



## Erzurum Yöresi Sığırlarında Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)'un Varlığının İmmunohistokimyasal Yöntemle Araştırılması\*

Gökşad Cemil KOTAN<sup>1a</sup>, Mustafa ÖZKARACA<sup>1b</sup>✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.  
ORCID: 0000-0001-7064-917X<sup>a</sup>, 0000-0002-6359-6249<sup>b</sup>

| Geliş Tarihi/Received | Kabul Tarihi/Accepted | Yayın Tarihi/Published |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 28.11.2018            | 28.03.2019            | 25.10.2019             |

**Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:**  
**Kotan GC, Özkara M:** Erzurum Yöresi Sığırlarında Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)'un Varlığının İmmunohistokimyasal Yöntemle Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(2): 170-175, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.489006

**Öz:** Bu çalışmada Erzurum ve yöresindeki sığırlarda Bovine Viral Diarrhea Virus ile enfekte sığırların immunohistokimyasal olarak teşhisine yönelik epidemiyolojik bir çalışma yapılması amaçlanmıştır. Irk, cinsiyet, ağırlık vb. ayrımı yapılmadan kesimi gerçekleştirilen 100 adet sığır'dan alınan ileum örnekleri immunohistokimyasal incelemeye tabi tutuldu. Makroskopik olarak herhangi bir patolojik bulgu göstermeyen örneklerin immunohistokimyasal incelemelerinde %27 oranında Bovine Viral Diarrhea viral antijeni tespit edildi. Pozitif olarak tespit edilen örneklerin tamamında lamina propria'da BVDV viral antijenleri tespit edildi. Belirlenen immunpozitiflikler lamina propria'nın villuslara yakın kısmında ve kriptler ile peyer plakları arasındaki yangısal hücre infiltrasyonlarında intrasitoplazmik olarak bulunmaktaydı. Ayrıca 21 örnekte peyer plaklarındaki lenfoid hücrelerde, 19 örnekte lamina epitelyalis'te, 14 örnekte ise kript epitellerinde Bovine Viral Diarrhea Virus immunpozitifliği belirlendi. Sonuç olarak; Bovine Viral Diarrhea Virus'un immunohistokimyasal olarak teşhisine yönelik Erzurum ve yöresinde epidemiyolojik bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile Erzurum ve yöresinde sığırlarda %27 oranında Bovine Viral Diarrhea Virus immunpozitifliği bulunmuş ve sığır yetiştiriciliği açısından önemli bir etken olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** BVDV, İleum, İmmunohistokimya, Sığır.

## Immunohistochemical Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Cattle in Erzurum Region

**Abstract:** Breed, sex, weight, etc. immunohistochemical examinations of the ileum specimens taken from 100 cattle breeding animals that had been cut without discrimination were subjected to microscopic, and immunohistochemical examinations. Bovine Viral Diarrhea Virus viral antigen was detected in 27% (27 samples) of immunohistochemical analysis of specimens without any pathological findings macroscopically. BVD viral antigens were detected in lamina propria in all of the samples identified as positive. BVDV immunopositivity was found intracytoplasmically in the section near the villus of the lamina propria and in the inflammatory cell infiltrations between the crypts and the peyer plaques. BVDV immunopositivity was determined in lymphoid cells in Peyer plaques in 21 samples, in lamina epithelialis in 19 samples and in crypt epithelium in 14 samples. As a conclusion, an epidemiological study has not been conducted for the immunohistochemical diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Virus in Erzurum and its region. In this study, BVDV immunopositivity was found in 27% of cattle in Erzurum and its region and it was determined that it was an important agent for cattle breeding.

**Keywords:** BVDV, Cattle, Ileum, Immunohistochemistry.

✉ Mustafa Özkaraca

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.  
e-posta: mustafa.ozkaraca@atauni.edu.tr

\*Bu makale "Erzurum Yöresi Sığırlarında Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)'un Varlığının İmmunohistokimyasal Yöntemle Araştırılması" isimli yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

**B**ovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Flaviviridae ailesinin, Pestivirus genusuna ait, rekombine olabilen bir RNA virusudur (1). BVDV kaynaklı enfeksiyonlar ilk kez 1946 yılında Olafson ve ark. tarafından tanımlanmıştır (2). Klinik olarak, ateş, gastroenteritis, diyare, ağızda lezyonlar ve lökopeni gibi belirtiler gösteren, persiste akut bir enfeksiyondur. Virüs iki hafta boyunca doğrudan temas, vücut salgıları veya kontamine aletler yoluyla bulaşabilir (3). Klinik olarak BVDV'nin oral ve/veya nasal olarak bulaşmasından sonra, etken primer olarak oropharynx bölgesinde çoğalmaya başlar (4). Oronazal mukoza epitellerinde, primer çoğalma sonucunda, mukozada ülser görülebilir. Etken daha sonra fagositik hücreler tarafından lenfoid dokulara taşınır (5). Vücudun tamamına yayılması viremi neticesinde ortaya çıkar ve bu süreç boyunca birkaç gün depresyon, ateş, ishal ve lökopeni tabloları ile karşılaşılabilir (6). Burun akıntısı, salya artışı, mukozalarda ülserler ve kript hücrelerinde ve bağırsak lenfoid dokularında nekrozlar ortaya çıkar. Persiste enfeksiyon olarak seyrettiği durumlarda ise abortlara, fötusta gelişim yetersizliği ve defektlere neden olmaktadır (7).

BVDV'nin teşhisinde Peroksidaz Linked Antibody (PLA) (8), Direkt Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) (9), Immunofloresan Test (IF) (10), ve Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) (11) testleri kullanılabilir. Serolojik teşhis için ise Virus Nötralizasyon Test (VNT) (12) ve Nötralizasyon Peroksidaz Linked Antibody (NPLA) (13) testleri mevcuttur.

Bu çalışma ile Erzurum ve yöresindeki sığırlarda BVDV'nin, serolojik çalışmalardan farklı olarak, özellikle persiste enfekte sığırlarda immunohistokimyasal olarak teşhisine yönelik epidemiyolojik bir çalışma yapılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

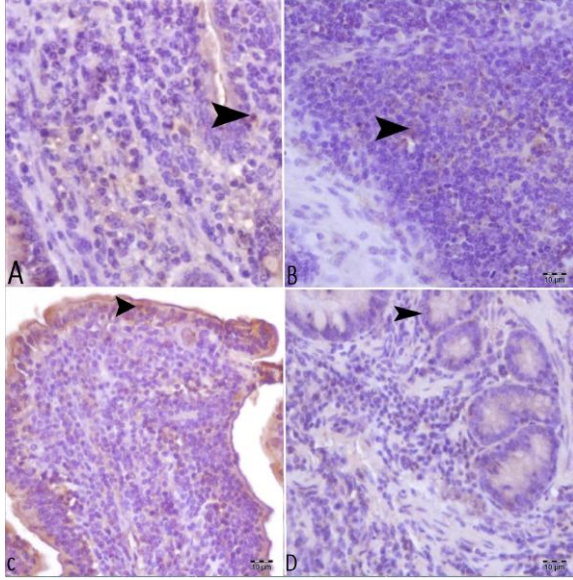
Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Alt Kurulu tarafından onaylandı (Karar

Tarihi:31/08/2015, Sayısı: 2015/11). Çalışma materyalini Erzurum ilinde bir mezbahada 2015 Ekim-Aralık ayları arasında ırk, cinsiyet, ağırlık vb. ayrımı yapılmaksızın kesime alınan yetişkin sığırlardan alınan örnekler oluşturdu. Bu amaçla makroskopik olarak herhangi bir patolojik bulgu göstermeyen 100 ileum örneği toplandı. Alınan ileum örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Rutin işlemlerden geçirilen dokular parafin bloklara alındı. Bloklardan 5 µ kalınlığında alınan kesitler normal ve polilizinli lamlara alındı. Boyama; Streptavidin-Biotin Kompleks metoduna göre ilgili firmanın önerdiği şekilde yapıldı (LSAB+ System- HRP, DAKO Carpinteria, USA). Bu amaçla polilizinli lamlara alınan 5 µm' lik kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Kesitler Phosphate Buffer Solution (PBS) ile yıkandıktan sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak amacıyla antijen retrieval solüsyonu (Abcam, Katalog no. ab93678) ile mikrodalga fırında 2x5 dk 500 watt' da muamele edildi. PBS ile yıkanan dokular Anti-BVD anti-serumu (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 antikör ve Streptavidin-HRP'de 15'er dk bekletildi. Kromojen olarak 3,3 diaminobenzidine kullanıldı. Daha sonra Mayer's Hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Kesitler üzerine entellan damlatılarak ışık mikroskopunda BVDV viral antijenleri var (+), yok (-) olarak incelendi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile BVDV pozitifliği konfirme edilmiş parafin bloktaki akciğer örneği pozitif kontrol olarak kullanıldı.

## BULGULAR

İmunohistokimyasal olarak boyaması yapılan 100 ileum örneğinin 27' sinde (%27) BVDV viral antijenleri tespit edildi. Pozitif olarak tespit edilen örneklerin tamamında lamina propria'da BVDV viral antijenleri tespit edildi. Belirlenen immunpozitiflikler

lamina propria'nın villuslara yakın kısmında ve kriptler ile payer plakları arasındaki yangısal hücre infiltrasyonlarında intrasitoplazmik olarak bulunmaktaydı. Ayrıca 21 örnekte peyer plaklarındaki lenfoid hücrelerde, 19 örnekte lamina epitelyalistе, 14 örnekte ise kript epitellerinde BVDV immunpozitifliği belirlendi (Şekil 1).



**Şekil 1.** A, Lamina propria'da villuslara yakın bölgedeki yangısal hücrelerde, B, Peyer plaklarındaki lenfoid hücrelerde, C, Lamina epitelyalis' te, D, Kript epitel hücrelerinde BVDV immunpozitifliği (ok başı). IHC.

**Figure 1.** A, BVDV immunopositivity in inflammatory cells in the region close to the villi in the lamina propria B, in lymphoid cells in Peyer's plaques, in lamina, C, in lamina epithelialis, D, in cript epithelia cells (arrowhead). IHC.

#### TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığırlar arasında geniş bir yayılım gösteren BVDV ile hayvanların büyük bir çoğunluğu yaşamlarının ilk yılında etken ile karşılaşmaktadır (14) Ülkemizde BVDV'un varlığı ile ilgili olarak çeşitli çalışmalar yapılmış olup bunlar ağırlıklı olarak serolojik özelliktedir (15-21).

Yapılan bu çalışmalar neticesinde, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde %96.8 (15), Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde %81.62 (16), Aydın Yöresinde %86 (17), Samsun, Sivas, Tokat illerini

kapsayan bölgede %20.19 (18), Muğla yöresinde %49.9 (20), Konya ve çevresinde %90.63 (21), Afyonkarahisar'da %84.6 (19) oranlarında seropozitiflik bulunmuştur. Sunulan çalışmada ise sığırlar ince bağırsaklarında BVDV'un (100/27) %27 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum önceki yapılan çalışmaların serolojik özellikte olması ve kullanılan yöntemlerin farklılığı ile ilişkilendirilmiştir.

Gebelikte BVDV'a maruz kalan fötüs yaşamaya devam ederse virusa karşı bir tolerans geliştiği ve ömür boyu enfekte kaldığı bildirilmiştir. Böyle buzağlarda virusa karşı immun yanıt olmamaktadır. Bu tür hayvanlar etrafa sürekli virus saçabilmektedir. Bu durum persiste tolerant enfeksiyon olarak tanımlanmış olup, sürüdeki duyarlı diğer sığırlara etkenin bulaştırılmasında önemli rol oynamaktadırlar (22,23). Sunulan çalışmada pozitif olguların tespit edildiği sığırların ince bağırsaklarında herhangi bir makroskopik lezyon göstermemesi persiste enfeksiyon olabilme durumunu düşündürmüştür.

Etkenin teşhisine yönelik çeşitli virüs izolasyonu, immunohistokimya gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (24-26). Immunohistokimyasal boyamanın virüs izolasyonuna göre daha hızlı ve ekonomik bir yöntem olduğu bildirilmiştir (27-29). Bazler ve ark. (30) ise immunohistokimyasal yöntemin, gaita ve taze dokuda virüs izolasyonuna göre teşhiste daha güvenilir bir yöntem olduğunu iddia etmişlerdir (30). Immunohistokimyasal yöntem daha çok persiste hayvanları belirlemek için deri biyopsisi örneklerinde kullanılmıştır (24,26,27-29). Fakat bu yöntemin persiste hayvanları belirlemede yeterli olamayacağı da düşünülmektedir. Çünkü Libler-Tenorio, Ridpath ve Neill (23) yaptıkları bir çalışmada BVDV inoküle edilmiş hayvanlarda etkeni lenfoid dokularda ve bağırsaklarda tespit ederken, deride etkeni tespit edememişlerdir (31).

İmunohistokimyasal olarak yapılan önceki çalışmalarda BVDV viral antijenlerinin bağırsağın mukozasında, kan damarlarında, bağ dokusunda, histiyositlerinde, peyer plaklarında, interfolliküler alanlarında, myositlerinde olduğu bildirilmiştir (7,31-

34). Wilhemsen ve ark. (32) deneysel olarak sağlıklı yetişkin 8 sığıra BVDV'yi vererek 5-12 gün arasında nekropsilerini yapmışlar immunohistokimyasal olarak antijenlerin dağılımını incelemişlerdir. Immunohistokimyasal olarak ise etkene akciğer lenf yumruları gibi organlara ilave olarak ileum ve kolondaki mononükleer hücrelerde intrasitoplazmik olarak olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir (32). Ellis ve ark. (34) ise 35 günlük buzağılara BVDV vererek 10. günden sonra nekropsilerin yapmışlar ve bağırsaklardaki kan damarlarında ve peyer plaklarında BVDV antijenlerine rastlamışlardır (34). Liebler-Tenorio ve ark. (31) yaşları 3 hafta ile 3 ay arasında değişen 13 buzağıya BVDV inoküle ederek deneysel bir çalışma yapmışlardır. Persiste hayvanlarda makroskobik olarak herhangi bir bulguya rastlamazken, BVDV 'u immunohistokimyasal olarak bağırsağın ileum kısmındaki peyer plaklarında, submukozada, kan damarlarının duvarlarında, interfolliküler alanlarda, myositlerde, lamina propria'daki mononükleer hücrelerde ve epitel hücrelerinde tespit etmişlerdir (32). Sunulan çalışmada da benzer şekilde BVDV immunpozitif olarak tespit edilen örneklerde viral antijenlere 27 örneğin tamamında lamina propria'da, 21'inde peyer plaklarındaki lenfoid hücrelerde, 19'unda lamina epitelyalis' te, 14'ünde ise kript epitel hücrelerinde rastlanmıştır. Viral antijenlerin kan damarlarının duvarlarında, interfolliküler alanlarda tespit edilememesi ise önceki yapılmış olan çalışmaların daha çok deneysel, kısa süreli ve viral antijen miktarı ile ilişkilendirilmiştir.

Sonuç olarak; BVDV'nin immunohistokimyasal olarak teşhisine yönelik Erzurum ve yöresinde epidemiyolojik bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile Erzurum ve yöresinde sığırlarda %27 oranında BVDV immunpozitifliği bulunmuş ve sığır yetiştiriciliği açısından verim kaybı, döl veriminde kayıplara neden olabileceğinden dolayı önemli bir etken olduğu belirlenmiştir.

#### Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

#### KAYNAKLAR

1. Lindenbach BD., Rice C., 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virol*, 1, 991-1041.
2. Olafson P., MacCallum A., Fox FH., 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *The Cornell Veter*, 36, 205-213.
3. Moennig V., Houe H., Lindberg A., 2005. BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim Health Res Rev*, 6, 63-74.
4. Straub OC., 1975. Infectious bovine rhinotracheitis virus. History and recent developments. *Dev Biol Stand*, 28, 530-533.
5. Ohmann HB., 1983. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res Vet Sci*, 34, 5-10.
6. Harkness J., Sands J., Richards M., 1978. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res Vet Sci*, 24, 98-103.
7. Odeon 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.
8. Drager C., Schröder C., König P., Tegtmeyer B., Beer M., Blome S., 2016. Efficacy of Suvaxyn CSF Marker (CP7\_E2alf) in the presence of pre-existing antibodies against Bovine viral diarrhoea virus type 1. *Vaccine*, 34, 4666-4671.
9. Zhang X., Diraviyam T., Li X., Yao B., Antonysamy M., 2016. Preparation of chicken IgY against recombinant E2 protein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and development of ELISA and ICA for BVDV detection. *Biosci Biotechnol Biochem*, 80, 2467-2472.
10. Villalba M., Fredericksen F., Otth C., Olavarria V. 2016. Transcriptomic analysis of responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus-1 (BVDV-1) infection in MDBK cells. *Mol Immunol*, 71, 192-202.
11. Hertig C., Pauli U., Zanoni R., Peterhans E., 1991. Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus

- using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 26, 65-76.
12. Araujo Pereira D., Brigolin Peron J., de Souza Almeida HM., Gasparini Baraldi T., Honorato Gatto IR., Coelho Kasmanas T., Pituco EM., Montassier HJ., de Oliveira LG3. 2018. Experimental inoculation of gilts with bovine viral diarrhoea virus 2 (BVDV-2) does not induce transplacental infection. *Vet Microbiol*, 225, 25-30.
  13. Hyera J., Liess B., Frey H., 1987. A direct neutralizing peroxidase-linked antibody assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *Zentralbl Veterinarmed B*, 34, 227-239.
  14. Karaoglu T., 1998. Sahadanizole edilen bovine viral diarrhoea virus (BVDV) izolatlarının immunplak test ile biyotipik tayini. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 45, 323-332.
  15. Çabalar M., Karaoğlu M., 1999. Sığırlarda BVD virus enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında notralizasyon immunperoksidaz (NPLA) ve serum notralizasyon (SN) testlerinin karşılaştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 249-255.
  16. Yıldırım Y., Burgu İ., 2005. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesindeki sığırlarda mavdil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52, 113-117.
  17. Tan MT., Karaoğlu MT., Erol N., Yıldırım Y., 2006. Serological and virological investigations of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın province. *Turkish J Vet Anim Sci*, 30, 299-304.
  18. Yazıcı Z., Okur G., Albayrak H., 2007. Serological profile of some viral infections in unvaccinated cattle in Turkey. *Med Weter*, 63, 187-189.
  19. Nural E., Sibel G., Abuzer A., 2014. Afyonkarahisar İlinde bovine viral diarrhoea virus enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. *Kocatepe Vet J*, 7, 17-21.
  20. Şişman E., Akkan HA., 2011. Muğla İli ve çevresinde sığırcılık işletmelerinde bovine viral diyare virus (BVDV) enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
  21. Kayacan G., Yapıcı O., 2008. Konya ve çevresinde bulunan süt sığırcılığı işletmelerindeki hayvanlara ait kan ve süt serumlarında bovine viral diarrhoea virus (BVDV)'una karşı oluşan antikorların elisa ile araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi.
  22. Strong R., La Rocca SA., Paton D., Bensaude E., Sandvik T., Davis L., Turner J., Drew T., Raue R., Vangeel I., Steinbach F. 2015. Viral dose and immunosuppression modulate the progression of acute BVDV-1 infection in calves: Evidence of long term persistence after intra-nasal infection. *PLoS One*, 8, e0124689.
  23. Ridpath JF., Bayles DO., Neill JD., Falkenberg SM., Bauermann FV., Holler L., Braun LJ., Young DB., Kane SE., Chase CC., 2015. Comparison of the breadth and complexity of bovine viral diarrhoea (BVDV) populations circulating in 34 persistently infected cattle generated in one outbreak. *Virology*, 485, 297-304.
  24. Brodersen B., White A., Smith D., 1998. In Immunohistochemical test on skin biopsies as a method for detection of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, American Association of Bovine Practitioners. Conference (USA),
  25. Thür B., Zlinszky K., Ehrensperger F., 1996. Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. *Zentralbl Veterinarmed B*, 43, 163-166.
  26. Bianchi MV., Konradt G., de Souza SO., Bassuino DM., Silveira S., Mosena AC., Canal CW., Pavarini SP., Driemeier D. 2017. Natural outbreak of BVDV-1d-induced mucosal disease lacking intestinal lesions. *Vet Pathol*, 54, 242-248.
  27. Hilbe M., Stalder H., Peterhans E., Haessig M., Nussbaumer M., Egli C., Schelp C., Zlinszky K., Ehrensperger F., 2007. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral

- diarrhea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest*, 19, 28-34.
28. Houe H., Lindberg A., Moennig V., 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest*, 18, 427-436.
  29. Luzzago C., Frigerio M., Tolari F., Mazzei M., Salvadori C., Del Piero F., Arispici M., 2006. Indirect immunohistochemistry on skin biopsy for the detection of persistently infected cattle with bovine viral diarrhoea virus in Italian dairy herds. *New Microbiol*, 29, 127-131.
  30. Baszler T., Evermann J., Kaylor P., Byington T., Dilbeck P., 1995. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 32, 609-618.
  31. Liebler-Tenorio EM., Ridpath JF., Neill JD., 2004. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 16, 388-396.
  32. Wilhelmsen C., Bolin S., Ridpath J., Cheville N., Kluge J., 1990. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves. *Vet Pathol*, 27, 235-243.
  33. Shin T., Acland H., 2001. Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *J Vet Sci*, 2, 81-84.
  34. Ellis JA., West KH., Cortese VS., Myers SL., Carman S., Martin KM., Haines DM., 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.