JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

سال اول، شماره سوم، تابستان ۱۳۸۹

صفحات ۱۸۰-۱۷۳

تعیین تیپ های ۱ و ۲ ویروس اسهال ویروسی گاوان در سرم گوساله های PI در گاوداری های استان تهران به روش PCR Multiplex

فرهاد موسی خانی[۱]؛ آریا بدیعی*[۲]؛ مهدی لقمانی[۳]؛ علیرضا شقایق[۲]؛ محسن ظفری[۳]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

نویسنده مسئول: Badiei@kiau.ac.ir

چکیده

بیماری مخاطی (MD) و اسهال ویروسی گاو (BVD) بیماری های ویروسی هستند که از نظر بالینی به هم شباهتی ندارند اما سبب شناسی ویروسی یکسانی دارند. با توجه به اینکه در کشور ما هنوز تیپ های ویروس شناسایی نشده اند، بنابراین با انجام این تحقیق و مشخص شدن درصد فراوانی تیپ ها، با استفاده از واکسن های مناسب می توان کنترل موثرتری بر میزان شیوع بیماری داشت.در این مطالعه، به طور تصادفی از ۲۰ گاوداری استان تهران تعداد ۲۰ گوساله Persistently-infected (PI) پس از دو بار خونگیری و آزمایش الایزاجهت تشخیص BVD-Ag انتخاب و جدا شد. سپس از سرم گوساله های PI،RNA ویروس استخراج گردید. در مرحله بعد اقدام به انجام Multiplex PCR با دو جفت پرایمر اختصاصی برای تیپ ۱ و ۲ ویروس BVD گردید. پرایمرها بر اساس ناحیه ۵'-UTR ژنوم ویروس انتخاب شد. با توجه به نتایج RT PCR-، ۳ مورد BVDV type II (۱۵٪) و ۲۰ مورد BVDV type I (۱۰۰٪) شناسایی شد. همخوانی بین آزمایش الایزای BVD با RT-PCR صد درصد بود و کلیه نمونه های مثبت و منفی همخوانی داشتند. با توجه به حضور تیپ II توصیه به بررسی های تکمیلی و ملکولی می گردد.

واژه های کلیدی: اسهال ویروسی گاو، بیماری مخاطی، PI، Multiplex PCR

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res.1(3)173-180,2010

Genotyping of BVDV type 1 and 2 isolated from PI cattle in Tehran province by multiplex PCR

Moosakhani F.[1],Badiei A.[*2],Loghmani M.[3], Shaghayegh A.[2], Zafari M. [3]

1-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, IRAN

2-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, IRAN

3-Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, IRAN

[*]***Corresponding author:*** *Badiei@kiau.ac.ir*

Mucosal disease (MD) and bovine viral diarrhea (BVD) are diseases that have no clinical correlations but they have common viral etiology. In this respect, genotyping of the virus is not performed in Iran yet, after genotyping, control of the disease by using proper vaccines could be more effective.

In this study, serum samples of suspected calves were taken randomly from 20 farms around province of Tehran. Then, two ELISA tests were performed for detection of BVDV antigen. Twenty samples were chosen for RNA extraction as each sample belonged to one farm. Then, a multiplex PCR was preformed on the basis of 5′ UTR of BVDV genome with positive samples for genotyping the virus.

In conclusion, 3 samples (15%) were positive for BVD-2 and 20 samples (100%) were positive for BVD-1. All positive and negative ELISA samples had equal results in RT-PCR. As for detection of BVD-2, phylogenetic analysis and molecular examination is recommended.

Keywords: Bovine viral diarrhea virus, mucosal disease, Multiplex PCR, PI

مقدمه

ویروس بیماری اسهال ویروسی گاوان (BVDV) به ویروس هایی اطلاق می شود که در خانواده Flaviviridae جنس Pestivirus طبقه بندی می شـوند. ژنـوم ویروس، از یـک RNA تک رشته ای با پلاریته مثبـت که تقـریبا ۱۲/۳ kb می باشد، تشکیل شده است.

این ویروس ها از نظر اقتصادی در سراسر جهان از اهمیت شایانی برخوردار بوده که به طور عمده نشخوارکنندگان را تحت تاثیر قرار می دهند. دو ژنوتیپ BVDV (BVDV-1 و BVDV-2) به همراه ویروس بیماری مرزی (Border disease) و ویروس تب کلاسیک خوک، چهار گونه تایید شده این جنس را تشکیل می دهند. به علاوه، یک گونه پنجم هم از زرافه جدا شده (۵). BVDV-1 ژنوتیپ غالب بوده و در سراسر دنیا یافت می شود. BVDV-2 در ایالات متحده امریکا و کانادا در زمان رخداد فوق حاد بیماری (سندرم هموراژیک) انتشار یافت (۱۹و۱۸) اما در امریکای جنوبی، آسیا و اروپا نیز گزارش شده است(۱۷). این دو ژنوتیپ میتوانند به تحت تیپ هایی نیز تقسیم بندی شوند که دست کم یازده تحت تیپ BVDV-1 و دو تحت تیپ BVDV-2 شناسایی شده اند (۲۴). انتهای ژنوم ویروس نواحی ترجمه نشده (5‘-and 3’-NCR’s) می باشد.ناحیه 5‘ NCR حاوی نواحی به شدت محافظت شده و همچنین نواحی متغیر می باشد که توسعه روشهای تشخیصی بر اساس RT-PCR را ممکن می سازد. ژنوتایپینگ این ویروس عمدتا بر اساس سکانس مقایسه ای سکانس های جزئی نواحی 5‘UTR، Npro یا E2 می باشد (۵). ناحیه 5‘UTR یک ناحیه خیلی محافظت شده می باشد و بنابراین برای تشخیص ژنتیکی جدایه های BVDV روش قابل اطمینانی می باشد (۲۰). حدت و اختلافات آنتی ژنی به همراه فاکتورهای مختلف حیوانی شامل سن، جنسیت، آبستنی، مرحله آبستنی، کفایت سیستم ایمنی و... مسئول تظاهرات بالینی بسیار متغیر عفونت BVDV می باشند که علت تقسیم بندی ویروس به ژنوتیپ های 1a,1b, 2 است.

BVDV با چندین علامت بالینی همراه است که شامل اسهال ملایم، بیماری تنفسی، نقایص مادرزادی، ناهنجاری های تولیـدمثلی و بیماری مخـاطی می باشد (۴). آلودگی با ویـروس در ۱۲۰ روز ابتـدایی آبـستنی می توانـد به تـولد نـوزاد Persistently-infected (PI) منجر شود که این دسته از نوزادان نسبت به ویروس ایمونو تولران می باشند. این گوساله ها از کلیه ترشحات، خون، ادرار، مدفوع، اشک و... ویروس را دفع می نمایند. شناسایی حیوانات PI مشکل است زیرا ظاهری طبیعی دارند. حیوانات PI مهمترین عامل بقای ویروس در گاوداری می باشد. چنین حیواناتی نه تنها سبب انتقال ویروس به حیوانات حساس می شوند بلکه محل تکثیر سریالی ویروس و پاساژ آن شده و ممکن است چندین سال به این شکل بدون دخالت سیستم ایمنی قادر به تکثیر بوده و در نتیجه یک سویه جدید ویروس به وجود بیاید. تعیین میزان شیوع BVD اصولا بر اساس تشخیص آنتی بادی علیه BVDV می باشد. بر اساس گزارش میرشمسی و همکاران، رخداد BVD در ایران بیانگر یک محدوده ۹۰-۲۰ درصدی است (۱۵).

چندین مطالعه اختلافات مهم آنتی ژنی بین دو ژنوتیپ ویروس و نیز بین تحت تیپ های BVDV-1 را نشان داده اند(۲۰) و بیان می دارند که این اختلافات ممکن است به شکست در ساخت واکسن منجر شوند (۲۶و۱۱). بنابراین، تنوع ژنتیکی جدایه های BVDV نه تنها یک موضوع مورد علاقه آکادمیک می باشد، بلکه کاربردهای عملی برای طراحی واکسن دارد.امروزه، گزارش هایی در مورد تنوع ژنتیکی BVDV از کشورهای زیادی وجود دارد. در کشور ما نیز بررسی تنوع ژنتیکی BVDV به علت مواردی که شرح داده شد ضروری به نظر می رسد. هدف از این مطالعه بررسی حضور تیپ های I و II ویروس در گاوداری های صنعتی استان تهران می باشد.

مواد و روش ها

به طور تصادفی از ۲۰ گاوداری استان تهران نمونه های خون تعداد ۲۰ گوساله PI پس از دو بار خونگیری به فاصله ۳ هفته و آزمایش الایزاجهت تشخیص BVD-Ag انتخاب و جدا شد. نمونه ها از تاریخ ۸۸/۳/۱ تا ۸۹/۳/۱ اخذ شدند و محل اخذ هر نمونه ثبت شد. آزمایش الایزا توسط کیت تجاری شرکت IDEXX انجام شد.پس از انجام آزمایش سرولوژی، نمونه های مثبت برای بررسی های ملکولی انتخاب شدند.

RNA ویروسی توسط کیت High Pure Viral RNA & (DNA Extraction KIT) Roche,Germany و با توجه به دستورالعمل های شرکت سازنده استخراج شد.

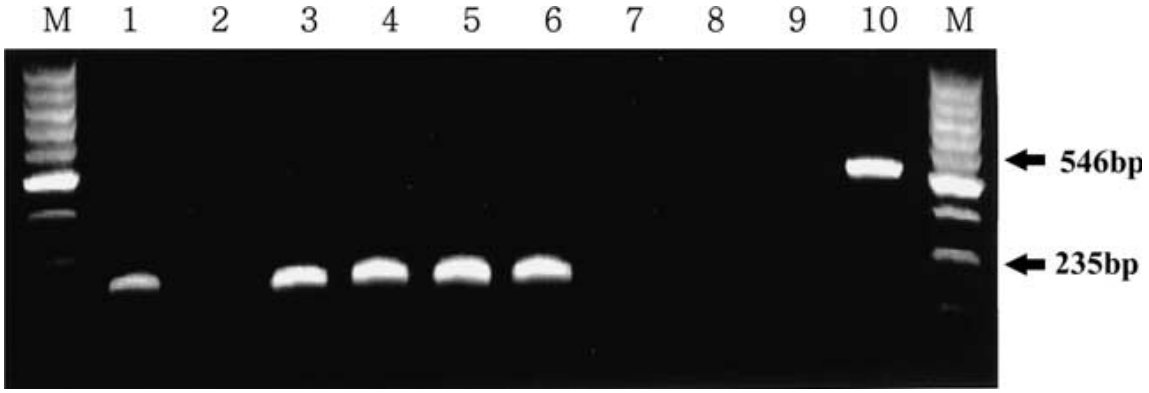
جفت های پرایمر برای ردیابی BVDV-1 و BVDV-2 بر پایه 5-UTR انتخاب شده و پرایمرها برای RT PCR- بر اساس اطلاعات بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) آماده شدند (M31182 برای BVDV-1 و U18059 برای BVDV-2)(Park et al. 2004).

Primer	Sequence (5´----→ 3´)	Nucleotide position	Size (bp)
BVDV F1	GCC ATG CCC TTA GTA GGA CT	105–124	23
BVDV CR1(Type I)	GCW RCA CCC TAT CAG GCT GT	320–339	19
BVDV R2 (Type II)	AGA TCG GTC CTG GTT TGA TA	631–650	19

RT PCR– در ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه متعاقب دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد. واکنش اصلی PCR ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵% الکتروفورز شده و با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شدند و درنهایت در دستگاه ژل داکومنتیشن نتایج قرائت گردید. (Mishra et al. 2004, Kawther et al. 2008).

نتایج

با توجه به نتایج RT PCR-، ۳ مورد BVDV-2 (15 %) و ۲۰ مورد BVDV-1 (۱۰۰%) شناسایی شد. همچنین همخوانی بین آزمایش الایزای BVD با RT-PCR صد درصد بود و کلیه نمونه های مثبت و منفی همخوانی داشتند.



تصویر ۱: تصویر ژل آگارز پس از الکتروفورز. با توجه به شکل، Lane M: Ladder بوده و Lane های ۱و۳و۴و۵و۶ واکنش های BVDV-1 و Lane 10 مربوط به BVDV-2 می باشد. سایر Lane ها کنترل منفی هستند.

بحث

ژنوتایپینگ ویروس BVD در حال حاضر یک روش معمول برای طبقه بندی جدایه های BVDV می باشد (۲۰). البته روش استاندارد مرجع شناسایی BVDV، جداسازی آن با استفاده از کشت سلول است که این روش پرهزینه و وقت گیر می باشد (۲۱).

دو ژنوتیپ ویروس (BVD-1 و BVD-2) اولین بار بر اساس مقایسه 5-UTR تشخیص داده شد (۱۹و۱۸). مطالعات بعدی نشان داد که 5-UTR در ژنوم BVD خیلی محافظت شده می باشد. این موضوع باعث شد که برخی از پژوهشگران پیشنهاد کنند که 5-UTR به خاطر طبیعت خیلی محافظت شده آن، ممکن است هدف خوبی برای مطالعات ژنوتایپینگ و فیلوژنتیک نباشد (۶). البته مطالعات متعددی کاربردی بودن این ناحیه را برای ژنوتایپینگ جدایه های BVD نشان داده اند (۲۴و۱۹و۱۸و۷).

ژنوتیپ ۲ ویروس در بین جمعیت گاوهای امریکای شمالی به مدت دست کم ۲۰ سال در چرخش بوده است. این ژنوتیپ در اروپا، امریکای جنوبی، امریکای شمالی و احتمالا سایر کشورها ردیابی شده است (۲۵و۹). طبق پژوهش های Park و همکاران، هر دو ژنوتیپ ۱ و ۲ ویروسBVD در کشور کره جنوبی شناسایی شد(۱۷). همچنین مطالعات مشابهی در کشور های مصر، تونس و هند انجام شده و هر دو ژنوتیپ ۱ و۲ ویروس شناسایی شدند (۲۳و۱۶و۱۳). در نتایج بدست آمده از این پژوهش نیز ژنوتیپ ۲ ویروس جدا شد. ردیابی و تشخیص تیپ ۲ ویروس اهمیت شایانی دارد زیرا اکثر واکسن های BVDV تنها حاوی تیپ ۱ ویروس می باشند. البته اخیرا در یک گزارش بیان شده است که استفاده از یک دز تکی (modified live virus(MLV حاوی تیپ ۱ سبب محافظت گوساله های جوان از ابتلا به بیماری ناشی از تیپ ۲ می شود (۱۲). همچنین Makoschey و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که استفاده از واکسن غیرفعال شده تیپ ۱ سبب محافظت علیه نشانه های بالینی درگیری با تیپ ۲(ترومبوسایتوپنی) می شود (۱۴). گاو واکسینه شده با واکسن تیپ ۱ وقتی در مواجهه با سویه های تیپ ۲ قرار بگیرد ممکن است سبب عدم حفاظت کامل، ایجاد سویه های فرار کرده از واکسن، سویه های موتان و یا سویه های نوترکیب شود که در نهایت سبب تولید ویروس های جدید می گردد. واکسیناسیون به منظور جلوگیری از آلودگی جنین انجام شده و مهمترین ابزار جهت کنترل به وجود آمدن گوساله های PI می باشد (۲۰). شناسایی BVDV در نمونه اخذ شده از حیوان واکسینه با واکسن های زنده، سبب دشواری تفسیر می شود. این موضوع در مورد حیواناتی که ۲ هفته از واکسیناسیونشان با واکسن MLV گذشته حائز اهمیت است که می تواند به خاطر موارد زیر باشد:

– وجود ویروس واکسن.

– عدم کفایت کافی واکسن در برابر ویروس بیماری زا و در نتیجه ایجاد ویرمی.

– وجود فقط ژنوتیپ ۱ ویروس در واکسن که ایجاد مقاومت مناسبی در برابر تیپ ۲ نمی نماید.

بر اساس گزارش Ridpath و همکاران BVD-1 عمدتا در ساخت واکسن به کار میرود و BVD-2 غالبا از سرم جنین گاو جدا شده است. ژنوتیپ BVD-2 درگوساله های PI که از مادران واکسینه شده علیه BVDV به دنیا آمده اند و گاوهایی که از سندرم هموراژیک (شکل حاد BVDV) تلف شده اند شایع است (۲۰).

همت زاده و همکاران در سال ۱۳۸۱ با بررسی میزان عفونت پایدار پستی ویروسی (PI) در گاوداری های اطراف تهران به روش capture ELISA و ایمونوفلورسنت مستقیم روی نمونه های بافی کوت گاوهای با سن ۳ ماه به بالا به این نتیجه رسیدند که میزان آلودگی در روش الایزای ۷/۴ % و در روش ایمونوفلورسنت مستقیم ۸/۲ % بود که بیانگر وجود سطح بالای آلودگی گاوها می باشد. تحقیقات نامبرده در استان چهارمحال و بختیاری نیز به نتایج مشابهی نائل شد(۳).

نجفی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۷ توانستند با روش RT-PCR در مخلوط سرم ۲۰۰ راس گوساله ویروس BVD را شناسایی نمایند و توانستند نشان دهند RT-PCR در مخلوط سرمها قابل اعتماد می باشد(۲).

پارسانکو و همکاران نیز در سال ۱۳۸۱ با بررسی سرولوژیکی BVDV در گاوداریهای منطقه شهریار توانستند آلودگی با ویروس را به اثبات برسانند(۱).

پژوهش حاضر نشان داد که دو ژنوتیپ ۱و۲ ویروس BVD در جمعیت گاوهای استان تهران وجود دارند. منشأ و تاریخ آلودگی گاوداری های استان تهران به این ویروس در این مطالعه قابل شناسایی نبود و مطالعات وسیعی بدین منظور باید در سطح کشور انجام پذیرد. به علت نبود این داده ها، چندین نظریه پیش رو می باشد؛ احتمال می رود که تیپ ۱ ویروس همانطوری که در سایر کشورها گزارش شده، در ایران به مدت زیادی حضور داشته است و یا در زمان خاصی وارد ایران شده است. حضور تیپ ۲ ممکن است اخیرا رخ داده باشد. ورود گاو یا منی از سایر کشورها می تواند توضیحی در رابطه با حضور تیپ ۲ ویروس باشد. فرضیه بعدی، حضور قبلی این ژنوتیپ همانند تیپ ۱ و یا ورود آن از طریق واکسن های آلوده می باشد (۲۳و۱۰).

RT-PCR قادر به ردیابی ژنومBVDV از سلولهای buffy coat، خون کامل، سرم، منی و بافت گوشی(ear-notch) می باشد(۱۸). این روش از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است. در یک مطالعه RT-PCR توانست یک BVDV مثبت را در مخلوط (pool) صدتایی با دقت ۱۰۰% ردیابی کند(۲۱). چندین آزمایش بر پایه RT-PCR به منظور ژنوتایپینگ ویروس انجام شده است. مزیت Multiplex PCR به سایر PCR ها این است که با یک واکنش می توان چندین تیپ ویروس را همزمان شناسایی نمود. سولیوان و آکینا (۱۹۹۵) با روش Multiplex PCR توانستند بیماری مرزی (BDV) را نیز تشخیص دهند(۲۲و۱۹). مزیت این روش این بود که توانایی تشخیص BDV و BVDV 1,2 را داشت. به دلیل وجود آنتی بادی های مادری در گوساله های زیر ۳ ماه شناسایی ویروس با capture ELISA ممکن است دچار خطا شود. اگرچه از مزایای این روش، انجام آن در عرض چند ساعت است، اما در این گروه توصیه به انجام RT-PCR می گردد(۲۰و۸).

نتایج حاصل از این مطالعه، بیانگر این است که RT-PCR میتواند در ردیابی ناقلین ویروس در گله (مخصوصا گوساله های PI) نقش موثری داشته باشد و یک ابزار ارزشمند برای ژنوتایپینگ ویروس BVD از نمونه های سرمی می باشد.

براساس نتایج بدست آمده و اثبات حضور تیپ II لازم است به منظور بررسی بیشتر بخصوص از لحاظ منشاء فیلوژنتیکی، مطالعات ملکولی و فیلوژنتیک بر روی تیپ I و بخصوص تیپ II انجام گیرد. همچنین مبارزه و کنترل این ویروس امری حیاتی به نظر می رسد.

منابع

۱- پارسانکو، همایون، (۱۳۸۱) بررسی سرولوژیکی بیماری اسهال ویروسی گاوها در گاوداری های منطقه شهریار، پایان نامه برای دریافت درجه دکتری حرفه ای (DVM)، شماره ۵۳۶، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ص۱

۲- نجفی مصلح، سجاد، (۱۳۸۷) تشخیص مقایسه ای عامل اسهال ویروسی گاو (BVDV) در مجموع سرم گاوها به دو روش RT-PCR و ELISA. پایان نامه برای دریافت درجه دکتری حرفه ای (DVM)، شماره ۹۴۲، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ص ۳-۴

۳-همت زاده، فرهید، کارگر موخر، روحانی. (۱۳۸۳) بررسی عفونت پایدار پستی ویروسی در گاوداریهای اطراف تهران. پژوهش و سازندگی شماره ۶۳ ص ۲۱-۲۵

4. Baker, J. C. (1985) The clinical manifestations of BVD infection. Veterinary Clinics of North America.

Food Animal Practice 11: 425–45.

5. Becher P., Avalos Ramirez R., Orlich M., Cedillo Rosales S., König M., SchweizerM., Stalder H., Schirrmeier H., Thiel H.J. (2003) Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification, Virology 311: 96−104.

6. Becher P., Orlich M., Shannon A.D., Horner G., König M., Thiel H.J. (1997) Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. Journal of General Virology 78: 1357-1366.

7. Beer, M., Wolf, G., Kaaden, O.R., (2002) Phylogenetic analysis of the 5′-untranslated region of the German BVDV type II isolates. Journal of Veterinary Med.B. Infect. Dis. Vet. Public Health 49: 43–47.

8. Brinkhof J., Zimmer G., Westenbrink F. (1996) Comparative study of four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhea virus in persistently infected cattle. Vet. Microbiol. 50: 1-6.

9. Evermann, J.F., Ridpath, J.F., (2002) Clinical and epidemiologic observation of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. Veterinary Microbiology 89: 129–139.

10. Falcone E., Cordioli P., Sala G., Tarantino M., Tollis M. (2001) Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in northern Italy. Vet. Res. Commun. 25: 161-167.

11. Fulton R.W., Briggs R.E., Ridpath J.F., Saliki J.T., Confer A.W., Payton M.E., Duff G.C., Step D.L., Walker D.A. (2005) Transmission of bovine viral diarrhea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. Can. J. Vet. Res. 69: 161-169.

12. Fulton R.W., Saliki J.T., Confer A.W., Burge Lurinda J., d'Offay J. M., Helman R. G.,Bolin S. R., Ridpath J. F., Payton Mark E. (2000) Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. Vet. Diagn. Invest. 12: 33–38.

13. Kawther S. A. Zaher (2008). Genotyping of bovine viral diarrhea virus using multiplex PCR, with and without RNA extraction. African Journal of Microbiology Research 2: 316-318

14. Makoschey B., Janssen M.G.J., Vrijenhoek M.P., Korsten J.H.M., Marel P.v.d. (2001) An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. Vaccine 19(8) 3261-3268

15. Mirshamsy H, Shafyi A, Bahrami (1970). The occurrence of bovine virus diarrhea/Mucosal disease in Iran. Arch Razi. 22: 197-201

16. Mishra N., Pitale S.S., Jain P., Pradhan H.K. (2004). Multiplex PCR in diagnosis and characterization of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. CURRENT SCIENCE 88 (1) 162-167

17. Park, J. S., Moon, H. J., Lee, B. C., Hwang, W. S., Yoo, H. S.,Kim, D. Y., Park B. K.,(2004) Comparative analysis on the 5′ -untranslated region of bovine viral diarrhea virus isolated in Korea. Res.Vet. Sci. 76: 157–163

18. Pellerin, C., Van den hurk, J., Lecomte, J., Tijssen, P.(1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology 203: 260–268

19. Ridpath, J. F., Bolin S. R., Dubovi E. J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhea virus into genogroups. Virology 205: 66–74

20. Ridpath, J. F. (2005) Bovine Viral Diarrhea Virus

Diagnosis, Management, and Control. Classification and molecular biology, Blackwell Publishing, 65–80

21. Ridpath J. F., Driskell Elizabeth A. (2006) A survey of bovine viral diarrhea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. J. Vet. Diagn. Invest. 18: 600–605

22. Sullivan D.G., Akkina R.K. (1995) A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses. Virus Res. 38: 231-239

23. Thabti F., Letellier C., Hammami S., Pepin M., Ribiere M., Mesplede A., Kerkhofs P., Russo P. (2004) Detection of a novel Border Disease Virus subgroup in Tunisian sheep. Archives of Virology 150: 215-220

24. Vilcek S., Paton D.J., Durkovic B., Strojny L., Ibata G., Moussa A., Loitsch A., Rossmanith W., Vega S., Scicluna M.T., Palfi V.(2001) Bovine diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. Archives of Virology 146: 99–115

25. Wolfmeyer A., Wolf G., Beer M. (1997) Genomic (5′-UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. Archives of Virology 142: 2049–2057

26. Zimmer G.M., Wentink G.H., Bruschke C., Westenbrink F.J., Brinkhof J., Goey I. (2002) Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhea virus. Vet. Microbiol.89: 255-265