M, Karaoğlu T (1999).** Sığırlarda bovine viral diarrhoea (BVD) virüs enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında nötralizasyon peroksidaz(NPLA) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinin karşılaştırılması, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 249-255.
- Ellis JA, West KH, Cortese VS ve ark. (1998).** Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent Bovine Virus Diarrhoea Virus-Type II, *Can J Vet Res*, 62, 161-169.
- Fernandez A, Hewicker M, Trautwein G, Pohlenz J, Liess B (1989).** Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with Bovine virus diarrhoea virus, *Vet Pathol*, 26, 26-32.
- Fulton RW, Saliki JT, Confer AW ve ark. (2000).** Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle, *J Vet Diagn Invest*, 12, 33-38.
- Gagea MI, Bateman KG, Dreumel T ve ark. (2006).** Caswell Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots, *J Vet Diagn Invest*, 18, 18-28.
- Gillespie JH, Schlafer DH, Foote RH ve ark. (1990).** Comparison of persistence of seven bovine viruses on bovine embryos following in vitro exposure, *Dtsch Tierarztl Wschr*, 97 (2), 65-68.
- Givens MD (2006).** A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle, *Theriogenology*, 66, 648-654.
- Hilbe M, Stalder H, Peterhans E ve ark. (2007).** Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest*, 19, 28-34.
- Houe H (1999).** Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol*, 64, 89-107.
- Hyera JMK, Liess B, Frey HR (1987).** A direct neutralising peroxidase linked antibody assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus, *J Vet Med*, 34, 227-229.
- Kahrs RF (2001).** Viral Diseases of Cattle. Second edition Blackwell Publishing, 120-121.
- Kul O, Kabakci N, Ozkul A, Kalender H, Atmaca HT (2008).** Concurrent peste des petits ruminants virus and pestivirus infection in stillborn twin lambs. *Vet Pathol*, 45,191-196.
- Lopez A (2007).** Respiratory Systems. Editors: McGavin, Zachary JF, Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4. Edition, Mosby Elsevier, 505-517.
- McGoldrick A, Bensaude E, Ibata G, Sharp G, Paton D J (1999).** Closed onetubereverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods*, 79, 85-95.
- Mogar R, Minoncha HC, Montpetit C, Carman PS, Lecomte J (1998).** Typing of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus reference and Canadian field strains using a neutralising monoclonal antibody, *Can J Vet Res*, 52, 42-45.
- Nettleton PF (1990).** Pestivirus infections in ruminants other than cattle, *Revue Scientifique et Technique de OIE*, 9, 131.
- Odeón AC, Kelling CL, Marshall DJ, Estela ES, Dubovi EJ, Donis RO (1999).** Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93), *J Vet Diagn Invest*, 11, 221-228.
- Oguzoglu TC, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Bilge-Dagalp S, Karaoglu T, Ozkul A, Alkan F, Burgu I, Haas L, Greiser-Wilke I (2009).** Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Vet Microbiol*, 135, 374-379.
- Oğuzoğlu TÇ, Muz D, Yılmaz V, Timurkan MÖ, Alkan F, Akça Y, Burgu I (2012).** Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: approaches for an eradication programme. *Transbound Emerg Dis*, 59, 303-310.
- Potgieter LND, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD, Guy JS (1984).** Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*, 45, 1582-1585.
- Reggiardo C, Kaeberle ML (1981).** Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus, *Am J Vet Res*, 42, 218-221.
- Ridpath JF, Bolin SR (1998).** Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoeavirus (BVDV) by PCR, *Mol Cell Probes*, 12, 101-106

- Sandvik T (2005).** Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes, *Prev Vet Med*, 72, 3-16.
- Shahriar FM, Clark EG, Janzen E, West K, Wobeser G (2002).** Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia, *Can Vet J*, 43, 463-468.
- Stott EJ, Thomas LH, Collins AP ve ark. (1980).** A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease, *J Hyg*, 85, 257-270.
- Tan MT, Karaoğlu T, Erol N ve Yıldırım Y (2006).** Serological and virological investigations of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın province, *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 299-304.
- Toplu N, Oguzoglu TÇ, Epikmen ET, Aydogan A (2011).** Neuropathologic study of border disease virus in naturally infected fetal and neonatal small ruminants and its association with apoptosis. *Vet Pathol*, 48, 576-583.
- Toplu N, Oğuzoğlu TÇ, Albayrak H (2012).** Dual infection of foetal and neonatal small ruminants with border disease virus and peste des petits ruminants virus (PPRV): neuronal tropism of PPRV as a novel finding. *J Comp Pathol*, 116, 289-296.
- Vilček S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ (1994).** Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virology*, 136(3-4), 309-323.
- Wilhelmsen CL, Bolin SR, Ridpath JF ve ark. (1990).** Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves, *Vet Pathol*, 27, 235-243.
- Wilhelmsen CL, Bolin SR, Ridpath JF, Cheville FN, Kluge JP (1991).** Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea, *Am J Vet Res*, 52, 269-275.
- Yazıcı Z, Okur Gümüşova S, Albayrak H (2007).** Serological profile of some viral infections in unvaccinated cattle in Turkey, *Medycyna Wet*, 63 (2), 187-189.
- Yeşilbağ K, Förster C, Özyiğit MÖ ve ark. (2014).** Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia, *Vet Microbiol*, 169, 42-49.
- Yıldırım Y, Burgu İ (2005).** Kuzeydoğu Anadolu bölgesindeki sığırlarda mavi dil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD enfeksiyonlarının seroprevalansı, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52, 113-117.