

# Kesesuaian Uji Antigen Capture Enzyme Linked Immunosorbant Assay dan Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction untuk Diagnosis Rutin Bovine Viral Diarrhea

*The agreement of the Antigen Capture Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction for Routine Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea*

Sri Handayani Irianingsih<sup>1)\*</sup>, Dessie Eri Waluyati<sup>1)</sup>, Desi Puspita Sari<sup>1)</sup>, Hastari Wuryastuty<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta

<sup>2)</sup>Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

## Article history

Received: Jan 19, 2021;

Accepted: Aug 18, 2021

\* Corresponding author:

E-mail:

sh.rianingsih@pertanian.go.id

DOI:

10.46549/jipvet.v11i3.162



## Abstract

Bovine Viral Diarrhea (BVD) is one of the main causes of impaired productivity and reproduction of cows. Antigen capture Elisa (ACE) is one of the serological technique that is sensitive, reliable and used regularly for detecting persistent BVD infection individually which simpler than multiplex nested PCR. The aim of this study was to determine the agreement between ACE and multiplex nested PCR as a routine laboratory diagnostic technique to detect the presence of BVD infection. A total of 128 cow serum samples consisting of 63 positive and 65 negative samples based on ACE were used in this study. The samples were collected from active and passive surveillance in dairy and beef cattle conducted by Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates. The serum samples were then tested molecularly using multiplex nested PCR against BVD. The result showed 48 out of 63 BVDV-1 positive samples were found positive BVD antigen whereas 57 of 65 BVDV-1 negative samples were negative using multiplex nested PCR. The agreement value between the two different assays based on statistic analysis using Kappa method was 0.64 and classified a good one. The result concluded that the ACE BVD assay was equally suitable as routine diagnosis to determine BVD infected cattle in the farm.

**Keywords:** Antigen capture ELISA; Bovine viral diarrhea; Kappa; Multiplex nested PCR.

## Abstrak

*Bovine Viral Diarrhea* (BVD) merupakan salah satu penyebab gangguan produktivitas dan reproduksi sapi. *Antigen capture ELISA* (ACE) merupakan salah satu teknik serologis yang sensitif, dapat diandalkan dan digunakan secara teratur untuk mendeteksi infeksi BVD persisten secara individual yang lebih sederhana daripada *multiplex nested PCR*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kesesuaian antara uji ACE dan *multiplex nested PCR* sebagai teknik diagnostik laboratorium rutin untuk mendeteksi adanya infeksi BVD. Sebanyak 128 sampel serum sapi yang terdiri dari 63 sampel positif dan 65 negatif berdasarkan ACE BVDV Antigen Test Kit/Serum Plus (Idexx®) digunakan dalam kajian ini. Sampel serum sapi merupakan koleksi dari surveilans aktif dan pasif pada sapi perah dan potong yang dilakukan Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates. Sampel serum kemudian diuji secara molekuler menggunakan *multiplex nested PCR* terhadap BVD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan teknik *multiplex nested PCR*, 48 dari 63 sampel positif BVDV-1 ditemukan positif untuk antigen BVD sedangkan 57 dari 65 sampel negatif BVDV-1 negatif untuk antigen BVD. Analisis statistik berdasarkan perhitungan metoda Kappa menunjukkan nilai

kesesuaian antara dua uji sebesar 0,64 dan tergolong bagus. Hasil penelitian menunjukkan kesimpulan bahwa uji ACE BVD sesuai sebagai diagnosis rutin untuk menentukan ternak yang terinfeksi BVD di peternakan.

**Kata kunci:** Antigen capture ELISA; Bovine viral diarrhea; Kappa; Multiplex nested PCR.

## PENDAHULUAN

Virus *Bovine Viral Diarrhea* (BVD) merupakan patogen viral pada sapi dan telah menyebar di seluruh dunia serta berdampak ekonomi bagi peternakan (Brodersen, 2014). Virus BVD mempengaruhi hampir semua sistem organ tubuh, termasuk sistem kekebalan (Ammari *et al.*, 2010) sehingga kejadiannya dapat meledak sewaktu-waktu serta sangat merugikan (Sudarisman, 2011). Penurunan produktivitas ternak ditunjukkan dengan gangguan reproduksi, saluran pencernaan, dan saluran pernafasan (King *et al.*, 2021), gangguan pertumbuhan, peningkatan kematian ternak muda, dan pengeluaran ternak lebih dini (Lanyon dan Reichel, 2013; Santman-Berends, *et al.*, 2015).

Diagnosis BVD dengan metoda isolasi virus merupakan standard emas yang dilanjutkan dengan uji identifikasi *immunoenzym staining* (OIE, 2015). Imunohistokimia, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) antigen, dan *real-time RT-PCR* merupakan metode deteksi antigen yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi (Hilbe *et al.*, 2007). Metoda *antigen capture* ELISA (ACE) dan imunohistokimia secara umum mempunyai kesamaan digunakan dalam skrining BVD (Newcomer dan Givens, 2016), namun teknik ACE lebih mudah dibandingkan pembuatan preparat jaringan untuk uji imunohistokimia.

Pengujian *multiplex nested PCR* yang lebih sensitif dikembangkan untuk menentukan genotipe virus BVD (Gilbert *et al.*, 1999) tetapi memerlukan teknik dan tahapan yang lebih kompleks serta kemampuan laboratorik yang tinggi. Analisis PCR asam nukleat BVDV lebih sensitif dibandingkan dengan deteksi antigen, sehingga mampu mendeteksi keberadaan virus pada kondisi infeksi akut dan persisten (Deng *et al.*, 2015). Hewan infeksi persisten ditentukan melalui pengambilan darah dua kali dengan interval minimal 3-4 minggu yang kemudian

dideteksi antigen (OIE, 2015). Identifikasi ternak terinfeksi secara persisten diperlukan dalam pengendalian penyakit BVD sehingga eliminasi sumber penularan virus dapat dilakukan (Newcomer dan Givens, 2016). Keberhasilan program pengendalian dan eradikasi penyakit serta monitoring memerlukan ketersediaan metoda uji yang cepat, ekonomis, sederhana namun sangat sensitif dan spesifik.

Metoda pengujian ACE selain terbukti cepat, murah, dan mudah dilakukan juga mampu mendeteksi infeksi persisten BVDV melalui sampel potongan telinga (Ahmad *et al.*, 2014). Kajian yang dilakukan untuk mengetahui prevalensi BVDV dengan mengevaluasi prevalensi antigen menggunakan ACE dan untuk sapi potong dan yak kurang dari 1% (Deng *et al.*, 2015). Uji ACE untuk deteksi antigen Erns dalam darah baik serum ataupun plasma (OIE, 2015) dapat berperan sebagai alternatif uji yang valid terhadap uji imunohistokimia baik dengan alkaline phosphatase ataupun peroksidase (Ahmad *et al.*, 2014). Beberapa metoda uji ACE telah dipublikasi dan sejumlah kit tersedia secara komersial (OIE, 2015). Tujuan kajian kesesuaian uji ini adalah untuk mengetahui kelayakan uji *antigen capture* ELISA (ACE) sebagai diagnosis rutin laboratorium dalam menentukan infeksi BVD.

## MATERI DAN METODE

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah 128 sampel serum sapi koleksi BBVet Wates Yogyakarta tahun 2013 – 2016. Sampel serum terdiri dari 63 sampel positif dan 65 sampel negatif berdasarkan hasil pengujian ACE. Sampel serum berasal dari surveilans aktif dan pasif sapi perah dan potong yang dilakukan di wilayah kerja Jawa Tengah, Jawa Timur, dan D.I. Yogyakarta. Sebanyak 128 sampel serum sapi yang merupakan koleksi BBVet Wates diuji ELISA antigen BVD.

Sampel serum diekstraksi menggunakan *Viral Nucleic Acid Kit II*, Geneaid® untuk diuji *multiplex nested* PCR.

#### ANTIGEN CAPTURE ELISA (ACE)

Pengujian *antigen capture* ELISA (ACE) menggunakan BVDV Antigen Test Kit/Serum Plus (Idexx®) sebagai uji skrining ternak infeksi persisten BVDV. Antibodi monoklonal anti-Erns sebagai protein yang dilapiskan untuk mendeteksi antigen BVD, Kit pengujian ACE digunakan sesuai dengan instruksi kerja produsen yang dilengkapi kontrol positif dan negatif. Keberadaan antigen BVDV dalam sampel ditentukan oleh nilai OD terkoreksi ( $S-N = \text{sampel A}(450) - NC\bar{x}$ ) setiap sampel. Sampel serum, plasma dan darah utuh diinterpretasikan negatif jika nilai OD ( $S-N \leq 0,3$ ) dan positif jika ( $S-N \geq 0,3$ ).

#### MULTIPLEX NESTED PCR BVD

Reagen untuk reaksi RT-PCR eksternal menggunakan *AffinityScript One-Step RT-PCR Kit*. Reagen untuk PCR tahap kedua (*nested*), multiplex genotyping menggunakan dan *HotStar Taq Mastermix Kit*. Uji *multiplex nested* PCR (*multiplex nPCR*) mengamplifikasi regio NS5B untuk men-skrining genotipe virus BVD. Reaksi PCR dilakukan melalui dua tahap (*nested*), yaitu RT-PCR pada tahap eksternal dan PCR *multiplex genotyping* pada tahap internal (Gilbert *et al.*, 1999).

#### ANALISIS DATA

Data hasil pengujian dianalisis statistik menggunakan metoda kesesuaian uji Kappa dengan memasukkan data ke dalam format Excel.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan total serum sapi potong dan perah sebanyak 128 sampel yang merupakan koleksi BBVet Wates dari kegiatan surveilans aktif dan pasif sejak tahun

2013 hingga 2016. Kondisi sampel serum sudah dipisahkan dari *clotted* dan disimpan dalam -20°C. Sampel diuji terhadap antigen Erns virus BVD menggunakan *antigen capture Enzyme Linked Immunosorbant Assay*/ELISA (ACE). Hasil pengujian menunjukkan 63 dari 128 sampel serum (49%) positif BVD. Pengujian *multiplex nested polymerase chain reaction* (nPCR) juga dilakukan terhadap 128 sampel serum. Sebanyak 15 dari 63 sampel yang positif antigen Erns virus BVD dengan menggunakan ACE menunjukkan negatif *multiplex* nPCR.

Primer spesifik gen NS5B pada tahap internal yang digunakan secara multiplex menghasilkan amplikon 360 bp untuk genotipe BVDV-1 sedangkan 604 bp untuk genotipe BVDV-2. Hasil pengujian tersebut memperlihatkan 56 sampel (44%) termasuk dalam genotipe BVDV-1 dengan terbentuknya pita DNA tunggal ukuran 360 bp. Sampel sisanya negatif BVDV-1 ataupun BVDV-2 karena tidak terbentuk pita DNA pada 360 bp maupun 604 bp. Delapan sampel dari 56 positif BVDV-1 berdasarkan pengujian ACE menunjukkan negatif antigen Erns virus BVD. Hasil elektroforesis amplikon sampel serum pada pengujian multiplex nPCR ditunjukkan **Gambar 1**.

Gen NS5B menyandi RdRP yang bertanggung jawab terhadap transkripsi dan replikasi genom virus BVD. Karakteristik virus BVD telah dilakukan berdasarkan gen NS5B untuk mengetahui variabilitas genetik (Irianingsih *et al.*, 2019) dan analisis pohon filogenetik untuk mengetahui rekombinasi genetik (Irianingsih *et al.*, 2020). Teknik *multiplex nPCR* berdasarkan parsial gen NS5B dapat digunakan untuk melakukan skrining terhadap genotipe virus BVD sebelum dilakukan tahap sekruensing sebagai peneguhan diagnosa molekular. Hasil pengujian sampel serum terhadap BVD menggunakan teknik *multiplex nPCR* dibandingkan dengan ACE disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil pengujian ACE terhadap *multiplex nPCR* menggunakan 128 sampel serum.

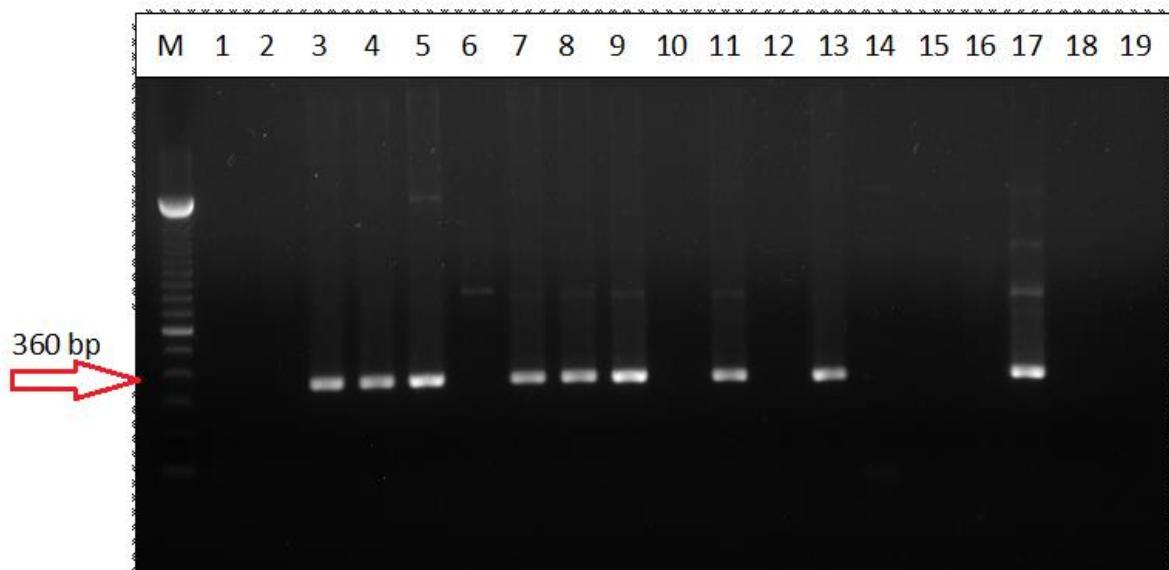
	Multiplex nPCR (+)	Multiplex nPCR (-)	
ACE (+)	48 (a)	15 (b)	63
ACE (-)	8 (c)	57 (d)	65
	56	72	128 (n)

Nilai Kappa uji ACE terhadap *multiplex* nPCR berdasarkan perhitungan menggunakan

*Microsoft excel*, diperoleh angka sebesar 0,64 seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penghitungan nilai Kappa berdasarkan nilai pada Tabel 1.

% Observed agreement	= 82,0 %
% Expected agreement	= 50,0 %
% Actual agreement beyond chance	= 32,0 %
% Potential agreement beyond chance	= 50,0 %
Kappa	0,64



Gambar 1. *Multiplex* nPCR gen NS5B untuk genotyping BVDV-1 menggunakan sampel serum dengan ukuran pita 360 bp. (Kolom M: DNA marker 100 bp; 1, 2, 6, 10, 12, 14-16: sampel negatif BVDV; 3-5, 7-9, 11, 13: sampel positif BVDV-1; 17: kontrol positif BVDV-1 strain Singer, 18: kontrol negatif, 19: *Non Template Control/NTC*).

Pada kajian ini, kesesuaian uji deteksi antigen BVD antara ACE dan *nested multiplex* PCR dibandingkan untuk mengetahui individu terinfeksi BVD. Pengujian ACE menunjukkan positif antigen Erns virus BVD namun negatif BVDV dengan teknik *multiplex* nPCR sebanyak 15 sampel dari 63 serum (24%). Protein Erns sangat spesifik pada hewan terinfeksi virus BVD. Teknik ACE menggunakan sampel serum yang memiliki makna mudah dilakukan di laboratorium. Teknik *multiplex* nPCR ini berdasarkan pada parsial gen NS5B virus BVD yang tidak ditemukan pada 15 sampel tersebut.

Sampel positif antigen Erns virus BVD menunjukkan adanya infeksi aktif yang sedang berlangsung dalam individu tersebut. Protein Erns merupakan protein struktural glikoprotein yang disejresikan sel terinfeksi selama replikasi virus ke lingkungan ekstraseluler dan

dapat dideteksi secara langsung dalam serum (Iqbal *et al.*, 2004; Kampa *et al.*, 2007). Pengujian terhadap antigen Erns memberikan hasil yang tinggi dan potensial untuk diagnosa antigen (Kuhne *et al.*, 2005). Pada fase viremia, virus BVD dapat dideteksi dalam serum, darah, *buffy coat* dan sekresi nasal antara 4 hingga 10 hari post infeksi (Collins *et al.*, 2009). Kemungkinan lain adalah keberadaan gen NS5B dalam struktur genom virus BVD asal sampel serum yang tidak dapat diamplifikasi karena kondisi RNA terdegradasi yang dipengaruhi oleh faktor penyimpanan sampel atau karena sekuen primer yang kurang sesuai dengan sekuen sampel.

Sebanyak 8 dari 65 sampel serum lapangan yang terdeteksi negatif (12%) dengan uji ACE menunjukkan hasil positif BVDV-1 dengan uji *multiplex* nPCR. Sampel negatif antigen Erns menunjukkan individu kemungkinan sedang

dalam tahap awal infeksi sehingga level antigen Erns virus BVD masih belum mencapai batas nilai OD terdeteksi. Gen NS5B yang merupakan gen nonstruktural dapat terdeteksi dengan teknik multiplex nPCR. Hal ini menunjukkan gen NS5B berada dalam level yang sirkulasi darah meskipun dalam tahap awal infeksi karena berfungsi sentral dalam replikasi virus (Isken *et al.*, 2014; Klemens *et al.*, 2015).

Hewan yang terinfeksi virus BVD dapat mengeluarkan sejumlah besar virus dalam serum terutama pada infeksi persisten sehingga serum dapat digunakan sebagai sampel isolasi virus (Chang *et al.*, 2021). Uji ACE dan *realtime RT-PCR* mempunyai sensititas dan spesifitas yang tinggi (OIE, 2015), sedangkan pengujian *multiplex nPCR* yang lebih spesifik dikembangkan untuk menentukan genotipe virus BVD (Gilbert *et al.*, 1999) namun memerlukan teknik dan tahapan yang lebih kompleks serta kemampuan laboratorik yang tinggi. Pemilihan uji diagnostik untuk tujuan skrining perlu mempertimbangkan sensititas dan spesifitas, serta pevalensi penyakit dalam populasi yang diuji. Setiap deteksi pengujian mempunyai kelebihan dan kekurangan, serta penerapan yang sesuai dengan situasi diagnostik (Edmondson *et al.*, 2007). Peluang pengujian ACE untuk dapat dilakukan di lapangan lebih tinggi karena adanya ketersediaan kit secara komersial. Penggunaan jenis sampel serum pada uji ACE memberikan performa yang lebih baik dengan menunjukkan individu terinfeksi BVDV sehingga dapat dilakukan tindakan penanganan penyakit secara cepat, termasuk penentuan infeksi persisten.

Menurut Edmondson *et al.* (2007) penampilan uji ACE terhadap serum mengidentifikasi 91% sampel positif BVDV, imunohistokimia biopsy kulit sebesar 90%, sedangkan uji RT-PCR terhadap serum dan darah utuh masing-masing sebesar 85% dan 93%. Isolasi virus merupakan standard emas yang dilanjutkan dengan uji identifikasi *immunoenzym staining* (OIE, 2015).untuk mengevaluasi dan membandingkan uji PCR sebagai uji diagnostik rutin (Dubovi, 2013). Isolasi virus memerlukan teknik laboratorium yang intensif dan relatif mahal (Saliki dan Dubovi, 2004). Pertimbangan lain teknik RT-

PCR seringkali lebih dipilih daripada isolasi virus karena memiliki keunggulan lebih cepat, sedikit lebih murah, fasilitas lebih sederhana, dan lebih sensitif (Saliki dan Dubovi, 2004). Oleh karena itu, pengujian ACE dievaluasi dengan melihat kesesuaianya dengan uji *multiplex nPCR*.

Nilai kesesuaian uji ACE terhadap *multiplex nPCR* sebesar 0,64 dan berada dalam rentang ( $0,5 \leq \text{kappa} < 0,7$ ) sehingga tergolong dalam kriteria bagus, sedangkan kriteria bagus sekali jika nilai kisaran kappa  $\geq 0,7 - 1,0$  (Budiharta dan Suardana, 2007). Berdasarkan hal ini, pengujian ACE dikatakan memiliki tingkat kesesuaian yang bagus terhadap *multiplex nPCR*. Pengujian ACE dapat direkomendasikan sebagai uji skrining sapi terinfeksi BVDV pada kegiatan surveilans dan monitoring. Laboratorium dapat melakukan uji ACE untuk diagnosis BVD dan uji *genotyping* BVDV dengan *multiplex nPCR* sebagai kelanjutan uji diagnostik.

## KESIMPULAN

Nilai kesesuaian uji berdasarkan perhitungan Kappa sebesar 0.64 tergolong dalam kriteria bagus. Pengujian ACE BVD layak digunakan sebagai diagnosis rutin untuk menentukan individu infeksi BVD dalam suatu areal peternakan.

Pengujian molekular *genotyping* BVDV dengan teknik *multiplex nPCR* disarankan untuk kelanjutan uji diagnostik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Veteriner Wates, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian RI yang telah memberikan ijin penggunaan koleksi sampel dan membiayai melalui dana Pengembangan Metoda.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A., Rabbani, M., Muhammad, K., Younus, M., Shabbir, M. Z., Ghafoor, A., Anjum, A. A., Nazir, J., Saleemi, M.K., Muhammad, J., Ali, A.A., and Cepica, A. 2014. Comparative Diagnostic Applications of Antigen Capture Elisa And

- Immunohistochemistry For Detection of Bovine Viral Diarrhea Persistent Infection. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(4): 2014, Page:1019-1025.
- Ammari, M., McCarthy, F. M., Nanduri, B., and Pinchuk, L. M. 2010. Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. *BMC Bioinformatics*, 11(Suppl 6): S9.
- Brodersen, B. W. 2014. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology*, 51(2): 453–464.
- Budiharta, S., dan Suardana, I. W. 2007. *Buku Ajar Epidemiologi dan Ekonomi Veteriner*. Penerbit Universitas Udayana, p. 146-147.
- Chang, L., Qi, Y., Liu, D., Du, Q., Zhao, X., and Tong, D. 2021. Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus in Western China. *BMC Veterinary Research* 17:66
- Collins, M. E., Heaney, J., Thomas, C. J., Brownlie, J. 2009. Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. *Veterinary Microbiology*, 138(2009): 289–296.
- Deng, M., Ji, S., Fei1,W., Raza1,S., He,C., Chen, Y., Chen1,H., and Guo, A. 2015. Prevalence Study and Genetic Typing of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Four Bovine Species in China. *PLoS ONE* 10(4): e0121718. doi:10.1371/journal.pone.0121718
- Dubovi, E. J. 2013. Biologicals Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, 41 : 8–13.
- Edmondson, M. A., Givens, M. D., Walz, P. H., Gard, J. A., Stringfellow, D. A., Carson, R. L. 2007. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhea virus in diagnostic samples. *J Vet Diagn Invest* 19:376–381.
- Gilbert, S., Burton, K. M., Prins, S. E., and Deregt, D. 1999. Typing of Bovine Viral Diarrhea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR Typing of Bovine Viral Diarrhea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6): 2020–2023.
- Hilbe, M., Stalder, H., Peterhans, E., Haessig, M., Nussbaumer, M., Egli, C., Schelp, C., Zlinszky, K., and Ehrenspurger, F. 2007. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhea virus infection in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19 : 28–34.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S., and McCauley, J. W. 2004. Role for Bovine Viral Diarrhea Virus Erns Glycoprotein in the Control of Activation of Beta Interferon by Double-Stranded RNA. *Journal of Virology*, 78(1): 136-145.
- Irianingsih, S.H., Poermadjaja, B., Wuryastuti, H., and Wasito, R. 2020. Genetic recombination of bovine viral diarrhea virus subgenotype -1a and -1c in persistently infected dairy cattle. *IJBiotech Vol 25 (2)* : 120-126.
- Irianingsih, S.H., Wuryastuty, H., Wasito, R., Wibawa, H., Fadjar, S.T.R., and Poermadjaja, B. 2019. Genetic analysis of NS5B gene from bovine viral diarrhea virus-infected cattle in Central and East Java, Indonesia. *Vet World*. 2019 Jul; 12(7): 1108–1115.
- Isken, O., Langerwisch, U., Schönher, R., Lamp, B., Schröder, K., Duden, R., Rümenapf, T. H., and Tautz, N. 2014. Functional characterization of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 5A by reverse genetic analysis and live cell imaging. *Journal of Virology*, 88(1): 82–98.
- Kampa, J., Ståhl, K., Renström, L. H. M., and Alenius, S. 2007. Evaluation of a commercial E rns -capture ELISA for detection of BVDV in routine diagnostic cattle serum samples. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 7(49): 1–7.
- King,J., Pohlmann,A., Dziadek,K., Beer, M., and Wernike, K. 2021. Cattle connection: molecular epidemiology of BVDV outbreaks via rapid nanopore whole-genome sequencing of clinical samples. *BMC Veterinary Research* 17:242.
- Klemens O, Dubrau D, and Tautz N. 2015. Characterization of the determinants of NS2-3-independent virion morphogenesis of pestiviruses. *Journal of Virology*, 89(22):11668 –11680.

- Kuhne, S., Schroeder, C., Holmquist, G., Wolf, G., Horner, S., Brem, G, and Ballagi, A. 2005. Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle- testing tissue samples derived from ear tagging using an Erns capture ELISA. *Journal of Veterinary Medicine series B-Infectious Disease and Veterinary Public Health*, 52(6): 272-277.
- Lanyon, S. R., and Reichel, M. P. 2013. Understanding the Impact and Control of Bovine Viral Diarrhoea in Cattle Populations. *Springer Science Reviews*, 1(1-2): 85-93.
- Mahlum, C. E., Haugerud, S., Shivers, J. L., Rossow, K. D., Goyal, S. M., Collins, J. E., and Faaberg, K. S. 2002. Detection of bovine viral diarrhea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(2): 120–125.
- Newcomer, B. W., and Givens, D. 2016. Diagnosis and Control of Viral Diseases of Reproductive Importance Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea. *Veterinary Clinic of North America-Food Animal Practice*, 32(2): 425-441.
- OIE, 2015, Bovine Viral Diarrhoea, in OIE *Terrestrial Manual*, pp.:1-22.
- Saliki, J. T., Huchzermeier, R. O. Y., and Dubovi, E. J. 2000. Evaluation of a New Sandwich ELISA Kit That Uses Serum for Detection of Cattle Persistently Infected with BVD Virus. *Annals of New York Academy of Science*, 916(1): 358–363.
- Saliki, J.T., and Dubovi, E. J. 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice*, 20(1): 69–83.
- Santman-Berends, I., Mars, M. H., Duijn, L. Van, and Schaik, G. Van. 2015. Evaluation of the epidemiological and economic consequences of control scenarios for bovine viral diarrhea virus in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 98(11): 7699-7716.
- Sudarisman. 2011. Bovine Viral Diarrhea Pada Sapi di Indonesia Dan Permalahannya. *Wartazoa*, 21(1): 18–24.