

Een BVDV type 2a-besmetting op een melkveebedrijf in België

A bovine viral diarrhoea virus type 2a infection on a Belgian dairy farm

¹J. Maris, ²J. Laureyns, ²S. Sarrazin

¹ Boehringer-Ingelheim Belgium, Arianelaan 16, B-1200 Brussel

² Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

SAMENVATTING

In dit artikel wordt het verloop van een bovine virale diarree virus (BVDV) type 2a-besmetting op een Belgisch melkveebedrijf beschreven. In een periode van veertien dagen stierven zeventien volwassen melkkoeien als gevolg van acuut optredende diarree en dehydratie. Van bij het begin van de uitbraak werd aan een infectie met het BVDV gedacht, maar dit vermoeden werd niet meteen door laboratoriumtesten bevestigd. Pas tijdens de vierendertig daaropvolgende maanden kon op verschillende tijdstippen BVDV type 2a worden geïdentificeerd.

ABSTRACT

In this case report, the course of a bovine viral diarrhoea virus infection (BVDV) type 2 in a Belgian dairy herd is described. Within a period of fourteen days, seventeen adult dairy cows died of acute diarrhoea and dehydration. A BVDV infection was suspected from the beginning but this suspicion could not be confirmed by testing. Only during the next thirty-four months at different time points, BVDV type 2a could be identified.

INLEIDING

Bovine virale diarree virussen (BVDV) worden onderverdeeld in twee genotypes (BVDV type 1 en type 2), die elk bestaan uit verschillende subtypes, die dan weer samengesteld zijn uit verschillende BVDV-stammen. Daarnaast bestaat er van elke stam van beide genotypes een niet-cytopathogeen (ncp) en een cytopathogeen (cp) biotype (Peterhans et al., 2010). Waar in Europa BVD type 1 overheersend voorkomt, is in de Verenigde Staten en Canada het voorkomen van beide types ongeveer gelijk (EDQM, Pestivirus contamination, Parijs, 2001). In België wordt vooral BVDV type 1 aangetoond (Couvreux et al., 2002), maar ook BVDV type 2-stammen werden reeds geïsoleerd (Letellier et al., 2010). In een preliminaire studie uitgevoerd door het referentielaboratorium Coda-Cerva (het huidige Sciensano) werd op honderd BVD-Ag-positieve bloedstalen (Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen Test Kit/Serum Plus, Idexx, Zwitserland) afkomstig van bedrijven verspreid over heel België, het virus getypeerd met een PCR (real-time PCR; in house test Coda-Cerva; Letellier en Kerkhofs, 2003). In dit onderzoek werd 4,42 % van de stalen getypeerd als BVDV type 2.

Hoewel ook BVDV type 1 zich klinisch kan manifesteren met onder meer erge bloedingsverschijnselen (Amaridis et al., 2004; Laureyns et al., 2011; Laureyns et al., 2013), worden BVDV-uitbraken met erge klinische verschijnselen, waaronder bloedingen ("hemorrhagic disease") vooral geassocieerd met BVDV type 2 (Pellerin et al., 1994; Blanchard et al., 2010; Doll et al., 2013). Anderzijds verlopen besmettingen met BVDV type 2, net als bij type 1, ook veelal mild tot subklinisch (Bolin en Grooms, 2004).

CASUÏSTIEK

Op het melkveebedrijf waar de uitbraak plaats vond, waren bij het optreden van de eerste ziekteverschijnselen 179 dieren aanwezig en werden er ongeveer 100 koeien gemolken. De melkkoeien bleven het hele jaar door op stal, maar het jongvee maakte soms een korte weideperiode door. De melkveestal was een klassiek model met roostervloer en voldoende lig- en vreetplaatsen in verhouding tot het aantal runderen. Een afkalfbox bevond zich aanpalend aan de ruimte waar de melkkoeien verbleven en daarnaast werden de droogstaande koeien ondergebracht. In een andere

stal die zich op korte afstand van de melkveestal bevond, werden de kalveren en het jongvee gehuisvest volgens leeftijd. Op het vlak van bioveiligheid werden verscheidene voorzorgen genomen: bedrijfskleedij en -laarzen waren aanwezig en direct contact met buurtbedrijven was onmogelijk; aangekochte dieren werden steeds via het aankoopprotocol van Dierengezondheid Vlaanderen (DGZ) onderzocht op BVDV via Ag ELISA (Bovine Viral Diarrhoea virus Antigen Test Kit/Serum Plus, Idexx, Zwitserland).

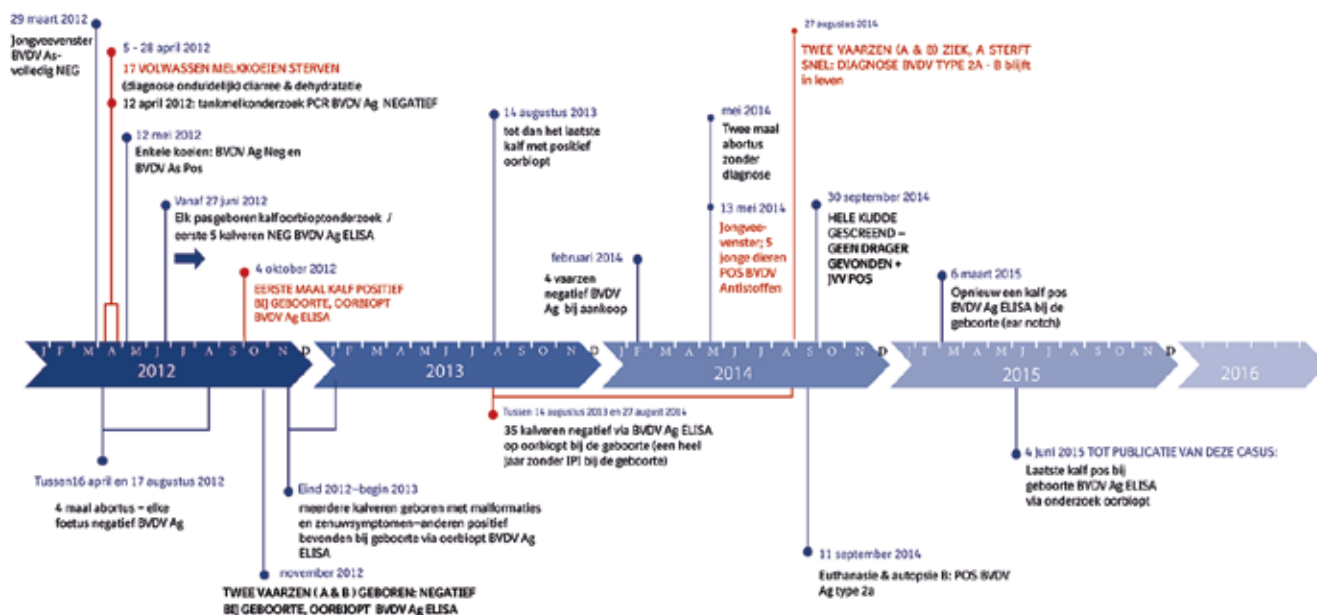
Een maand vóór het optreden van de eerste klinische symptomen had de bedrijfsdierenarts een jaarlijks serologisch BVDV-jongveevenster (SJV) genomen om de BVDV-status van het bedrijf te monitoren. Hiervoor werd van tien jonge dieren tussen zes en twaalf maanden oud een serumstaal onderzocht op BVDV-antistoffen (SERELISA BVD p80 Ab Mono Blocking, Synbiotics, Frankrijk) om zo een eventuele recente BVDV-circulatie op het bedrijf te detecteren.

In de loop van de maand april 2012 werd de bedrijfsdierenarts ontboden, omdat er over een periode van ruim drie weken negentien volwassen melkkoeien ziek waren geworden met een abrupte daling in de melkproductie als gevolg (van gemiddeld 26,5 L/koe/dag naar gemiddeld 16 L/koe/dag). De koeien hadden hoge koorts (boven 40°C) en erge, waterige diarree met soms een hemorragisch aspect. Getroffen dieren dehydrateerden snel en in een periode van enkele uren tot dagen ging de algemene conditie in die mate achteruit dat ze in decubitus gingen. Behandelingen met antibiotica, ontstekingsremmers en rehydraterende oplossingen gaven geen resultaat. Tussen 5 en 28 april 2012 stierven zeventien van de negentien koeien met bovenvermeld ziektebeeld binnen de vier dagen na aanvang van de klinische verschijnselen. Alle andere koeien van de kudde produceerden gedurende vier tot vijf dagen minder melk, hadden een verhoogde rectale temperatuur (tot 39,5 °C) en soms iets te slappe feces.

Ondanks het feit dat alle geanalyseerde bloedstalen van het genomen SJV seronegatief waren, werd er toch van bij de start van de problemen gedacht aan een BVDV-infectie. Omdat de beschreven verschijnselen zich eveneens bij een *Salmonella*-infectie kunnen voordoen, werd er bij enkele zieke koeien serologisch (Prionics PrioCHECK Salmonella Ab bovine, ELISA for in vitro detection of antibodies against Salmonella plasma and serum of Cattle, Zwitserland) en bacterieel mestonderzoek ter detectie van *Salmonella* uitgevoerd. De resultaten van deze onderzoeken waren negatief. Op 12 april 2012 werd er op tankmelk een PCR-onderzoek naar BVDV (BVD Ag PCR; Adiavet BVD REALTIME, Adiagene, Frankrijk) uitgevoerd en een antistoffentest voor *Salmonella* (Prionics PrioCHECK Salmonella Ab bovine, ELISA for in vitro detection of antibodies against Salmonella plasma and serum of Cattle, Zwitserland), beide met negatief resultaat. Een maand later werden enkele koeien bemonsterd voor bloedonderzoek naar antistoffen tegen

Anaplasma phagocytophilum (A. phagocytophilum Ac. in-house indirect immunofluorescence test, Laboratoire de développement et d'analyses zoopole Ploufragan, Frankrijk), *Leptospira* Hardjo (PrioCHECK L. hardjo Ab, Prionics, Zwitserland), *Salmonella spp.* (Prionics PrioCHECK Salmonella Ab bovine, ELISA for in vitro detection of antibodies against Salmonella plasma and serum of Cattle, Zwitserland), schmallenbergvirus (ID Screen Schmallenberg virus Indirect Multi-species; ID vet, France), BVDV (SERELISA BVD p80 Ab Mono Blocking, Synbiotics, Frankrijk) en ook voor BVDV-antigeen (Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen Test Kit/Serum Plus, Idexx, Zwitserland). Alle resultaten waren negatief behalve bij enkele oudere koeien waarbij BVDV-antistoffen werden aangetroffen. Er werden geen gepaarde sera genomen om seroconversie aan te tonen. Vanaf 27 juni 2012 werd van elk pasgeboren kalf een oorbiopt genomen voor BVDV Ag ELISA (Bovine Viral Diarrhoea virus Antigen Test Kit/Serum Plus, Idexx, Zwitserland) onderzoek. De eerste vijf pasgeboren kalveren testten negatief. Op 4 oktober 2012 werd een eerste oor-biopt BVDV Ag positief bevonden. Vanaf die dag tot begin 2013 werden er zestien kalveren geboren die ofwel niet levensvatbaar waren of aan ernstige ataxie leden (Figuur 1). Afgaand op het voorheen al BVDV-positieve oorbiopt en om kosten te besparen, werd besloten om deze kalveren niet te testen en dadelijk te euthanaseren. Bij deze dieren werd er geen post-mortemonderzoek uitgevoerd. Kalveren zonder zichtbare afwijkingen bij de geboorte werden wel getest. Wanneer ze een positief resultaat vertoonden, werden ze onmiddellijk geëlimineerd. Tussen 16 april en 17 augustus 2012 aborteerden er vier koeien. Telkens werd het standaardabortusprotocol van DGZ uitgevoerd en daarbij waren de BVDV Ag ELISA-testen bij de foetus telkens negatief. Op 14 augustus 2013 werd een voorlopig laatste BVDV Ag positief-kalf gedetecteerd via een oorbiopt. Vanaf die dag tot 27 augustus 2014 werden er 35 pasgeboren kalveren getest via dezelfde procedure (oorbiopt, onderzocht met Ag-ELISA), met alle een negatief resultaat. In februari 2014 werden vier vaarzen aangekocht die bij aankoop alle negatief waren voor BVDV Ag. Twee koeien aborteerden in mei 2014, maar in beide gevallen kon het BVDV niet worden aangetoond in de vrucht (miltweefsel onderzocht met Ag-ELISA). Op 13 mei 2014 werd er opnieuw een SJV genomen. Van de vijf jonge dieren getest voor BVDV-antistoffen waren er toen drie positief.

Op 27 augustus 2014 verzocht de veehouder de bedrijfsdierenarts om twee vaarzen (vaars A en vaars B) van ongeveer 21 maanden oud te onderzoeken. Vaars A vertoonde hoge koorts, diarree en een zeer snelle verslechtering van de algemene toestand. Het dier stierf een dag later. Vaars B was volgens de veehouder altijd in groei achtergebleven ten opzichte van haar leeftijdsgenoten. Uit een bloedanalyse (BVDV Ag ELISA, Bovine Viral Diarrhoea virus Antigen



Figuur 1. Tijdschema van de gebeurtenissen op het bedrijf van 2012 tot en met 2016.

Test Kit/Serum Plus, Idexx, Zwitserland) bleek dat beide dieren BVDV viremisch waren. De bloedstalen werden doorgestuurd naar Coda-Cerva (het huidige Sciensano), waar het virus als BVDV type 2a werd getypeerd (real-time PCR; Letellier et al., 2003) (Tabel 1). Bij vaars B konden via seroneutralisatie (Coda-Cerva) op dat moment geen antistoffen worden aangetoond tegen BVDV type 1, maar ook niet tegen BVDV type 2. Op 11 september 2014 werd besloten vaars B te euthanaseren. Een post-mortemonderzoek werd uitgevoerd. Er werden meerdere stalen van verschillende organen genomen voor onderzoek naar de aanwezigheid van BVDV. Dit onderzoek gebeurde via real-time PCR en virusisolatie. Naast een oorbiopt waren de andere stalen die van zowat alle weefsels genomen werden positief voor BVDV type 2a (real-time PCR, Coda) (Tabel 2). Op 30 september 2014 werd het hele bedrijf gescreend op BVDV. Alle runderen ouder dan twee maanden werden middels bloedstalen getest via gepoold bloed (PCR-test, DGZ). Alle stalen waren negatief. Tegelijkertijd werd van dertien jonge dieren bloed genomen om antistoffen aan te tonen tegen het BVDV (SERELISA BVD p80 Ab Mono Blocking, Synbiotics, Frankrijk). Deze dieren waren gehuisvest in een hok vlak naast het hok van de twee viremische vaarzen. Tien van de dertien waren posi-

tief voor BVDV-antistoffen, drie stalen waren niet interpreteerbaar. Enkele weken later (10 oktober) waren ook deze drie dieren seropositief. Vijf maanden later, op 6 maart 2015, testte een oorbiopt van een pasgeboren kalf opnieuw positief voor BVDV (BVDV Ag ELISA). Via een bloedonderzoek met real-time PCR werd het aanwezige virus opnieuw getypeerd als BVDV type 2a. Op dezelfde manier werd aangetoond dat er ook op 4 juni 2015 nog een kalf geboren werd dat besmet was met BVDV type 2a.

DISCUSSIE

Differentiaal diagnostisch komen voor bloederige diarree bij volwassen runderen volgende aandoeningen in aanmerking: *Clostridium perfringens*-enterotoxemie, coronavirusinfectie, boosaardige catarraalkoorts (BCK), vergiftiging door eikels en salmonellose. *Clostridium perfringens* kan bij koeien het “hemorrhagische bowel syndroom” veroorzaken, maar dit beperkt zich meestal tot individuele gevallen. Infecties met coronavirus verlopen bij volwassen runderen meestal mild. BCK is in België eerder zeldzaam en naast diarree zijn er bij een uitbraak meestal ook andere ziekteverschijnselen, zoals stomatitis, kerato-conjunc-

Tabel 1. Analyseresultaten vaars A.

Dier	Datum	Situatie	Matrix	Test	Resultaat	Ct
Vaars A	27/08/2014	Acuut gestorven	Bloed	PCR	Pos type 2	22,97

Ct: “cycle time”

Tabel 2. Analyseresultaten vaars B.

Dier	ID	Datum	Situatie	Matrix	Ct
	B	27/08/2014	Verdenking BVDV type 2	Bloed	20,93
Vaars B	B	9/09/2014	Staalname 2 dagen vóór autopsie	Bloed Serum	20,51 26,69
	B	11/09/2014	Staalname dag van autopsie	Bloed Serum Oorbiopt Inguinale lymfeknoop (ln) Ileum Lever Milt Nier Hart Long Retrofaryngeale lymfeknoop Submandibulaire lymfknoop Pulmonaire lymfeknoop Huid Prescapulaire lymfeknoop Retromammaire lymfeknoop Uterus Blaas Ovarium Hersenen Prescapulaire lymfeknoop (abnormaal aspect) Letsel linkerneusgat Ileosacrale lymfeknoop Tonsillen Ileoecale lymfeknoop	22,74 26,54 26,99 (Fresh) 23,72 23,70 24,34 22,50 28,15 26,79 23,30 23,61 23,80 24,86 24,88 22,52 22,76 22,76 23,54 21,26 24,71 23,10 22,68 23,37 22,32 23,17

Ct: "cycle time"

tivitis of stoornissen van het centrale zenuwstelsel. Eikelvergiftiging kon in de voorliggende casuïstiek uitgesloten worden op basis van de anamnese. Naast de vastgestelde BVDV-besmetting is salmonellose ook een mogelijke oorzaak in deze casus. Er werd niet onderzocht of er seroconversie was, maar fecesonderzoek naar *Salmonella* was negatief. Zelfs al zou *Salmonella* in de voorliggende casuïstiek een rol gespeeld hebben, dan nog is het aantonen van het BVDV in de kudde van belang. Er werd immers aangetoond dat de klinische gevolgen van salmonellose door immunosuppressie bij transiënte infecties erger kunnen worden (Daly en Neiger, 2008).

De herkomst van de besmetting die de eerste ernstige uitbraak met sterfte van volwassen melkkoeien in april 2012 veroorzaakte, kon niet worden achterhaald. Hoewel een eenmalig genomen SJV niet altijd representatief is, kan er op basis van de negatieve uitslag van het SJV van 29 maart 2012 en het optreden van de erge ziekte tekens vanaf begin april 2012 vermoed worden dat het BVDV type 2a omstreeks maart

2012 op het bedrijf werd binnengebracht en dat dit virus hoogstwaarschijnlijk de oorzaak is geweest van de ernstige ziekte tekens.

De zieke vaarzen van augustus 2014 werden bij hun geboorte in 2012 aan de hand van een oorbiopt BVDV-negatief bevonden. Een van de vaarzen, vaars B, was daarentegen wel BVDV type 2a-positief bij autopsie. Wanneer vanaf 18 november 2012 (de geboortedag van dat dier) teruggerekend wordt, dan is de kritische periode voor intra-uteriene BVDV-besmetting van dit rund te situeren tussen maart en mei 2012. Dit is de periode waarin zich de erge klinische uitbraak met de sterfte van volwassen melkkoeien voordeed. Het is dus mogelijk dat vaars B als foetus intra-uterien besmet werd, dus persistierend geïnfecteerd (PI) was en dat de oorbiopttest bij de geboorte van die vaars valsnegatief is geweest. BVDV-Ag ELISA's zijn zeer betrouwbaar maar valsnegatieve resultaten zijn niet uit te sluiten (Fux en Wolf, 2012). Vooral wanneer het oorbiopt niet onmiddellijk na de geboorte genomen wordt, is er kans op een valsnegatieve uitslag, om-

dat er reeds colostrale antistoffen aanwezig zijn die de hoeveelheid virus in weefsels doen dalen (Fux en Wolf, 2012). Hoewel waarschijnlijk, is in deze casus echter niet bewezen dat vaars B een PI-rund was, omdat het interval tussen de twee staalnamen, i.e. vijftien dagen, daarvoor te kort was. Transiënt BVDV-geïnfecteerde runderen zijn meestal niet langer dan tien dagen viremisch, maar in sommige gevallen duurt de viremie langer (Müller-Doblies et al., 2004; Sarrazin et al., 2014a). Vooral bij de meest virulente BVDV-stammen blijven weefsels langer besmet en is er dus ook kans op een langer durende viremie (Liebler-Tenorio et al., 2003). Daarom wordt de infectie pas als hoogstwaarschijnlijk persisterend beschouwd, als er een interval van minimum 21 dagen tussen de twee staalnamen ligt. Er werd echter aangetoond dat transiënt besmette runderen in sommige gevallen zelfs nog langer Ag ELISA-positief kunnen blijven (Hanon et al., 2012). In het voorliggende geval werden er op meerdere organen van vaars B na euthanasie een PCR-test (real-time PCR; Letellier et al., 2003) en virusisolatie uitgevoerd (Tabel 2). De “cycle time” (ct)-waarden van deze onderzoeken werden genoteerd. Hoe lager een ct-waarde, hoe hoger de aanwezige hoeveelheid virus. Ct-waarden onder 24,79 zijn een indicatie van persisterende infectie (Hanon et al., 2012). In het voorliggende geval waren alle analysesresultaten positief voor BVDV type 2, getest via de PCR-methode en virusisolatie. Met genotypering werd aangetoond dat het een niet-cytopathogene BVDV type 2a-stam betrof. De seroneutralisatietest (voor de detectie van antistoffen) was negatief voor BVDV type 1 en 2. Een BVDV Ag ELISA-hertest van een oorbiopt op het moment van euthanasie was positief voor BVDV Ag (BVDV Ag ELISA).

Het kalf dat in maart 2015 positief was bevonden, werd wellicht intra-uterien besmet op het moment dat de twee positief geteste, zieke vaarzen werden geïdentificeerd, namelijk in augustus 2014. Op 30 september 2014 werd het hele bedrijf gescreend maar werd er geen drager gevonden. Dit zou het vermoeden kunnen doen rijzen dat de BVDV-circulatie op dit bedrijf gedurende twintig dagen kon onderhouden worden zonder de aanwezigheid van dragers. De moeder van het kalf geboren in juni 2015 werd ten vroegste begin september 2014 bevrucht en kon dus niet besmet worden door een drager op het bedrijf. Om te kunnen concluderen dat er in de voorliggende casus wel sprake was van verspreiding door transiënt geïnfecteerde runderen, moet kunnen aangetoond worden dat bij het opsporen van PI-runderen geen fouten werden gemaakt (Lindberg en Houe, 2005) en dat het bioveiligheidsplan perfect opgesteld en toegepast werd, zodat herinfectie van het bedrijf te voorkomen was (Sarrazin et al., 2014b). Het is echter bekend dat er op verschillende niveaus fouten kunnen gemaakt worden bij het opsporen van dragers (Laureyns et al., 2010).

In het voorliggende geval had de aanwezigheid van het BVDV sneller gedetecteerd kunnen worden.

De vaststelling dat enkele koeien antistoffen hadden tegen het BVDV, wijst op contact. Omdat runderen na een transiënte BVDV-infectie levenslang seropositief blijven, kan echter niet bepaald worden of het contact al dan niet recent gebeurde (Lindberg et al., 2008). Omdat op 4 oktober 2012 een kalf bij de geboorte BVDV Ag-positief (Ag-ELISA op oorbiopt) werd bevonden, kon er geconcludeerd worden dat er BVDV op het bedrijf aanwezig was. Pas op 30 september 2014 werd middels een algemene bedrijfsscreening overgegaan tot het opsporen van BVDV-dragers, hoewel er in 2012 en 2013 nog meer positieve kalveren geboren werden en er op 13 mei 2014 ook nog een positief SJV was. Tussen augustus 2013 en augustus 2014 werden er geen PI-kalveren geboren maar dat is geen reden om aan te nemen dat er in die periode geen BVDV op het bedrijf is geweest. Het systematisch testen van alle pasgeboren kalveren door middel van oorbiopten voorkomt de geboorte van nieuwe PI-kalveren maar is geen methode voor de monitoring van BVDV-besmettingen op een bedrijf (Houe et al., 2006). Jongveevensters zijn het aangewezen middel om BVDV-circulatie op een bedrijf te monitoren, op voorwaarde dat de stalen representatief zijn voor alle jongvee en dat het SJV minstens elke zes maanden herhaald wordt (Houe et al., 2006). Wanneer er echter acute, ernstige ziekteverschijnselen optreden, zoals in de voorliggende casus, dan is het nuttiger om via bloedonderzoek de viremie aan te tonen bij de runderen die nog in de vroeg acute fase ziek zijn. Op die manier wordt een bedrijfsinfectie met BVDV afkomstig van buiten het bedrijf eerder ontdekt dan met een jongveevenster. In de voorliggende casus werden enkele koeien op 12 mei 2012 getest op viremie, maar dat was waarschijnlijk te lang na aanvang van de infectie, waardoor het resultaat negatief was.

DANKBETUIGING

De auteurs danken de praktijkdierenartsen voor het melden en samen opvolgen van deze casus en de betrokken laboratoria voor de medewerking aan het onderzoek.

REFERENTIES

- Amiridis, G.S., Billinis, C., Papanikolaou, T., Psychas, V., Kanteres, D. (2004). Postparturient outbreak of fatal bovine viral diarrhoea in imported pregnant heifers on a dairy farm in Greece. *Veterinary Record* 154, 698-699.
- Blanchard C., Ridpath J. F., Walker Jennifer B., Hietala S. K. (2010). An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a Bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 128-131.
- Bolin S.R., Grooms D. (2004). Origin and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Veterinary*

- Clinics of North America: Food Animal Practice* 20, 51-68.
- Couvreux B., Letellier C., Collard A., Quenon P., Dehan P., Hamers C., Pastoret P.P., Kerkhofs P. (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Research* 85, 17-28.
- Daly R.F., Neiger R.D. (2008). Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport in a beef cow-calf herd associated with exposure to bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233, 618-623.
- Doll, K., Holsteg, M. (2013). BVD virus Type 2 – An outbreak in Germany. *Cattle practice* 21, 216.
- EDQM (2001). Pestivirus contamination of bovine sera and other bovine virus contamination. Paris, March 2001, 29-30.
- Fux R., Wolf, G. (2012). Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: a pitfall for BVDV eradication programmes? *Veterinary Microbiology* 161, 13-19.
- Hanon J.B., Van der Stede Y., Antonissen A., Mullender C., Tignon M., van den Berg T., Caij B. (2014). Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea (BVD) control programme: appropriate interpretation of real-time RT-PCR and antigen-ELISA test results. *Transboundary and Emerging Diseases* 61 (2), 156-162.
- Houe H., Lindberg A., Moennig V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 427-436.
- Laureyns J., Ribbens S., de Kruif A. (2010). Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. *Veterinary Journal* 184, 21-26.
- Laureyns J., Pardon B., Letellier C., Deprez P. (2011). Periparturient infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 causes hemorrhagic proctocolitis in a cow. *Canadian Veterinary Journal* 52, 1135-1139.
- Laureyns J., Pardon B., Caij A.B., Sarrazin S., Deprez P. (2013). Spontaneous bleeding in a neonatal calf persistently infected with BVDV1b. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82, 87-89.
- Letellier C., Kerkhofs P., (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus: *Journal of Virological Methods* 114 (1), 21-27.
- Letellier C., Pardon B., Van Der Heyden S., Deprez P. (2010). Circulation in Belgium of a bovine viral diarrhoea virus type 2 closely related to North American hyper-virulent viruses. *Veterinary Record* 166, 625-627.
- Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F., Neill J.D. (2003). Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. *Biologicals* 31, 119-122.
- Lindberg A., Houe H. (2005). Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine* 72, 55-73.
- Lindberg A., Niskanen R., Alenius S. (2008). Persistence of antibodies to type 1 BVDV after natural infection and fetal protection against challenge with a strain of a homologous genotype. In: *Proceedings of the 7th ESVV Pestivirus Symposium*. Uppsala, Sweden, p. 62.
- Müller-Doblies D., Arquint A., Schaller P., Heegaard P.M.H., Hilbe M., Albin S., Abril C., Tobler K., Ehrensperger F., Peterhans E., Ackerman M., Metzler A. (2004). Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 302-312.
- Pellerin C., Van Den Hurk J., Lecomte J., Tijssen P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- Peterhans E., Bachofen C., Stalder H., Schweizer M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research* 41, 44.
- Sarrazin S., Dewulf J., Matthijs E., Laureyns J., Mostin L., Caij AB. (2014). Virulence comparison and quantification of horizontal bovine viral diarrhoea virus transmission following experimental infection in calves. *Veterinary Journal* 202 (2), 244-249.
- Sarrazin S., Cay A.B., Laureyns J., Dewulf J. (2014b). A survey on biosecurity and management practices in selected Belgian cattle farms. *Preventive Veterinary Medicine* 117 (1), 129-139.