

Zastosowanie real time RT-PCR do wykrywania wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD) typu 1 i typu 3 w materiale biologicznym

MAGDALENA LARSKA*, **, MIROSŁAW P. POLAK**

*Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU),
BOX 7054, SE 750 07 Uppsala, Szwecja

**Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Larska M., Polak M. P.

Application of real time RT-PCR for the detection of type 1 and type 3 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in biological material

Summary

The aim of the study was to use real time RT-PCR for the detection of genetic material of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1 and type 3 in serum and milk samples. Material tested included the fetal calf serum used for cell culture, serum samples from healthy calves and from calves experimentally inoculated with BVDV type 1 and type 3, and milk samples (pasteurized and treated with ultra high temperature). Sensitivity of the test was 200 copies of RNA per reaction (10^5 viral RNA copies per ml) for both types of BVDV, using dedicated primers and standards. Detection limit was 10^2 tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) and 1 TCID₅₀ for type 1 and type 3, respectively. Diagnostic specificity of the method was 100%. Out of 10 samples of milk, 3 were positive for BVDV type 1, while none was positive for type 3. On the other hand, BVDV type 3 was found in 6 out of 10 samples of fetal calf serum. Real Time RT-PCR for BVDV type 1 and type 3 proved to be a highly sensitive and highly specific technique, enabling the detection of viral genetic material in various samples, even when its detection by virus isolation or antigen ELISA tests is impossible because of virus inactivation by such processes as high temperature, gamma irradiation, or the presence of virus neutralizing antibodies.

Keywords: bovine viral diarrhoea and mucosal disease, BVDV, real time RT-PCR, diagnosis

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD) to powszechnie występujący patogen, prowadzący do poważnych strat ekonomicznych w hodowli i rozrodzie bydła. Zwierzęta zakażone trwale tym wirusem wydalają go przez całe życie w znaczących ilościach we wszystkich wydalinach i wydzielinach. Ostatnio coraz częściej zwraca się uwagę na problem zakażeń ostrych, w których pomimo krótkotrwałej wiremii, zakończonej serokowersją dochodzi do siewstwa wirusa, które w przypadku nasienia buhajów może trwać nawet kilka miesięcy. Stwierdzany najczęściej w przypadku zakażenia wirusem BVD-MD subkliniczny przebieg choroby dodatkowo utrudnia prawidłową diagnostykę. Patogen ten, wraz z wirusami klasycznego pomoru świń (CSFV) i choroby granicznej owiec (BDV), należy do rodzaju *Pestivirus* w rodzinie *Flaviviridae*. Do niedawna wyróżniano dwa typy (genotypy) wirusa BVD-MD: typ 1 (BVDV-1) występujący

powszechnie u bydła na całym świecie oraz typ 2 (BVDV-2) (12) wywołujący postać krwotoczną choroby i stwierdzany najczęściej w krajach Ameryki Północnej. W ostatnich latach wykryto nowe podtypy pestiwirusów, takie jak: wirus wyizolowany od żyrafy i renifera (1), wirus Bungowannah (8, 11) wywołujący zespół zapalenia mięśnia sercowego prosiąt ssących oraz pestiwirus kozic pirenejskich (6). W 2004 r. w bydłęcej surowicy płodowej (FCS) pochodzącej z Brazylii wykryto nowego pestiwirusa (D32/_Hobi), wykazującego największe pokrewieństwo z wirusem BVD-MD. Obecność wirusów Hobi-pokrewnych potwierdzono także w innych partiach FCS z Ameryki Południowej, a następnie wykryto je u trwale zakażonego zwierzęcia z Tajlandii (19). Dzięki zastosowaniu czulej metody RT-PCR specyficznej dla tego typu wirusów (9) obecność kolejnych wirusów podobnych do Hobi (coraz częściej określanych jako nowy typ

BVDV-3) wykryto w surowicy bydlęcej pochodzącej z Australii, a ostatnio nawet u cieląt z objawami ze strony układu oddechowego w Kalabrii we Włoszech (4). Ten ostatni przypadek związany był prawdopodobnie z kontaminacją szczepionki lub innych produktów medycznych stosowanych w zakażonym gospodarstwie, co podkreśla ryzyko, jakie niesie ze sobą brak odpowiednich metod wykrywania wirusa BVD-MD typu 3.

Celem badań było zastosowanie metody RT-PCR w czasie rzeczywistym (real time RT-PCR) do oznaczania ilościowego RNA wirusów typu BVDV-1 i BVDV-3 w próbkach surowicy oraz mleka bydła. W badaniach wykorzystano technikę opartą o sondy TaqMan (7). Używany zazwyczaj test izolacji wirusa to kosztowna, czasochłonna i pracochłonna metoda diagnostyczna, wymagająca posiadania wrażliwej linii komórkowej i płynów hodowlanych, wolnych od zakażenia wirusem BVD-MD. Do badań prowadzonych na całym świecie wykorzystywane są coraz lepsze i skuteczniejsze techniki biologii molekularnej, jak real time RT-PCR oraz jego modyfikacje, charakteryzujące się wysoką czułością i specyficznością, pozwalające na oznaczenie ilościowe kwasu nukleinowego w badanej próbce. Możliwość oceny uzyskiwanych wyników na bieżąco, w trakcie prowadzenia analizy, z pominięciem czasochłonnej, mniej czulej i wymagającej systemu dokumentacji analizy w żelu agarozowym, pozwala skrócić czas badania, obniżyć jego koszty i zwiększyć bezpieczeństwo pracy.

Materiał i metody

Próbki do badań oraz szczepy wirusowe. Materiał do badań stanowiło 10 próbek płodowej surowicy bydlęcej (FCS) używanej w hodowlach komórkowych, 75 próbek surowicy pozyskanych od cieląt wolnych od zakażenia i cieląt zakażonych eksperymentalnie typem 1 oraz typem 3 wirusa BVD-MD (publikacja w przygotowaniu) oraz 10 próbek mleka krowiego pasteryzowanego lub poddanego działaniu wysokiej temperatury (UHT). Wszystkie próbki badane były na obecność wirusowego antygenu z użyciem zestawu diagnostycznego BVD HerdChek ELISA Ag (Idexx) według zaleceń producenta. Jako kontroli dodatniej testów używano szczepów referencyjnych Singer oraz Th/04 KhonKaen, reprezentujących, odpowiednio, typ 1 i typ 3 wirusa BVD-MD. Wirusy namnażano w hodowli komórek nerki bydlęcej (MDBK) oraz w hodowli komórek bydlęcej małżowiny nosowej (BT) w środowisku wolnym od zanieczyszczeń wirusem BVD-MD, w obecności jałowego płynu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C przez 5-7 dni. Obecność wirusa potwierdzana była testem immunoperoksydazowym (13).

Standardy wirusowego RNA. Do określenia czułości testu real

time PCR użyto cDNA szczepu wirusa BVD-MD typu 1 (NADL) i typu 3 (Th/04_KhonKaen), które powstały po przepisaniu wirusowego RNA, amplifikacji, oczyszczeniu i wklonowaniu do plazmidu (9). Standardy otrzymano dzięki uprzejmości dr Liu z SVA w Uppsali, Szwecja. Ilość RNA dla standardów została określona na podstawie analizy spektrofotometrycznej i wzoru: $N = \text{stężenie RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) / \text{wielkość fragmentu (bp)} \times 182,5 \times 10^{13}$ jako liczba kopii/ml.

Ekstrakcja wirusowego RNA. Całkowite RNA ekstrahowano z próbek surowicy, leukocytów krwi obwodowej i mleka przy użyciu odczynnika TRI (Sigma) zgodnie z procedurą producenta. Do 500 μl badanej próbki dodawano 1 ml odczynnika TRI, mieszano i inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej. Następnie do próbki dodawano 200 μl chloroformu, całość wytrząsano przez 15 sek. i wirowano przy 12 000 \times g przez 15 min. w temperaturze 4°C. Górną frakcję przenoszono do nowej próbki, dodawano taką samą objętość izopropanolu, mieszano i po 5 min. inkubacji w temperaturze pokojowej wirowano przy 12 000 \times g przez 10 min. w temperaturze 4°C. Po usunięciu supernatantu z próbki dodawano 1 ml 75% etanolu, mieszano na wytrząsarce (vortex) i wirowano przy 7500 \times g przez 5 min. w temperaturze 4°C. Po wylaniu alkoholu z próbki zawartość suszono przez około 10 min. w temperaturze pokojowej. Osad RNA rozpuszczano w 20 μl wody redestylowanej traktowanej DEPC, inkubowano przez 5 min. w temperaturze 57°C i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszych badań.

Real time RT-PCR. Do badań wykorzystano wcześniej opisane startery wyszczególnione w tabeli 1. Reakcję odwrotnej transkrypcji i amplifikacji przeprowadzono przy użyciu jednoprobówkowego zestawu RNA Ultrasense One-step qRT-PCR System Mix (Invitrogen) w termocyklerze Mx3005P (Stratagene). Przed przystąpieniem do badań zoptymalizowano warunki reakcji, tj. temperaturę przyłączania starterów, stężenie starterów i sondy oraz liczbę cykli amplifikacji. Optymalny skład mieszaniny reakcyjnej dla obu testów określono jako: 14,75 μl wody wolnej od RNaz (traktowanej DEPC); 5 μl mieszaniny reakcyjnej testu (5 \times); 0,5 μl barwnika referencyjnego ROX; po 0,5 μl każdego ze starterów w stężeniu 10 μM ; 0,5 μl sondy w stężeniu 5 μM ; 1,25 μl mieszaniny enzymów i 2 μl zawiesiny badanego RNA. Optymalny profil temperaturowy obejmował: etap odwrotnej transkrypcji w temperaturze 50°C przez 30 min., denaturację w 95°C przez 15 min. i końcowych 40 dwustopniowych cykli przebiegających w 95°C przez 20 sek. i w 60°C przez 60 sek.

Tab. 1. Startery i sondy TaqMan

Typ wirusa	Oligonukleotyd	Sekwencja (5' → 3')	Piśmiennictwo
1	Pesti-F	CTAGCCATGCCCTTAGTAG	Baxi i wsp., 2006
	Pesti-R	CGTCGAACCAAGTGACGACT	
	Sonda TaqMan BVDV1	FAM-TAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCT-BHQ	
3	T134-F	GACTAGTGGTGGCAGTGAGC	Liu i wsp., 2008
	T220-R	GAGGCATTCCTTGATGCGTC	
	Sonda TaqMan T155r-P	FAM-ACTCGGGGCTTCGGTGATCCAGGG-BHQ	

Wyniki i omówienie

Czułość analityczną reakcji określono przy użyciu 10-krotnych rozcieńczeń standardów RNA wirusów BVDV-1 i BVDV-3, a wyniki przedstawiono na ryc. 1 i 2. Wartości Ct (cyklu progowego) dla każdego z rozcieńczeń standardu mierzone w trzech kolejnych reakcjach real time RT-PCR zestawiono wobec liczby kopii wirusowego RNA w skali logarytmicznej. Zależności wyrażone zostały jako krzywe standardowe wykreślone przez krzywe regresji liniowej, w których wartości współczynnika korelacji (r^2) były wysokie i wynosiły 0,99 dla BVDV-1 i BVDV-3. Czułość wyniosła 200 kopii RNA na reakcję (10^5 kopii wirusowego RNA/ml) identycznie dla obu wirusów przy użyciu odpowiednich standardów.

Dodatkowo określono czułość reakcji w odniesieniu do miana zakaźnego ($TCID_{50}$) szczepu referencyjnego Singer wirusa BVDV-1 oraz szczepu Th/04_KhonKaen wirusa BVDV-3, co przedstawiono na ryc. 3. Próg wykrywalności dla metody wyniósł 10^2 $TCID_{50}$ i 1 $TCID_{50}$, czyli 5 $TCID_{50}$ oraz 0,05 $TCID_{50}$ na reakcję, odpowiednio, dla BVDV-1 i BVDV-3.

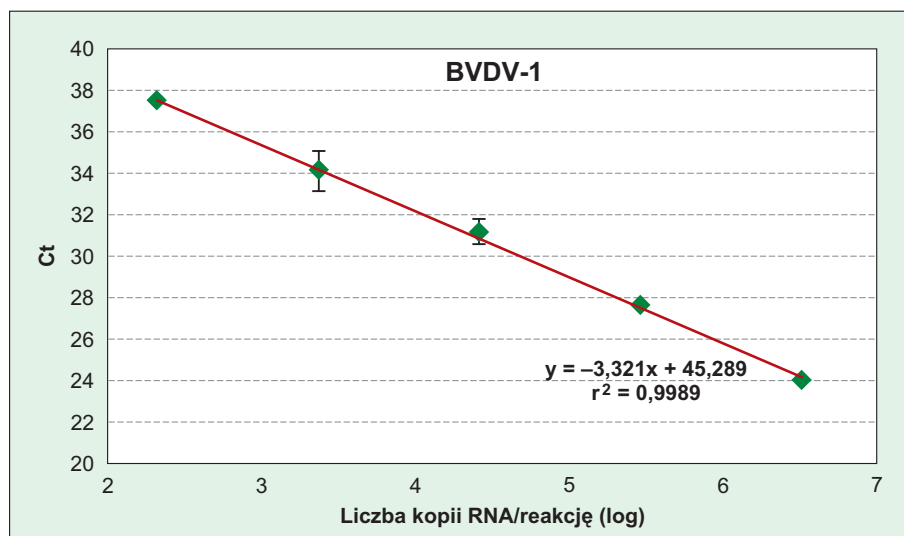
Powtarzalność testu ustalono poprzez 3-krotne badanie standardów wirusowego RNA metodą real time RT-PCR w odstępach 1-dniowych. Na podstawie odchyłek standardowych i średniej wartości Ct obliczono współczynniki zmienności (CV) dla standardów RNA, które wynosiły:

- dla BVDV-1: od 0,8 % (dla 2×10^5 kopii/reakcję) do 2,7% (dla 200 kopii/reakcję),
- dla BVDV-3: od 0,3% (dla 2×10^8 kopii/reakcję) do 3,4% (dla 2000 kopii/reakcję).

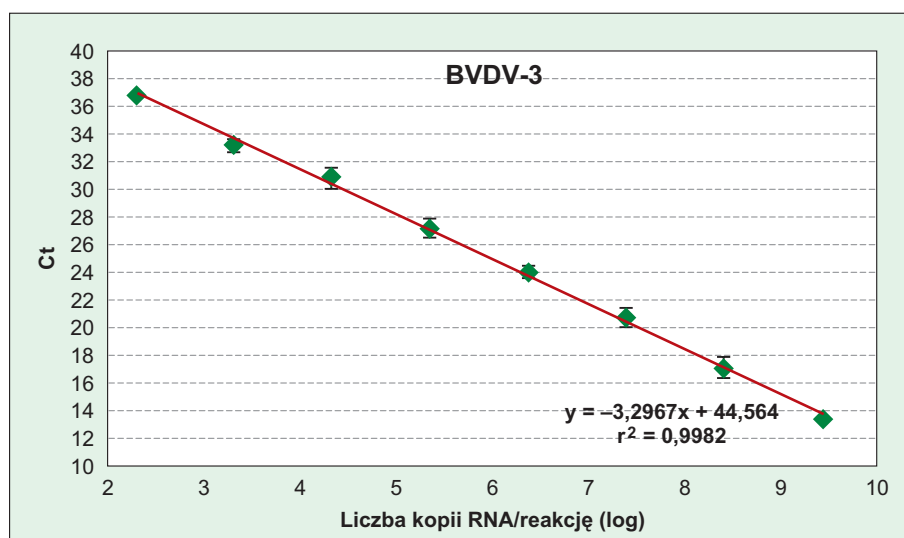
Uzyskane wartości współczynnika zmienności wskazują, że powtarzalność testów była wysoka.

Następnie określono czułość i specyficzność diagnostyczną real time RT-PCR w badaniu próbek mleka zbiorczego (spożywczego), próbek surowicy płodowej bydłowej oraz próbek pochodzących z zakażenia doświadczalnego cieląt typem 1 i 3 wirusa BVD-MD. Probki surowicy poddano równocześnie badaniu na obecność antygeny wirusowego w teście antygenowym HerdChek ELISA Ag (Idexx) (tab. 2). Wśród 10 próbek mleka spożywczego, nie ba-

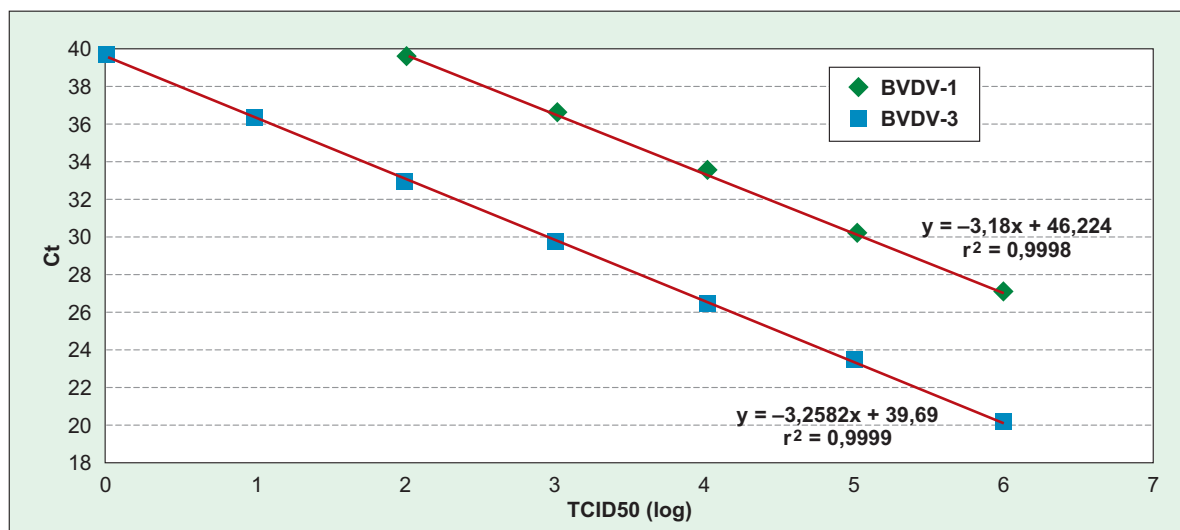
danych na obecność wirusa BVD-MD testem ELISA, 3 reagowały dodatnio w real time RT-PCR ze starterami i sondami specyficznymi dla typu 1. Nie stwierdzono dodatniej reakcji w próbkach mleka dla wirusa typu 3. Natomiast obecność RNA typu 3 stwierdzono w 6 z 10 próbek surowicy płodowej bydłowej. W trzech z sześciu próbek dodatnich dla typu 3 stwierdzono kontaminację typem 1, podczas gdy obecność antygeny wirusa w teście ELISA wykryto tylko w dwóch próbkach surowicy. Wszystkie próbki dodatnie pochodziły z Australii lub Ameryki Południowej. Specyficzność diagnostyczna (stosunek liczby wyników ujemnych do ogólnej liczby zwierząt nie zakażonych) określona dla obu testów z użyciem surowic od zwierząt



Ryc. 1. Krzywa regresji przygotowana w oparciu o wyniki real time RT-PCR z użyciem starterów Pesti-F i Pesti-R oraz sondy BVDV-1 dla standardu wirusa typu-1 w rozcieńczeniach zawierających od 2×10^5 do 2×10^2 (log 6,3-2,3) kopii wirusowego RNA/reakcję. Słupki błędów odnoszą się do odchylenia standardowego wartości uzyskanych w 3 powtórzeniach dla badanego standardu



Ryc. 2. Krzywa regresji wykreślona w oparciu o wyniki real time RT-PCR z użyciem starterów T134-F i T220-R oraz sondy T155r-P dla standardu wirusa BVDV-3 w rozcieńczeniach zawierających od 2×10^8 do 2×10^2 (log 9,3-2,3) kopii RNA/reakcję. Słupki błędów odnoszą się do odchylenia standardowego wartości uzyskanych w 3 powtórzeniach dla badanego standardu



Ryc. 3. Krzywa regresji wartości Ct dla badanych rozcieńczeń od 10^6 do 1 (log 6-1) TCID₅₀ szczepu Singer (typ 1) oraz szczepu Th/04_KhonKaen (typ 3)

Tab. 2. Porównanie wyników real time RT-PCR z wynikami HerdChek ELISA Ag (Idexx)

		Wynik					
		ELISA antygenowa		BVDV-1 real time RT-PCR		BVDV-3 real time RT-PCR	
		dodatni	ujemny	dodatni	ujemny	dodatni	ujemny
Mleko		-	-	3	7	0	10
Surowica do hodowli*		2	8	3	7	6	4
Surowica	Cielęta ujemne**	0	25	0	25	0	25
	Cielęta zakażone BVDV-1	10	15	17	8	0	25
	Cielęta zakażone BVDV-3	9	16	0	25	10	15

Objaśnienia: * – komercyjna płodowa surowica bydłowa od różnych producentów i z różnych serii, używana jako suplement hodowli komórkowych; ** – cielęta wolne od zakażenia wirusem BVD-MD, w zakażeniu doświadczalnym stanowiły kontrolę ujemną, poddane uprzedniemu 2-krotnemu badaniu na obecność antygeny i przeciwciał dla wirusa BVD-MD z wynikiem ujemnym

kontrolnych z zakażenia doświadczalnego wirusem typem 1 i typem 3 wirusa BVD-MD wyniosła 100% (25/25). Czulość diagnostyczna dla testu wykrywającego RNA typu 1 wirusa była wyższa o 70% (17/10) w stosunku do testu ELISA, natomiast czulość real time RT-PCR dla typu 3 była około 11% (10/9) wyższa niż w teście ELISA. Testy te jednak różniły się specyficznością w badaniu surowic od zwierząt eksperymentalnie zakażonych wirusem typu 3. W real time RT-PCR dla antygenowo dodatnich próbek uzyskano 2 wyniki ujemne i odwrotnie – trzy próbki, w których wykryto RNA dla wirusa typu 3 dawały wynik ujemny w teście ELISA.

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych jest szeroko rozpowszechniony w wielu krajach i tylko w nielicznych z nich (kraje skandynawskie oraz Austria) wprowadzono skuteczne programy zwalczania zakończone uwolnieniem bydła od zakażenia tym wirusem. W Polsce na podstawie badań serologicznych

ocenia się, że ponad 80% bydła miało kontakt z wirusem (14). W diagnostyce zakażeń tradycyjnie używa się testu izolacji wirusa w hodowli komórkowej oraz testów ELISA, jednakże metody te cechuje czasochłonność, wysoki koszt oraz różna czulość i specyficzność, za-

leżna od zmienności izolatów terenowych. Wykrywanie wirusa w hodowli komórkowej często musi być poprzedzone kilkoma ślepyimi pasażami, a brak efektu cytotatycznego dla większości izolatów terenowych oznacza konieczność stosowania przeciwciał mono- lub poliklonalnych, co wydłuża czas badania. W laboratoriach prowadzących badania z użyciem hodowli komórkowych rutynowo powinno wykonywać się badania na obecność typu 1 i typu 2 wirusa BVD-MD. Kontaminacja hodowli komórkowych wirusem BVD-MD jest częściej spotykana niż w przypadku innych patogenów bydła ze względu na powszechnie występujące zakażenia tym wirusem w populacji bydła na całym świecie oraz

zdolność wywoływania trwałego zakażenia płodów drogą łożyskową (10, 13). Brak stałego monitorowania zwierząt bądź też stosowanie mało czułych metod wykrywania pestiwirusów może doprowadzić do rozprzestrzenienia się wirusa w populacji bydła. Przypadek taki zanotowano na początku lat 90., gdy zastosowanie zanieczyszczonej wirusem szczepionki dało początek epizootii nowego wtedy typu 2 wirusa BVD-MD, który w kolejnych latach rozprzestrzenił się na cały świat (2). Do podobnej sytuacji może dojść przy udziale nowych pestiwirusów typu Hobi (BVDV-3), które, mimo że zostały wykryte w surowicy płodowej pochodzącej z Brazylii, mogły się już rozprzestrzenić w Europie (4, 17). Dlatego też wykonane badania skierowane były na wprowadzenie i ocenę szybkiej i czulej metody real time RT-PCR do wykrywania typu 1 wirusa BVD-MD występującego w Polsce (15) oraz nowego typu 3. Oprócz analizy próbek surowicy przeprowadzono ocenę możliwości zastosowania testu do

analizy ewentualnej kontaminacji komercyjnie dostępnych surowic płodowych bydła szczepami BVDV-1 i BVDV-3 (poddanych uprzednio obróbce termicznej lub inaktywowanych promieniami gamma). W 6 z 10 badanych próbek płodowej surowicy bydłowej pochodzących od 3 różnych dostawców z Australii lub z Ameryki Południowej stwierdzono kontaminację typem 3 wirusa BVD-MD. W trzech z tych próbek dodatkowo potwierdzono jednoczesną kontaminację typem 1. W niniejszym opracowaniu opisano wykrycie typu 3 wirusa BVD-MD w płodowej surowicy bydłowej po raz pierwszy w Polsce.

Real time RT-PCR okazał się również przydatny do badania próbek zbiorczych mleka. Wśród 10 przebadanych próbek mleka spożywczego pochodzącego z mleczarni z województw lubelskiego i mazowieckiego typ 1 wirusa wykryto w 3 próbkach, natomiast wszystkie badania w kierunku typu 3 dały wyniki ujemne. Zastosowanie real time RT-PCR w badaniach próbek mleka zbiorczego oraz od pojedynczych zwierząt w celu identyfikacji zwierząt trwale zakażonych w stadzie wydaje się prostą i mało inwazyjną metodą w porównaniu z badaniem krwi i czasochłonnym testem izolacji czy mniej czułym testem ELISA (5, 16).

Czułość analityczna zastosowanego real time RT-PCR dla szczepu referencyjnego Singer (typ 1) wyniosła 5 TCID₅₀ i była 20 razy wyższa od czułości oznaczonej dla szczepu NADL (100 TCID₅₀) przez Baxiego i wsp. (3). Dodatkowo oznaczono czułość testu w odniesieniu do standardu RNA wirusa NADL, która wyniosła 200 kopii na reakcję. W badaniach Stadejka i wsp. (18) uzyskano czułość na poziomie 400-40 000 kopii dla szczepu wirusa BVD-MD w zależności od użytego zestawu do real time RT-PCR. Czulość uzyskana w badaniach własnych dla typu 1 była porównywalna z czułością dla typu 3 i jednocześnie była identyczna z czułością oznaczoną pierwotnie przez Liu i wsp. (9), którzy jako pierwsi wprowadzili tę metodę do wykrywania wirusów z grupy Hobi (17). 100% specyficzność obu metod real time RT-PCR została potwierdzona w badaniach z użyciem próbek surowicy od cieląt wolnych od zakażenia wirusem BVD-MD. Nieznaczące różnice w wykrywaniu typu 1 i typu 3 między real time RT-PCR i antygenowym testem ELISA związane były prawdopodobnie albo z wyższą czułością testu RT-PCR, albo ze specyfiką testów ELISA (płytki ELISA opłaszczone są przeciwciałami specyficznymi dla typu 1). Reakcje krzyżowe między przeciwciałami dla typu 1 a antygenem typu 3 wymagają dalszych badań.

Podsumowując, zastosowana metoda real time RT-PCR dla typu-1 i typu-3 wirusa BVD-MD okazała się wysoce czułą i swoistą techniką, pozwalającą na wykrycie materiału genetycznego wirusa w różnych próbkach, nawet jeśli jego wykrycie w teście izolacji i ELISA było niemożliwe z powodu procesów inaktywacji wirusa, takich jak: wysoka temperatura, promie-

niowanie gamma czy też obecność przeciwciał neutralizujących wirus.

Piśmiennictwo

1. *Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H. J., Becher P.*: Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 2001, 286, 456-465.
2. *Barkema H. W., Bartels C. J., van Wuijckhuise L., Hesselink J. W., Holzhauser M., Weber M. F., Franken P., Kock P. A., Bruschke C. J., Zimmer G. M.*: Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 2001, 126, 158-165.
3. *Baxi M., McRae D., Baxi S., Greiser-Wilke I., Vilcek S., Amoako K., Deregt D.*: A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 2006, 116, 37-44.
4. *Decaro N., Mari V., Lucente M. S., Colainni M. L., Cirone F., Losurdo M., Cordioli P., Buonavoglia C.*: Virus della diarrea bovina tipo 3 associato a malattia respiratoria. XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Genova 27-29. 10.2010, s. 96-97.
5. *Drew T. W., Napp F., Paton D. P.*: The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 1999, 64, 145-154.
6. *Frölich K., Jung S., Ludwig A., Lieckfeldt D., Gibert P., Gauthier D., Hars J.*: Detection of a newly described pestivirus of Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in France. *J. Wildl. Dis.* 2005, 41, 606-610.
7. *Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H.*: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1991, 88, 7276-7280.
8. *Kirkland P. D., Frost M. J., Finlaison D. S., King K. R., Ridpath J. F., Gu X.*: Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Res.* 2007, 129, 26-34.
9. *Liu L., Xia H., Belák S., Baule C.*: A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *J. Virol. Methods* 2008, 154, 82-85.
10. *Makoschey B., v. Gelder P. T. J. A., Keijsers V., Goovaerts D.*: Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals* 2003, 31, 203-208.
11. *Pejsak Z., Truszczyński M.*: Zespół zapalenia mięśnia sercowego prosiąt ssących – nowa wirusowa choroba świń. *Życie Wet.* 2007, 82, 734-736.
12. *Pellerin C., van den Hurk J., Lecomte J., Tijssen P.*: Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 1994, 203, 260-268.
13. *Polak M. P., Rola J., Żmudziński J. F.*: Contamination of fetal bovine serum with bovine viral diarrhoea virus. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2008, 52, 501-505.
14. *Polak M. P., Żmudziński J. F.*: Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Vet. Microbiol.* 1999, 64, 253-257.
15. *Polak M. P., Żmudziński J. F.*: Genotypowanie krajowych izolatów wirusa BVD-MD. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 913-1004.
16. *Renshaw R. W., Ray R., Dubovi E. J.*: Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000, 12, 184-186.
17. *Schirrmeyer H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B., Beer M.*: Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 3647-3652.
18. *Stadejek T., Podgórska K., Pejsak Z.*: Zastosowanie Real Time PCR do wykrywania zakażeń pestiwirusowych. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 165-169.
19. *Stahl K., Kampa J., Alenius S., Persson Wadman A., Baule C., Aiumlamai S., Belak S.*: Natural infection of cattle with an atypical „HoBi”-like pestivirus – implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.* 2007, 38, 517-523.

Adres autora: dr Magdalena Larska, Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), BOX 7054, SE 750 07 Uppsala, Szwecja; e-mail: magdalena.larska@kv.slu.se