

ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES SOUCHES DE LA DIARRHEE VIRALE BOVINE AU MALI

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF STRAINS OF BOVINE VIRAL DIARRHEA IN MALI

DJENEBA SY¹, CLAUDIA.BAULE², FLABOU BOUGOUDOGO³, KARIM TOUNKARA⁴

¹ Centre national d'appui à la lutte contre la maladie, Bamako, Mali

² Département de Virologie, Box 585 SVA SE-751 89 Uppsala, Suède

³ Institut National de Recherche en Santé Publique, BP 1771, Bamako, Mali

⁴ Laboratoire Central Vétérinaire, BP : 2295, Route de Koulikoro, Bamako, Mali

Auteur correspondant : Dr Djeneba Sy, Centre national d'appui à la lutte contre la maladie, Bamako, Mali, syllasyd@yahoo.fr

Résumé

La présente étude a pour objectif de faire une classification génotypique des souches de virus de la Diarrhée Virale des Veaux (BVDV) du Mali. Pour se faire, nous avons procédé à la caractérisation phylogénique des échantillons d'ARN de BVDV de sang bovin provenant de différentes régions du Mali et des échantillons de sérums bovins de la Suède. Les techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et de séquençage sur la portion 5'NCR ont été utilisées pour l'analyse. Au total 7 échantillons du Mali et 11 échantillons de la Suède ont fait l'objet de nos travaux de recherches. Les résultats qui ont été obtenus après analyse montrent une différence entre les souches de BVDV du Mali et celles de la Suède, cette différence est de l'ordre de 15,3 à 26,7%nucléotides. Et l'analyse phylogénique montre que les souches du Mali et de la Suède appartiennent au BVDV type I par comparaison aux souches de références des Etats- Unis, du Canada et les isolats d'Afrique du Sud.

Mots clés : BVDV, sérologie, PCR, séquençage, Mali, Suède.

Abstract

The present study aims to make a genotypic classification of virus strains of Viral Diarrhea of Calves (BVDV) from Mali. To do this, we carried out the phylogenetic characterization of BVDV RNA samples from bovine blood from different regions of Mali and bovine serum samples from Sweden. Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing techniques on the 5'NCR portion were used for the analysis. A total of 7 samples from Mali and 11 samples from Sweden were the subject of our research work. The results which were obtained after analysis show a difference between the strains of BVDV from Mali and those from Sweden, this difference is of the order of 15.3 to 26.7% nucleotides. And the phylogenetic analysis shows that the strains from Mali and Sweden belong to BVDV type I compared to the reference strains from the United States, Canada and the isolates from South Africa.

Key words: BVDV, serology, PCR, sequencing, Mali, Sweden.

1. Introduction

Le genre Pestivirus de la famille des *Flaviviridae* comprenait couramment 4 virus le virus de la diarrhée virale (BVDV-1 et BVDV-2), la fièvre porcine classique (CSFV) la maladie des frontières (BDV) et un isolat de la giraffe. La nouvelle classification des Pestivirus a été proposée en tenant compte des relations antigéniques et génétiques de même que leur espèce d'origine : les Pestivirus type 1 pour le BVDV I, le type 2 pour le CSFV, le type 3 pour le BDV, le type 4 pour le BVDV II, le Pestivirus isolé chez la giraffe, Bison 1 et gazelle 1 (Becher et al., 1997, 1999 et 2003). Les infections à BVDV peuvent être aiguës avec une explosion de diarrhée mais on observe une faible mortalité. On peut avoir quelques fois une leucopénie transitoire.

Lors de l'infection in-utéro qui est due à la souche non cytopathogène, il y a la barrière trans placentaire qui est franchie à tous les âges entraînant une infection du fœtus. Si l'infection a lieu durant les 120 premiers jours de gestation, le système immunitaire n'étant pas encore développé le virus devient persistant, parce qu'il est reconnu 'comme soi', quand le système immunitaire devient compétent l'immuno tolérance se développe. Ces animaux constituent des excréteurs permanents de virus et ceci maintient une endémie virale. La maladie des muqueuses survient généralement chez les animaux avec une infection persistante, âgés de 6 à 24 mois et est invariablement fatale, elle se manifeste par des érosions au niveau de la muqueuse buccale et occasionnellement au dessus des onglons. La mort survient généralement au bout de 3 à 10 jours. L'examen post- mortem révèle des congestions et hémorragies au niveau du tractus digestif et surtout des plaques de Peyers. La maladie des muqueuses entraînent des pertes économiques très importantes dans les élevages laitiers bovins (Brownlie et al., 1984).

Ainsi vu le caractère symptomatique de la maladie des muqueuses qui prête à confusion avec d'autres maladies comme la peste bovine et la fièvre aphteuse, nous nous sommes intéressés dans ces travaux à la caractérisation des souches de BVDV du Mali. Cette caractérisation s'est faite par une comparaison des isolats du Mali avec ceux de la Suède en utilisant les techniques de PCR et de séquençage.

Généralement la classification génétique se fait au niveau des régions conservées du génome viral telles que la portion 5' non transcrite (5'UTR) et la portion 5' non codante (5'NCR) (Vilcek et al., 1999 ; Baule et al., 1997). Dans nos travaux nous avons utilisé la portion 5'NCR pour la caractérisation génétique, et pour la caractérisation phylogénique de nos isolats nous avons comparé nos séquences avec celles des isolats du Mozambique (M/91,92,93,94,95 et 96) et d'Afrique du Sud (S-ALTK, ALTW, BFLW, IFK2w et V063), des souches de références du Canada (Q1111) et des Etats-Unis (NADL, DRAPER, NY-1, OREGON, SD-1, SINGER, et 890).

2. Matériel et méthodes

Echantillons : les échantillons qui ont été utilisés dans nos travaux sont de différentes sources et de différentes sortes. Les échantillons de la Suède sont des sérums prélevés dans différentes fermes dans la région du Gottland située dans le Sud-Est de la Suède, les prélèvements ont été effectués sur des animaux avec une infection persistante et au total 15 échantillons ont été prélevés. Ils ont été analysés par ELISA pour rechercher les positifs. Les ARN ont été extraits directement à partir des échantillons positifs. Ceux du Mali sont des sangs collectés de manière aléatoire dans les

fermes traditionnelles et dans différentes régions donc dans différentes zones climatiques. La technique d'ELISA a été utilisée pour rechercher les échantillons positifs. Les échantillons positifs du Mali, au nombre de 15 aussi ont été traités sur place et les ARN (acides ribonucléiques) ont été amenés en Suède pour le séquençage.

Transfection des cellules par les ARN des différents isolats du Mali

Avant de procéder au séquençage les isolats du Mali ont été recouverts après transfection des ARN aux cellules épithéliales nasales de bovin et les ARN viraux ont été extraits de nouveau après multiplication. La technique est décrite comme suit : les cellules épithéliales nasales de bovin après 24 heures de multiplication dans du EMEM avec 10% de sérum foetal bovin et 1% de L glutamine ont été récupérées par trypsination et résuspendues dans du tampon phosphate salin (PBS) et gardées sur la glace durant les différentes étapes de la manipulation. La transfection des ARN pour recouvrir le virus a été faite par électroporation avec l'appareil de transfection Gene Pulsar X cell (Bio-RAD). Les cellules transfectées ont ensuite été mises en culture dans du EMEM avec 2% de sérum foetal bovin et 1% de L glutamine. Après 3 passages les ARN ont été extraits selon le protocole décrit précédemment.

Reverse transcription-réaction de polymérisation en chaîne

Extraction d'ARN

l'ARN total a été extrait de différents échantillons de la Suède (sérums) en utilisant le TRIZOL comme réactif (Invitrogen) pour tous les échantillons, qui s'est avérée être la méthode la plus simple. Les ARN des isolats du Mali ont été extraits par la même méthode. Le TRIZOL est un réactif à base de phénol, il permet d'éclatement des protéines virales et la libération des génomes viraux.

La synthèse de cDNA : la synthèse de cDNA pour les petites portions se fait avec l'enzyme Moloney-murine leukemia virus (M-MLV) (Invitrogen), et les amorces Random hexa nucléotidiques pds(N)6 (Amers Ham Bioscience) pour la reverse transcription.

Réaction de polymérisation en chaîne : deux tests d'amplification ou "Nested- PCR" ont été utilisés. La première réaction ou PCR I permet l'amplification de 296 bp à l'extrémité 5'NCR à partir des cDNA. La deuxième amplification utilisant des amorces internes au produit de PCR I permet d'amplifier un fragment plus petit de 169 bp de manière plus sensible et plus spécifique.

Purification des ADN

Pour la purification des ADN à partir des produits de PCR I et II, le kit de purification par colonnes avec membrane "Qiaquick PCR purification" (Qiagen) a été utilisé. La vérification des produits purifiés a été faite sur gel d'agarose à 2% plus 1% de bromure d'éthidium pour la coloration à une concentration de 10ng.

Séquençage des nucléotides et analyse phylogénique

Réaction de séquençage des produits de PCR purifiés : les produits de PCR I et II ont été amplifiés linéairement en utilisant les amorces spécifiques dans le sens du génome (Forward) et dans le sens

inverse du génome (Reverse). Pour les produits de PCR I les amorces donnent un produit d'amplification de 296 bp et pour la PCR II, 169 bp.

L'amplification est faite séparément avec les 4 amorces, deux "forward" et deux "reverse" selon le type de produits de PCR.

Réaction de précipitation : elle permet de récupérer les produits amplifiés par précipitation avec du sodium acétate à 3M, pH 4,6 et de l'éthanol glacial à 95%. Cette précipitation permet également une concentration des nucléotides avant le séquençage proprement dit.

Le séquençage : c'est une technique qui permet d'analyser la séquence nucléotidique des génomes viraux. Il permet par comparaison des séquences de plusieurs souches entre elles et entre ses souches et les souches de référence, de rechercher les différences génomiques et aussi d'expliquer l'émergence de nouvelles souches.

Après la précipitation des nucléotides, ils sont resuspendus dans un tampon le Hi-Di formamide, distribués dans les plaques de 96 puits pour analyse. Elle est faite à l'aide d'un appareil le séquenceur GeneAmp (AB: Applied Biosystem), qui est relié à un ordinateur pour enregistrer et traiter les données.

Analyse phylogénique : elle a été faite par comparaison des séquences génomiques des différents isolats entre eux et des isolats avec les souches de références en utilisant le logiciel "DNASTar" qui a différent programme. L'édition des séquences a été fait en utilisant les programmes Seqman et Editseqman. La comparaison des séquences a été faite avec le programme Megalign. L'arbre phylogénique obtenu permet de donner en pourcentage la différence nucléotidique entre les isolats et les souches de références, permettant par la même occasion de les classer dans les différents types de BVDV.

3. Résultats

Echantillons

Il est résumé dans le présent tableau l'origine et le type des échantillons du Mali et de la Suède qui ont été analysés par séquençage de même que le nombre d'échantillons positifs.

Tableau 1 : échantillons analysés par séquençage

Pays	Région	Ech.	ARN	Signes clin.	Nombre Pos
Mali	Péri-urbain	sang total	Surnageant des cellules infectées		Aucun
	Koulikoro	"	"	1	"
	Ségou	"	"	3	"
	Mopti	"	"	1	"
	Gao	sérum	"	1	"
Suède					
	Gottland	Sérum/sang	Extraction directe	11	Infection persistante

Ech.= échantillons Signes clin.= signes cliniques Nombre Pos.= nombre de positifs
ARN = acide ribonucléique (genome des virus)

Résultats de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les résultats de la réaction de polymérisation en chaîne avec les isolats du Mali et ceux de la Suède sont donnés dans les figures qui suivent:

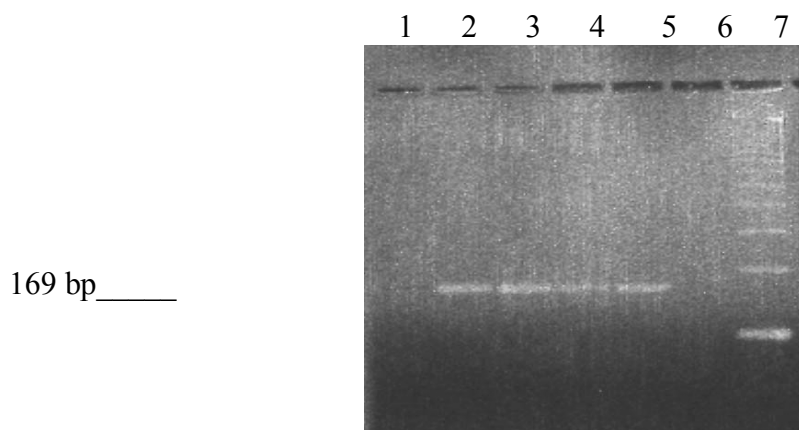


Figure 1 : analyse des souches de la Suède par PCR.

Dans cette figure on observe les résultats de l'analyse des isolats de la suède avec les amorces spécifiques, qui ont permis d'avoir des bandes de 169 bp pour BVDV, après la deuxième amplification (PCR II). De gauche à droite les échantillons 1 à 5 sont les isolats et seuls les numéros 2, 3, 4 et 5 montrent des bandes spécifiques, l'échantillon 1 est négatif. Le numéro 6 étant le contrôle négatif ne montre pas de bandes spécifiques et les bandes du contrôle standard 100 paires de bases.

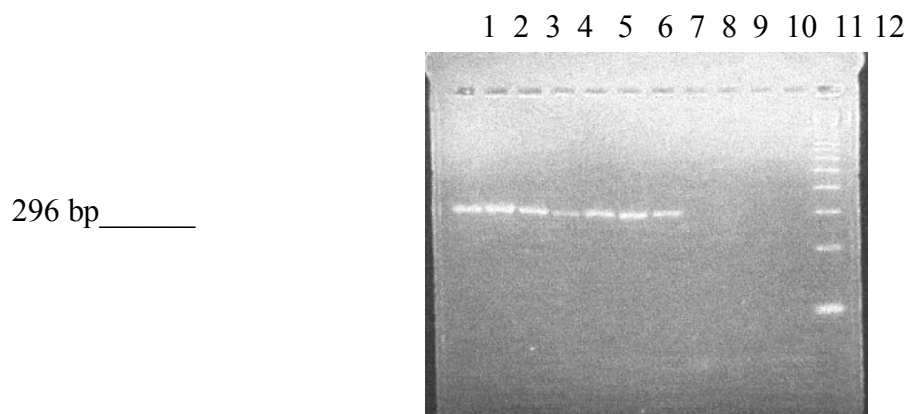


Figure 2 : analyse des souches de la Suède par PCR.

Dans cette deuxième figure, d'autres isolats de la suède ont été analysés avec les mêmes amorces que dans la précédente figure. Les bandes spécifiques au poids moléculaire de 296 bp obtenues après la première amplification (PCR I) ont été obtenues pour les échantillons numéros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Les échantillons 8 et 9 n'ont montré aucune bande spécifique de même que le numéro 10 qui est le contrôle négatif. Les bandes du standard sont dans le dernier puit

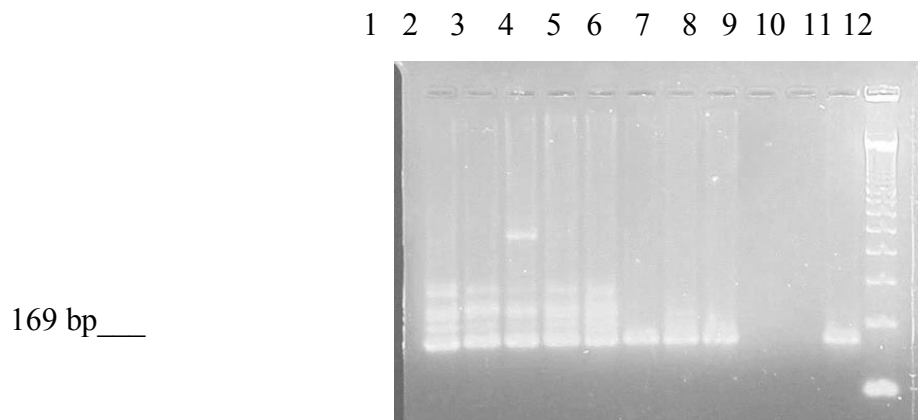


Figure 3: analyse des souches du Mali après transfection des cellules épithéliales nasales de bovin.

Cette figure montre les résultats de l'amplification des isolats du Mali. La particularité est que les ARN qui ont été analysés sont ceux des surnageants des cellules préalablement transfectées. Les bandes spécifiques de 169 bp sont visibles pour les échantillons 1 (Suède), 2, 3 et 4 (Ségou / Mali), 5 (Koulikoro / Mali), 6 (Mopti / Mali), 7 (Péri-urbain / Mali) et 8 le contrôle positif. Les échantillons 9 contrôle négative des cellules transfectées négatif traitées dans les mêmes conditions que celles transfectées et 10 contrôle négatif cellules saines ne montrent aucune bande spécifique. Le numéro 11 montre une bande spécifique au même poids moléculaire pour le contrôle positif extrait directement du surnageant des cellules infectées. Le dernier puit numéro 12 présente les bandes du standard paire de base. Les échantillons qui sont sortis à la PCR I n'ont pas été traités pour la PCR II. Ceux qui ne sont pas sortis à la PCR I ont été traités pour la deuxième PCR.

Résultats de l'analyse de séquençage des nucléotides des échantillons de la Suède et du Mali et arbre phylogénique par comparaison avec les souches de références, les isolats du Mozambique et d'Afrique du Sud.

Les différents produits de PCR I et II purifiés ont été utilisés pour le séquençage. Les résultats du séquençage des isolats du Mali et de la Suède ont été obtenus sous deux groupes de séquence. Un groupe avec le séquençage des longs produits de PCR (296 bp) et un autre groupe à partir des courts produits de PCR (169 bp). Dans les deux cas, les séquences sont générées avec les mêmes amorces utilisées pour la PCR. Avec ces différents produits de la réaction de séquençage il a été produit deux arbres phylogéniques, un pour les séquences longues et un pour les séquences courtes.

Arbre phylogénique pour les séquences longues : sur cet arbre la comparaison des isolats du Mali et de la Suède a été faite avec ceux du Mozambique, de l'Afrique du Sud et avec les souches de références pour BVDV. Les résultats montrent que les 4 isolats longs du Mali (2M, 3M, 4M et 5M) et 4 de la Suède (8C, 11C, 12C et 13C) ont des séquences proches de 3 isolats du Mozambique 2 de M/95 et 1 de M/96; ils sont également proches des souches de références DRAPER et NY-1. Les deux autres isolats de la Suède (7C et 9C) ont des séquences proches des isolats M/94, M/95 et M/96 du Mozambique. L'arbre phylogénique ne montre aucunes séquences

proches des souches de références. Dans les deux cas, il n'y a aucun regroupement avec les isolats d'Afrique du Sud.

Arbre phylogénique avec les séquences nucléotidiques longues (296bp) avec les amorces externes (13A/14A) :

- MRc : isolats du Mali
- CRc : isolats de la Suède
- M : isolats du Mozambique
- Souches de références : NADL, NY-1, OREGON, Q1111, SINGER et SD-1
- S : isolats d'Afrique du Sud

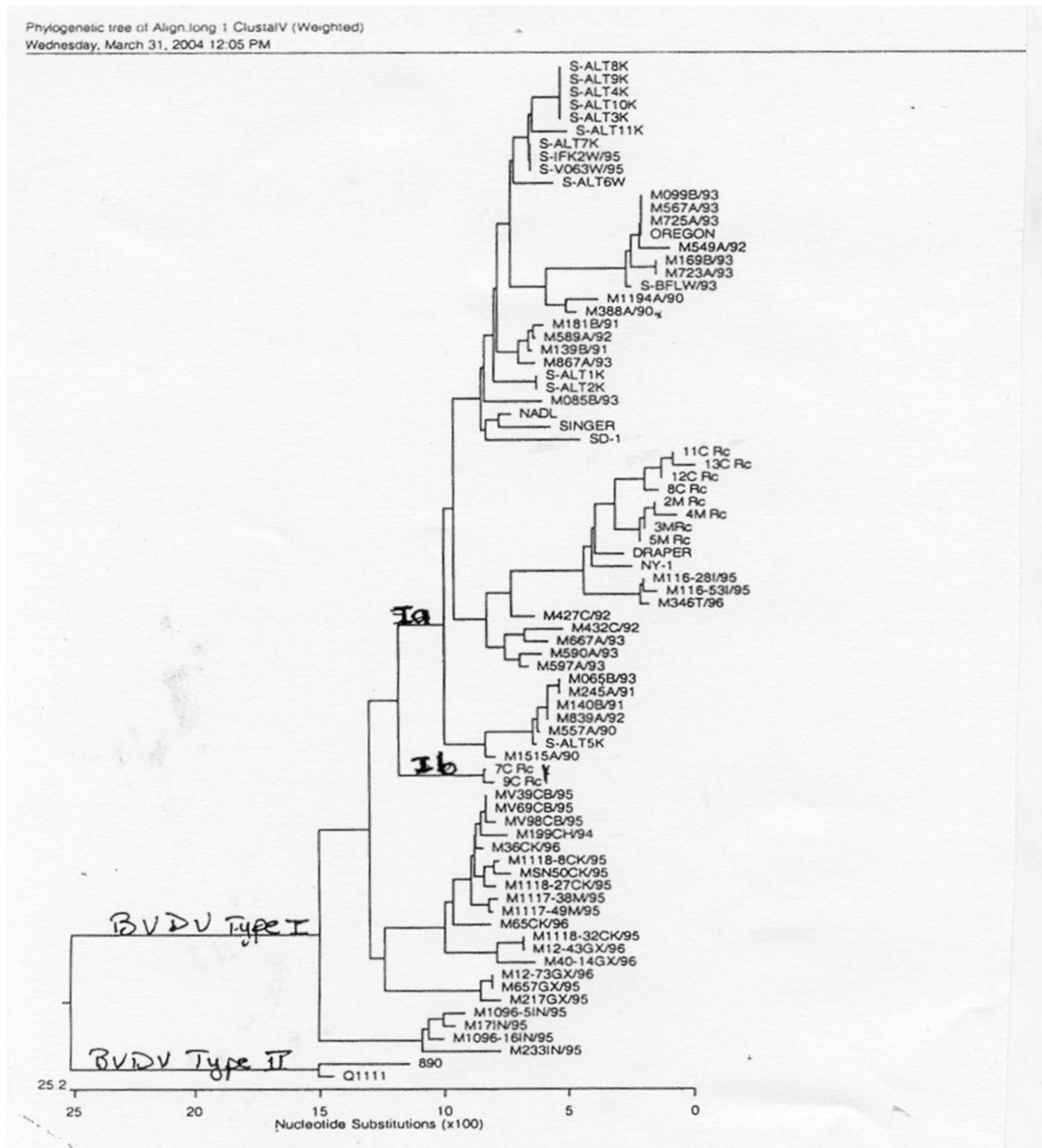


Figure 10 : Arbre phylogénique avec les séquences nucléotidiques longues (296bp) avec les amorces externes (13A/14A) :

Arbre phylogénique pour les séquences courtes: les résultats des séquençages qui ont été obtenus avec les séquences de 169 bp des isolats du Mali (6MRc, 7MRc et 10MRc) et de la Suède (2C, 3C, 5C et 8/233) ont été comparés aux séquences longues des isolats du Mali (2M1, 3M1, 4M1 et 5M1) et de la Suède (7C1, 8C1, 9C1, 11C1 et 12C1) coupées au même niveau que les courts à quelques isolats de Mozambique (M/90, 91, 92, 94, 95 et 96), d'Afrique du Sud et des souches de références. Sur l'arbre phylogénique on peut diviser les isolats en 3 groupes. Le premier groupe comprend les isolats (2C, 9C, 3C, 5C, 7C), qui ont des séquences proches des souches de références NADL, SINGER et SD-1. Le deuxième groupe est un isolat court du Mali 4C qui n'est groupé avec aucun des autres isolats et souches de références. Le troisième groupe comprend tous les isolats du Mali plus 4 isolats de la Suède (8/233, 11C 1, 12C 1 et 8C 1) qui sont proches de deux isolats du Mozambique (M432C/92 et M346T/96) et de deux souches de références Draper et NY-1.

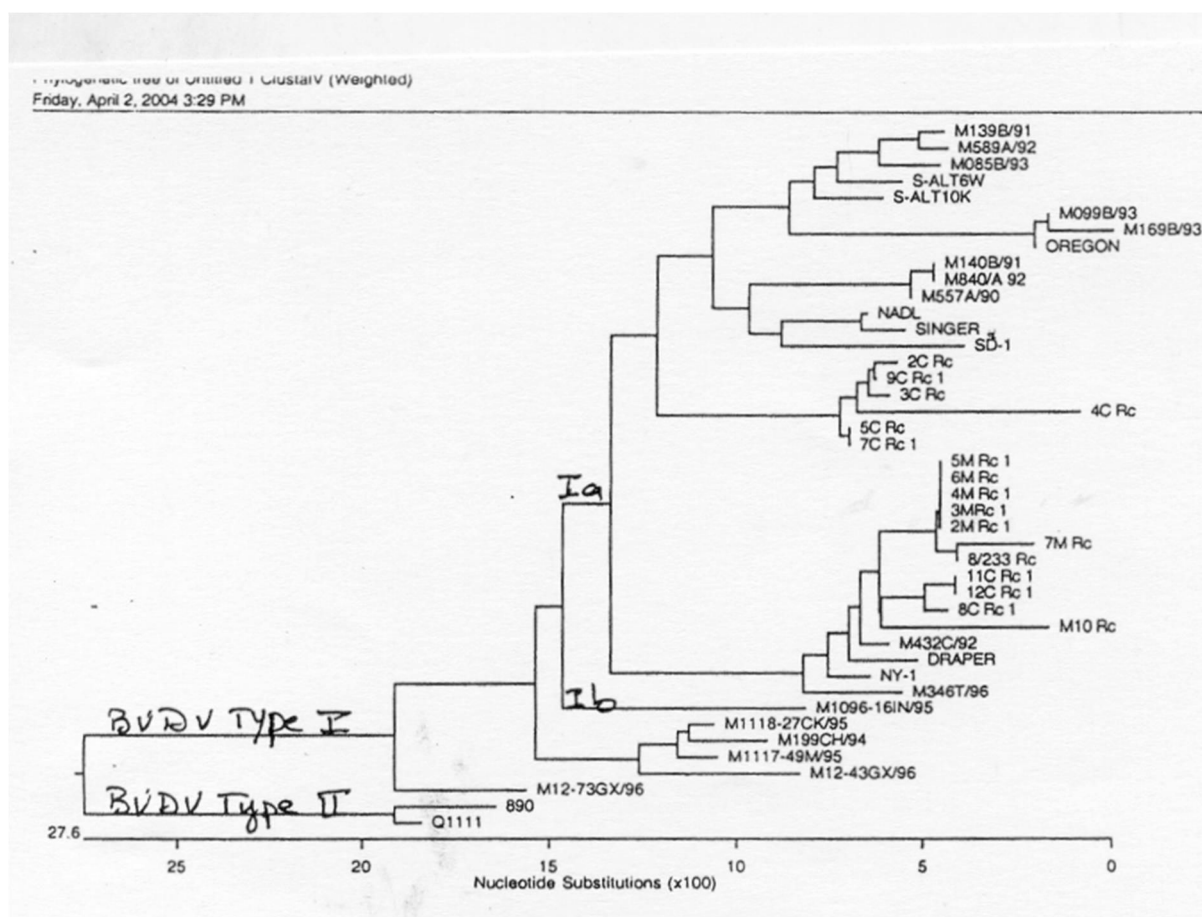


Figure 9 : Arbre phylogénique avec les séquences nucléotidiques courtes (169bp) utilisant les amorces internes (11/12A) ou PCRII :

- MRc : isolats du Mali
- CRc : isolats de la Suède
- M : isolats du Mozambique
- Souches de références : NADL, NY-1, OREGON, Q1111, SINGER et SD-1
- S : isolats d'Afrique du Sud

4. Discussion

La caractérisation phylogénique permet de classer génétiquement les isolats par comparaison de leurs séquences nucléotidiques avec celles des souches de références connues pour le virus que l'on veut caractériser. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation génétique des isolats de BVDV du Mali et à leur comparaison avec des isolats et souches de références d'autres pays. En effet au Mali la diarrhée d'origine virale chez les animaux n'ont pas fait auparavant l'objet d'études approfondies. D'où la motivation pour le présent projet pour la caractérisation des isolats du virus de la diarrhée virale des veaux, qui cause une infection persistante avec la souche non cyto pathogène, et suite à une surinfection par un autre BVDV pathogène apparaît la maladie des muqueuses (BVDV-MD). Le BVDV est un virus important pour un pays comme le Mali, car il induit des symptômes qui sont confondus avec ceux du virus de la peste bovine. Dans le programme d'éradication de ce dernier le virus BDV-MD est pris en compte de même que le virus de la fièvre aphteuse pour le diagnostic différentiel. La particularité avec les trois maladies est qu'elles se ressemblent quand à la manifestation de leur signe clinique, par des lésions au niveau de la muqueuse buccale et le tableau clinique final est la mort de l'animal. Le BVDV a fait l'objet d'étude dans d'autres pays à cause des pertes économiques qu'il engendre par les retards de croissance chez les veaux, les naissances avant terme, les diminutions de gestation, les malformations congénitales et les baisses de production laitières dans les fermes avec une infection persistante.

Des études de caractérisation génétique et antigénique des BVDV ont été faites avant (Becher et al., 1999 et 2000) et ont permis d'identifier de nouveaux génotypes différents dans le dendrogramme classique des BVDV (BVDV-1, 2CSFV, BDV et Girafe). Ainsi des études ont été menées pour voir l'hétérogénéité au niveau de certaines portions génomiques du virus, telles que les protéines E2 et N^{Pro} qui ont permis de mettre en évidence 7 groupes génétiques majeurs qui sont les BVDV-1, 2, CSFV, BDV-1, 2, 3 et la souche Girafe (Becher et al., 2003). D'autres auteurs comme Baule et al.(1997), ont aussi effectué des études sur l'hétérogénéité des isolats de BVDV d'Afrique du Sud. Et ils ont pu mettre en évidence par comparaison des séquences nucléotidiques de la région 5'NCR de ces isolats avec ceux d'Europe et d'Amérique, deux groupes de virus ceux qui sont proches d'Europe et d'Amérique et ceux qui semblent être des variants de BVDV I présents seulement en Afrique (Baule et al., 1997).

Dans nos travaux nous avons procédé à la caractérisation phylogénique de certains isolats du Mali et de la Suède par rapport aux isolats de l'Afrique du Sud et du Mozambique et aux souches de références du Canada et des Etats-Unis par la comparaison des séquences nucléotidiques de la portion 5'NCR.

L'analyse des différents arbres phylogéniques a montré des différences par comparaison aux différentes souches de références. Dans l'arbre phylogénique des séquences longues les isolats du Mali et de la Suède analysés sont groupés en majorité avec les souches de références DRAPER et NY-1 à l'exception de deux isolats de la Suède. La similarité avec ces souches de références varie de 94,9% à 95,3% pour la souche NY-1, et est de 91,9% pour la souche DRAPER.

L'arbre montre également dans le même groupe 3 isolats de Mozambique avec 77,7% à 80,4% de similarité. La différence avec les autres souches de référence sont de 16% pour NADL ; 17,8 à 17,9% pour SINGER; 34,7 à 37% pour 890; 32,3 à 34,6% pour Q1111; 17,9 à 18,9% pour SD-1 et

18,9 à 19% pour OREGON. Quand on compare les isolats analysés avec les isolats d’Afrique du Sud la divergence est de 15,2 à 17,9%.

Les deux autres isolats de la Suède sont groupés avec le BVDV type I, sous groupe 1b. Des analyses phylogéniques similaires ont été menées par d’autres auteurs comme Nagai et ses collaborateurs (1999), qui ont pu caractériser les isolats de BVDV du Japon en utilisant les séquences de 5 régions génomiques. Les séquences de ces 5 régions génomiques (5’NCR, NPro, E2, NS3 et NS5B-3’NCR) de 48 isolats ont été obtenues à partir du GenBank. Les résultats ont démontré l’existence par comparaison de deux nouveaux sous groupes de BVDV au Japon à partir des séquences de 5’NCR (Nagai M. et al, 2004).

L’analyse des séquences courtes, a montré que la majorité des isolats de la Suède sont groupés avec les souches de références SD-1 et SINGER avec des pourcentages de similarité variant de 90% à 91,3%. Ainsi cette similarité classe les isolats de la Suède dans le groupe de BVDV type I et le sous groupe 1a. Le deuxième groupe comprenant essentiellement les isolats du Mali a montré des similarités avec les souches DRAPER et NY-1 avec des pourcentages de 64,4% à 95,3%. Ces différents résultats classent les isolats du Mali dans le BVDV de type I et le sous groupe 1a.

La différence avec les souches de références du BCDV type II, 890 (Etats-Unis) et Q1111 (Canada) est nette dans les deux arbres phylogéniques. Ces différents résultats ont démontré également une distribution géographique généralisée du virus BVDV sur l’ensemble du territoire national du Mali.

5. Conclusion

La présente étude a permis de classer les isolats de BVDV du Mali. D’après les résultats obtenus les isolats du Mali sont différents de ceux de la Suède. La comparaison avec les isolats du Mozambique a montré une similarité avec seulement 3 isolats du Mozambique deux de M/95 et un de M/96. Les isolats d’Afrique du Sud n’ont montré aucune similarité avec les isolats du Mali. La comparaison avec les souches de référence a montré une similarité avec les souches DRAPER et NY-1 seulement et aucune avec les autres souches de référence analysées.

Cette similarité avec ces deux souches de référence classe les isolats du Mali dans le groupe de BVDV type I et le sous groupe 1a. Ainsi ces résultats ont démontré d’autre part une distribution générale du virus de la diarrhée virale des veaux au Mali.

Remerciements

Nous remercions les structures suivantes :

- Agence Internationale de l’Energie Atomique, Vienne (Autriche).
- Laboratoire Central Vétérinaire, Bamako (Mali)
- Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée, Bamako (Mali)
- National Veterinary Institute, Uppsala (Suède)

Références

- Baule C. et al. 1997 1997. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Re.* (52): 205-220.
- Becher P. et al., 1997. Phylogenic analysis of Pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.*(78): 1357-1366.
- Becher P. et al., 1999. Genetic Diversity of Pestiviruses: identification of the novel groups and implications for classification. *Virology* (262): 64-71.
- Becher P. et al., 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implication for classification, 2003. *Virology* (311): 96-104.
- Brownlie J. et al., 1984. Experimental production of mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* (144): 535-536.
- Nagai M. et al., 2004. Phylogenic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Research* (99): 103-113.
- Vilcek S. et al., 1999. Genetic clustering of bovine viral diarrhoea viruses in cattle farms: genetic identification and analysis of viruses directly from cattle sera. *Vet. J.* (158): 33-38.