

PEWARNAAN *IMMUNOPEROXIDASE (IPX)* PADA BIAKAN SEL *MADIN-DARBY BOVINE KIDNEY (MDBK)* SEBAGAI SALAH SATU UPAYA UNTUK MENDAPATKAN ISOLAT LOKAL VIRUS *BOVINE VIRAL DIARRHEA (BVD)*

Suryo Purnomo Edi, Lukman, Afif Ibrahim, Trian Mahawan, Sodorun

Balai Veteriner Subang
email : spurnomo.e@gmail.com

ABSTRAK

Bovine Viral Diarrhea (BVD) adalah salah satu penyakit viral yang dapat menurunkan reproduksi dan produktifitas pada sapi. Berdasarkan pengujian secara laboratoris, penyakit BVD telah menjangkiti sapi-sapi di wilayah kerja Balai Veteriner Subang. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat lokal asal Provinsi Jawa Barat. Sebanyak 9 serum sapi yang pada pengujian sebelumnya menggunakan *Antigen Capture ELISA (ACE)* dinyatakan positif antigen virus BVD, digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. Sampel berasal dari Provinsi Jawa Barat yang diambil pada tahun 2016 dan 2017. Sampel diinokulasikan ke biakan sel *Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)*. Pewarnaan *Immunoperoxidase (IPX)* digunakan untuk menentukan adanya infeksi virus BVDV pada biakan sel *MDBK*. Sebagai uji konfirmasi digunakan metode *polymerase chain reaction (PCR)*. Dari 9 sampel yang diuji didapatkan 2 sampel positif *BVD* dan juga menjadi isolat lokal virus *BVD*. Penerapan metode isolasi virus *BVD* di Balai Veteriner sangatlah penting mengingat metode tersebut menurut OIE merupakan *gold standard* pengujian diagnostik terhadap *BVD*. Isolat lokal virus *BVD* tersebut selanjutnya perlu dikarakterisasi lebih lanjut dan dapat digunakan sebagai bahan biologis untuk lebih memahami virus *BVD* yang bersirkulasi di Indonesia.

Kata kunci : *BVD*, isolat lokal, *IPX*, *gold standard*

PENDAHULUAN

Salah satu program yang sedang dijalankan oleh Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan pada tahun 2018 adalah Upaya Khusus Sapi Indukan Wajib Bunting (UPSUS SIWAB). Untuk mencapai keberhasilan terhadap program tersebut, dibutuhkan sapi dengan status reproduksi yang baik. Adanya gangguan reproduksi pada sapi tentunya akan mengganggu jalannya program UPSUS SIWAB. Gangguan reproduksi pada sapi dapat bersifat menular dan tidak menular (Beveridge, 1983). Adanya penyakit reproduksi yang bersifat menular akan memberi dampak sangat luas pada peternakan di Indonesia.

Beberapa penyakit reproduksi menular yang telah terdeteksi pada sapi – sapi khususnya pada sapi potong di Indonesia adalah Brucellosis, Leptospirosis, Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bovine Viral Diarrhea (BVD), Bluetongue dan Toxoplasmosis (Adjid, 2004). Salah satu penyakit reproduksi menular yang perlu diwaspadai adalah BVD, karena selain menimbulkan gangguan reproduksi dapat pula menimbulkan immunosupresif sehingga terjadi infeksi sekunder (Houe, 1999). Adanya infeksi BVD menimbulkan kerugian ekonomi yang signifikan sektor terhadap peternakan.

Hal utama yang perlu diwaspadai pada infeksi virus BVD adalah adanya infeksi persiten (IP). Sapi dengan IP menjadi sumber penularan virus BVD di dalam suatu peternakan. Sapi IP akan mengeluarkan virus sepanjang hidupnya yang akan menyebabkan infeksi virus BVD akan tetap ada di peternakan tersebut (Lanyon *et al.*, 2014). Virus BVD terbagi dalam dua biotipe, yaitu *non-cytopathogenic* (NCP) and *cytopathogenic* (CP), berdasarkan efeknya pada kultur sel (Gamlen *et al.*, 2010). Adanya virus BVD dengan biotipe NCP dalam suatu peternakan dapat menjadi salah satu tanda bahwa di peternakan tersebut terdapat sapi dengan IP. Karena sumber penularan virus BVD NCP adalah sapi IP (Brownlie, 1990). Program untuk mengendalikan infeksi BVD sebagian besar adalah dengan menghilangkan sapi IP pada suatu peternakan (Linberg dan Alenius, 1999).

Untuk mengetahui adanya infeksi virus BVD pada sapi diperlukan pengujian diagnostik yang mampu mendeteksi infeksi virus atau mampu mendeteksi adanya antigen spesifik terhadap virus BVD dan juga pengujian yang mampu mendeteksi adanya antibodi spesifik terhadap virus BVD (Saliki dan Dubovi, 2004). Sebagai laboratorium kesehatan hewan tingkat nasional, Balai Veteriner dituntut mampu mendeteksi adanya infeksi virus BVD dengan berbagai jenis pengujian diagnostik. Metode pengujian diagnostik yang menjadi *gold standard* menurut OIE adalah isolasi virus BVD. Selama ini yang metode pengujian diagnostik yang sudah diterapkan di Balai Veteriner Subang adalah RT-PCR, ELISA untuk mendeteksi antigen spesifik terhadap virus BVD dan ELISA untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik terhadap BVD. Untuk melengkapi pengujian diagnostik terhadap penyakit BVD maka Balai Veteriner Subang mencoba menerapkan pengujian isolasi terhadap virus BVD.

TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kemampuan pengujian diagnostik di Balai Veteriner Subang yaitu dengan melakukan isolasi dan identifikasi virus BVD. Dengan menerapkan metode isolasi dan identifikasi virus BVD maka diharapkan akan mendapatkan isoalat lokal virus BVD asal Provinsi Jawa Barat. Isolat yang akan didapat akan diketahui biotipenya sehingga akan membantu untuk lebih memahami karakter virus BVD yang bersirkulasi di Provinsi Jawa Barat.

MATERI DAN METODE

Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel serum sapi yang positif terhadap antigen spesifik BVD (ELISA) dari tahun 2016 dan 2017 asal Provinsi Jawa Barat. Kontrol positif virus BVD *CP* menggunakan isolat BVD strain Singer dan kontrol positif virus BVD *NCP* menggunakan isolat BVD 0475-WI.

Tabel 1. Rincian sampel penelitian.

No.	ID sampel	Tahun
1	0816399/046	2016
2	0816339/047	2016
3	0816439/007	2016
4	0816439/010	2016
5	0816627/179	2016
6	0817381/053	2017
7	0817529/008	2017
8	0817542/005	2017
9	0817545/112	2017

Isolasi virus

Untuk mengisolasi virus BVD pada penelitian ini digunakan sel lestari yaitu *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK). Sel MDBK dikultur menggunakan Minimum Essential Medium Eagle SIGMA (cat M4655) dengan suplemen horse serum Gibco® (cat 16050-122). Serum sampel Sebanyak 25 µl dimasukkan ke dalam empat sumuran dari 96-well tissue culture microplate. Kemudian tambahkan 100 µl suspense sel MDBK dengan konsentrasi 150.000 sel/ml. Mikroplat kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C dengan CO₂ 5% selama empat hari. Amati secara mikroskopis adanya sitopatologi. Setelah empat hari kultur sel dibekukan ke dalam -80°C dan sebanyak 50 µl supernatant dari cairan kultur sel tersebut dilintaskan (*passaged*) ke kultur sel yang baru. Ulangi kultur sebanyak tiga kali.

Pewarnaan IPX

Reagen yang digunakan untuk pewarnaan *immunoperoxidase* (IPX) adalah sebagai berikut : Tween® 20 Merck (cat 8.22184.0500) sebagai bahan PBST untuk pencucian, BVDV 1-2 MAb VMRD (cat 348) sebagai antibodi primer, Goat Anti-Mouse (H+L) HRP Conjugate BIO-RAD (cat 170-6516) sebagai antibodi sekunder, 3-Amino-9-ethyl-carbazole SIGMA (cat A6926-100TAB) sebagai substrat. Langkah-langkah pewarnaan IPX yaitu, mikroplat yang sudah diinfeksi dengan serum sampel kemudian difiksasi dengan 20% aseton. Mikroplat kemudian dicuci dengan PBS. Buang cairan PBS lalu tambahkan 50 µl antibodi primer ke masing-masing sumuran. Mikroplat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Setelah inkubasi kemudian mikroplat dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali. Buang cairan PBST kemudian tambahkan 50µl antibodi sekunder ke masing-masing sumuran. Mikroplat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Setelah inkubasi kemudian mikroplat dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali. Buang cairan PBST kemudian tambahkan 100µl substrat ke masing-masing sumuran. Mikroplat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Mikroplat kemudian

diamati menggunakan mikroskop inverted. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya presipitat berwarna merah pada sitoplasma kultur sel MDBK.

RT-PCR

Cairan kultur sel diekstraksi menggunakan Rneasy® Mini Kit (250) Qiagen (cat 74106). Kemudian master mix menggunakan QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (cat 210210). Langkah-langkah ekstraksi dan master mix sesuai dengan instruksi manual dari masing-masing kit yang digunakan. 5' *untranslated region (UTR)* dari isolate virus kemudian diamplifikasi menggunakan metode RT-PCR menggunakan primer 324-326 (Vilcek *et al.*, 1994).

Tabel 2. Desain primer 324-326 (Vilcek *et al.*, 1994).

Primer	Sequence	Produk
324	5' ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3'	285 bp
326	5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3'	

HASIL

Dari sembilan sampel dengan perincian lima sampel berasal dari tahun 2016 dan empat sampel berasal dari tahun 2017 yang diuji, sejumlah dua sampel menunjukkan hasil positif pada pewarnaan *immunoperoxidase (IPX)*. Hasil yang sama ditunjukkan oleh pengujian RT-PCR (Tabel. 3).

Kedua sampel positif tersebut adalah 0816627/179 berasal dari tahun 2016 dan 0817545/112 berasal dari tahun 2017. Kedua sampel positif merupakan BVD dengan biotipe *non cytopathogenic (NCP)*.

Tabel 3. Hasil pengujian dengan pewarnaan *immunoperoxidase (IPX)* kemudian dikonfirmasi dengan pengujian RT-PCR. Keterangan : (-) : Negatif, (+) : Positif, NCP : *non cytopathogenic*.

No	ID sampel	Tahun	IPX	RT-PCR	Biotipe
1	0816399/046	2016	-	-	
2	0816339/047	2016	-	-	
3	0816439/007	2016	-	-	
4	0816439/010	2016	-	-	
5	0816627/179	2016	+	+	NCP
6	0817381/053	2017	-	-	
7	0817529/008	2017	-	-	
8	0817542/005	2017	-	-	
9	0817545/112	2017	+	+	NCP

PEMBAHASAN

Virus *Bovine Viral Diarrhea* termasuk dalam genus *Pestivirus* dan family *Flaviviridae* (Becher dan Thiel, 2011). Untuk mengetahui adanya BVD dalam suatu peternakan sapi dibutuhkan pengujian diagnostic yang akurat, efisien dan efektif. Saat ini sudah tersedia berbagai macam pengujian untuk mendeteksi virus BVD, antigennya maupun antibodinya. Hasil dari pengujian diagnostik tersebut akan bervariasi tergantung status infeksi dari virus BVD pada saat ini ataupun kejadian yang telah lalu (Lanyon *et al.*, 2014).

Isolasi virus menjadi *gold standard* untuk diagnosis virus BVD. Akan tetapi saat ini penggunaan RT-PCR lebih sering digunakan dan telah diterima sebagai standard untuk diagnosis terhadap virus BVD (Herting *et al.*, 1991). RT-PCR lebih disukai daripada isolasi virus karena menghemat waktu pengujian, lebih murah, tidak membutuhkan fasilitas untuk kultur sel dan memiliki sensitivitas yang tinggi (Kim dan Dubovi, 2003). Pengujian diagnostik terhadap virus BVD terus berkembang dan mengalami kemajuan. Saat ini telah tersedia beberapa komersial kit *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mendeteksi antigen BVD pada beberapa sampel seperti serum, susu dan potongan telinga (*ear notches*). Pengujian dengan ELISA sangat simpel, menghemat biaya, tidak memerlukan fasilitas sel kultur dan tidak terpengaruh terhadap lamanya penyimpanan sampel (Saliki dan Dubovi, 2004).

Immunohistochemistry (IHC) adalah salah satu metode yang populer untuk mendeteksi adanya antigen BVD di Amerika Serikat. IHC sangat cocok untuk sampel dalam jumlah yang banyak. Akan tetapi memiliki beberapa kekurangan yaitu sampel yang digunakan hanya terbatas pada sampel jaringan, membutuhkan tenaga kerja yang intensif bekerja, rentan terhadap kesalahan teknis, penilaiannya secara subyektif, membutuhkan tenaga yang berpengalaman untuk menjamin keakurasian hasil pengujian (Driskell dan Ridpath, 2006).

Untuk mengetahui lebih lanjut terhadap status infeksi BVD di suatu peternakan dibutuhkan metode pengujian diagnostik yang komprehensif. Untuk itu laboratorium pengujian penyakit hewan perlu menguasai berbagai macam teknik pengujian diagnostik terhadap virus BVD. Isolasi virus menjadi salah satu pengujian yang penting dalam mendiagnosis BVD. Dengan isolasi virus kita akan mendapatkan isolat virus yang akan dapat digunakan sebagai bahan biologis untuk lebih memahami virus BVD yang bersirkulasi di Indonesia. disamping itu pula dengan isolasi virus kita akan mengetahui biotipe dari isolat virus BVD.

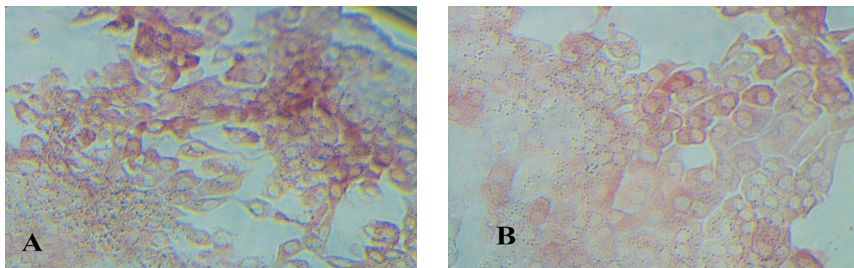
Biotipe virus BVD sangat penting untuk diketahui. Biotipe virus BVD ada dua, yaitu *non-cytopathogenic* (NCP) dan *cytopathogenic* (CP). Biotipe tersebut berdasarkan efek yang ditimbulkan oleh virus BVD pada kultur sel. CP akan menimbulkan apoptosis pada kultur sel sedangkan NCP tidak (Gamlen *et al.*, 2010). Pada penelitian kali ini didapatkan isolat virus BVD dengan biotipe NCP (Tabel. 3). Hasil isolasi kemudian dikonfirmasi dengan pengujian RT-PCR terhadap virus BVD menunjukkan hasil yang sesuai (Gambar. 2). Adanya virus BVD NCP menunjukkan bahwa di peternakan sapi tersebut terdapat sapi dengan infeksi persisten (IP) karena sumber penularan dari virus BVD NCP adalah sapi IP (Browlie, 1990). Virus BVD NCP menjadi penyebab infeksi akut dan dapat ditularkan melalui berbagai macam cairan tubuh seperti leleran hidung, urin, susu, semen, air liur, air mata dan cairan ketuban (Meyling *et al.*, 1990). Pada sapi yang tidak bunting dan tidak memiliki imunitas terhadap virus BVD, NCP BVD akan menyebabkan infeksi akut, menimbulkan viremia hingga antibodi terbentuk (Howard, 1990). Infeksi akut akan berdampak pula pada sistem reproduksi yang akan menyebabkan turunnya *conception rates* (Mc Gowan *et al.*, 1993), aborsi dan kelainan kongenital (Sprecher *et al.*, 1991). Pada sapi pejantan akan menyebabkan penurunan densitas dan motilitas serta akan meningkatkan abnormalitas sperma (Paton *et al.*, 1989). Infeksi pada sapi betina bunting setelah hari ke tigapuluh dan selama trimester pertama kebuntingan akan melahirkan pedet dengan IP (Brownlie *et al.*, 1998). Infeksi antara 80-150 hari kebuntingan akan menyebabkan kelainan teratogenik terhadap fetus (Brown *et al.*, 1974). Sapi indukan non-IP yang membawa fetus dengan IP dikenal sebagai sapi “Trojan”. Induk tersebut nampak kebal terhadap virus BVD dan nampak sehat, pada kenyataannya menyimpan sumber potensi infeksi virus yaitu di dalam pedet yang belum lahir. Sekali pedet itu lahir maka akan menyebarkan virus BVD dalam jumlah besar (Brownlie *et al.*, 1998).

Untuk memvisualisasikan adanya virus BVD pada kultur sel diperlukan teknik *immunostaining*. *Immunostaining* merupakan bagian dari imunositokimia (*Immunocytochemistry/ ICC*). Imunositokimia didefinisikan sebagai identifikasi adanya antigen yang terikat dengan sel atau jaringan secara *in situ*, melalui reaksi spesifik antara antigen dan antibodi. Keuksesan imunositokimia dikarenakan beberapa factor yaitu : preservasi dari bentuk antigen yang dapat dikenali oleh antibodi, pemakaian antibodi yang sesuai, serta pemilihan label yang tepat (Brooks, 2001).

Pada penelitian kali ini digunakan antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal yang digunakan adalah immunoglobulin G anti virus BVD yang diproduksi pada tikus. Antibodi monoklonal memiliki kelebihan yaitu spesifitasnya yang absolut yang berarti hasil pelabelannya sangat bersih. Monoklonal antibodi biasanya didapat dari tikus atau mencit, mewakili immunoglobulin yang diproduksi dari satu klon sel immortal yang diarahkan pada stu epitop saja (Brooks, 2001).

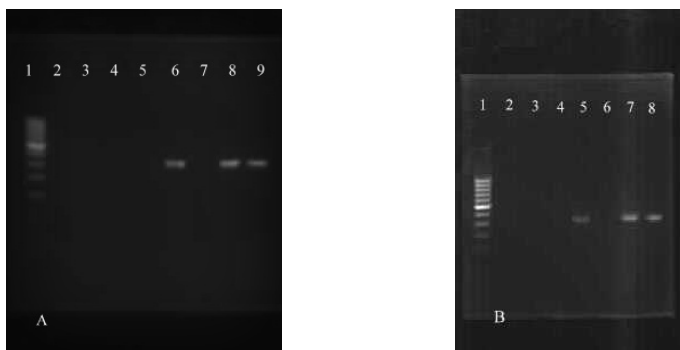
Hal yang penting pada metode ICC adalah deteksi ikatan antigen dan antibodi akan berikatan dengan antibodi sekunder. Antibodi sekunder yang dipakai harus sesuai dengan antibodi primer. Sebagai contoh bila yang digunakan sebagai antibodi primer adalah IgG dari tikus maka antibodi sekunder yang digunakan adalah antibodi anti IgG tikus. Apabila yang digunakan sebagai antibodi sekunder adalah anti IgM tikus maka tidak akan sesuai. (Brooks, 2001). Pada penelitian ini digunakan antibodi sekunder anti IgG tikus yang dilabel dengan *Horse Radish Peroxidase (HRP)*. Maka antibodi sekunder tersebut akan berikatan dengan antibodi primer yang digunakan.

Label enzim yang paling umum digunakan adalah *Horse Radish Peroxidase (HRP)* dan alkali fosfatase. Saat ini banyak tersedia antibodi primer dan sekunder dan reagen imunositokimia lainnya yang diberi label dengan senyawa-senyawa ini. Prinsipnya menggunakan label enzim apa pun adalah bahwa reaksi label enzim dengan substrat ditambah kromogen yang larut akan menghasilkan produk berwarna yang mengendap atau yang tidak larut sehingga dapat terlihat oleh mikroskop cahaya. Untuk reaksi *Horse Radish Peroxidase (HRP)* dengan hidrogen peroksida plus kromogen 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) menghasilkan presipitat merah seperti yang ditunjukkan pada gambar 1 (Graham *et al.*, 1965).



Gambar 2. Hasil pewarnaan *immunoperoxidase (IPX)* dengan perbesaran 400X menunjukkan hasil positif terlihat adanya distribusi antigen BVD pada sitoplasma dari sel MDBK (berwarna merah bata), (A) Sampel 0816627/179; (B) Sampel 0817545/112

Metode RT-PCR digunakan untuk konfirmasi hasil pewarnaan IPX. Primer yang digunakan pada penelitian kali ini adalah primer 324 dan 326 (Vilcek *et al.*, 1994). Produk PCR yang dihasilkan adalah 285 bp (Gambar. 2). Hasil pengujian menggunakan pewarnaan IPX dengan RT-PCR menunjukkan hasil yang sama (Tabel. 3).



Gambar 2. Hasil RT-PCR dengan produk 285 bp, (A) sampel tahun 2016 (1: Marker 100 bp, 2 : 0816399/046, 3 : 0816339/047, 4 : 0816439/007, 5 : 0816439/010, 6 : 0816627/179, 7 : kontrol negatif, 8 : strain Singer, 9 : 0475-WI); (B) untuk sampel tahun 2017 (1 : Marker 100 bp, 2 : 0817381/053, 3 : 0817529/008, 4 : 0817542/005, 5: 0817545/112, 6 : kontrol negatif, 7 : strain Singer, 8 : 0475-WI)

KESIMPULAN DAN SARAN

Pada penelitian ini berhasil mendapatkan dua isolat lokal virus BVD asal provinsi Jawa Barat (0816627/179 dan 0817545/112). Kedua isolate virus BVD tersebut termasuk dalam virus *NCP BVD*. Balai Veteriner Subang telah berhasil melaksanakan metode diagnostik isolasi dan identifikasi virus BVD. Isolat virus BVD yang diperoleh perlu dikarakterisasi lebih lanjut (genotipe, subgenotipe, dan lain-lain). Isolat virus BVD dapat digunakan untuk bahan biologis pengujian laboratoris seperti menjadi antigen untuk pengujian *Serum Neutralization Test (SNT)* untuk lebih memahami virus BVD yang bersirkulasi di Provinsi Jawa Barat dan di Indonesia pada umumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adjid, A., 2004. Strategi Alternatif Pengendalian Penyakit Reproduksi Menular Untuk Meningkatkan Efisiensi Reproduksi Sapi Potong. *Wartazoa*, 14(3), pp.125–132.
- Becher, P., Thiel, H.J., 2011. Pestivirus (Flaviviridae). In: Tidona, C.A., Darai, G. (Eds.), *Springer Index of Viruses*, Second Ed. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 483–488.
- Beveridge, W.I.B. 1983. *Animal health in Australia*. Vol. 4: Bacterial diseases of cattle, sheep and goats. Australian Bureau of Animal Health. Canberra.

- Brown, T.T., deLahunta, A., Bistner, S.I., Scott, F.W., McEntee, K., 1974. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. I. Cerebellar atrophy. *Veterinary Pathology* 11, 486–505.
- Brownlie, J., 1990. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 23, 371–382.
- 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. *Clinical and Diagnostic Virology* 10, 141–150.
- Driskell, E.A., Ridpath, J.F., 2006. A survey of bovine viral diarrhea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 600–605.
- Gamlen, T., Richards, K.H., Mankouri, J., Hudson, L., McCauley, J., Harris, M., Macdonald, A., 2010. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *Journal of General Virology* 91, 133–144.
- Graham, R. C., Ludholm, U., and Karnovsky, M. J. (1965) Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 150–152.
- Hertig, C., Pauli, U., Zanoni, R., Peterhans, E., 1991. Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 26, 65–76.
- Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* 64, 89–107.
- Howard, C.J., 1990. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 9, 95–103.
- Kim, S.G., Dubovi, E.J., 2003. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals* 31, 103–106.

- Lindberg, A.L.E., Alenius, S., 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology* 64, 197–222.
- McGowan, M.R., Kirkland, P.D., Richards, S.G., Littlejohns, I., 1993. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Veterinary Record* 133, 39–43.
- Meyling, A., Houe, H., Jensen, A.M., 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 9, 75–93.
- Paton, D.J., Goodey, R., Brockman, S., Wood, L., 1989. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Veterinary Record* 124, 63.
- Saliki, J.T., Dubovi, E.J., 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice* 20, 69–83.
- Sprecher, D.J., Baker, J.C., Holland, R.E., Yamini, B., 1991. An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology* 36, 597–606.
- Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J., 1994. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136 (3-4), 309-323.