

SİĞİRLARDA ROTAVİRUS ANTİKORLARININ DAĞILIMI ÜZERİNDE
SEROLOJİK ARAŞTIRMALAR

İbrahim Burgu*

Yılmaz Akça**

Serological survey for the prevalence of antibodies against rotavirus in cattle

Summary: *In order to investigate the prevalence of rotavirus infection in cattle population, 296 sera obtained from slaughtered cattle in Ankara Slaughterhouse were tested for neutralizing and hemagglutination inhibiting (HI) antibodies against the bovine rotavirus.*

At a serum dilution of 1:5, neutralizing antibodies were found in 92 (31.08%) out of 296 sera. These 92 positive sera were retested with HI test by using 0,8% suspension of pig erythrocytes but only 23 (25%) sera were found positive. The distribution of SN_{50} value were recorded between 1:11,9 and 1:28,2. HI-antibody titers were found between 1:10 and 1:40. In conclusion neutralization test was found more sensitive than HI test for the detection of rotavirus antibodies.

Özet: *Siğirlarda rotavirus enfeksiyonları dağılımını saptamak amacıyla, Ankara mezbahasına getirilerek kesilen 296 hayvana ait kan serumu, rotavirus antikorları yönünden nötralizasyon ve hemagglutinasyon inhibisyon (HI) testine tabi tutuldu. 296 serumdan 92 si (31.08) 1/5 serum sulandırmasında pozitif bulundu. Bu 92 pozitif seruma %0,8 lik domuz eritrositleri kullanılmak suretiyle HI testi uygulandı ve 23 serum (%25) pozitif olarak saptandı. SN_{50} değer dağılımı 1/11,9-1/28,2, HI antikor titresi 1/10-1/40 arasında tesbit edildi.*

Rotavirüslara karşı antikor taramalarında nötralizasyon testinin HI ye oranla daha duyarlı olduğu saptandı.

Giriş

Bulaşıcı neonatal barsak hastalıkları, Veteriner Hekimlik'te etiyoloji, klinik teşhis ve sağtımları yönünden büyük problem oluşturmaktadır (12).

* Doç.Dr.A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

** Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

Son yıllarda, Salmonella, E.coli, Chlamydia, Bovin viral Diarrhae-Mucosal Disease (BVD-MD), Adenovirüsler, parvo virüsler ve corona virüsler yanında rotavirüslerinde buzağılarda diyareli hastalıkların etkeni olduğu bildirilmektedir (10,14). Yapılan araştırmalara göre dünyada sığır populasyonlarında rota virüslerin neden olduğu neonatal diyarelerin %50-100 oranında dağılım gösterdiği saptanmıştır. Özellikle buzağılarda, yaşamlarının ilk on günü içinde diyareli enfeksiyonlar nedeni ile yüksek düzeyde ölüm olayları görülmektedir (3).

Rotavirüsler, Reoviridae Familyası içinde bağımsız bir grubu oluşturmaktadır (12,15).

Rotavirüslerin hücre kültürlerinde direkt olarak izolasyonları oldukça güç olmakla birlikte, bu güne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından buzağılardan bazı rotavirüs suşları izole edilebilmiştir. Bir buzağıdan izole edilen NCD (Nebraska Calf Disease) virüs suşu (11), Kuzey İrlanda'da izole edilen 75/447 (İrland) suşu (8,9) ve Kuzey Almanya'da izole edilen Ro 124/78 (3) virüs suşu dünyada buzağılardan izole edilen sınırlı sayıdaki rotavirüs suşları arasında sayılmaktadır. Bu nedenle rotavirüsler üzerinde direkt virüs izolasyonu çalışmaları yanında serolojik test yöntemleri ile yapılan seroepidemiolojik çalışmalar da büyük önem taşımaktadır.

Hafez ve arkadaşları (4), yaptıkları çalışmada sığırlarda ve mandalarda rotavirüslere karşı oluşan antikorları saptamak için hemaglutinasyon-inhibisyon (Hİ), nötralizasyon ve immunodiffuzyon testini kullanmışlar ve nötralizasyon testinin Hİ a oranla daha iyi sonuç verdiğini saptamışlardır. Thiel (17) de domuzlar ve sığırlar üzerinde yaptığı çalışmada rotavirüslere karşı yapılan antikor taramalarında nötralizasyon testinin, Hİ testine göre daha duyarlı olduğunu belirtmiştir.

Ayrıca aynı araştırmacı (17), rotavirüslerle yapılan Hİ testinde domuz eritrositlerinin en iyi sonuç veren eritrosit türü olduğunu da bildirmiştir.

Schlafer ve Scott (16), danalarda rotavirüslere karşı nötralizasyon testi ile yaptıkları antikor taramasında 110 serumdan 108 inde $1/4-1/1024$ arasında değişen antikor dağılımı saptadıklarını bildirmişlerdir. Hafez ve arkadaşları (4) 313 sığır serumunun %51 inde Hİ değerlerini $1/10-1/640$ arasında bulmuşlardır. Brunner (1) Almanya'da Bavyera'da yaptığı çalışmada nötralizasyon testisonunda,

kontrol ettiği 1000 sığır serumunun 985 inde (%98,5) nötralizan anti-korları saptadığını bildirmiştir.

Yurdumuzda özellikle sığır populasyonu arasında sık görülen neonatal diyareli hastalıklar içinde Rotavirusların durumunu belirtmek amacıyla bu ön çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada öncelikle, rota viruslara karşı oluşan antikor durumu nötralizasyon ve HI testleri ile karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü :

Virus üretimi, enfeksiyözite gücü tesbiti ve mikronötralizasyon testleri için MDBK (Madın Darby Bovin Kidney) (6) hücre kültürü kullanıldı ve hücre üretme vasatı olarak %10 inaktif dana serumlu Eagle (MEM) vasatından yararlanıldı.

Virus :

Mikronötralizasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testlerinde, test virus olarak Rotavirus 75/447 (İrland) suşundan yararlanıldı.

Serum numuneleri :

Araştırmada kullanılan 296 dana ve sığır kan serumu aşağıda belirtilen yerlerden getirilerek Ankara Et Kombinasyonunda kesilen hayvanlardan sağlandı. Bu serumlar teste alınmadan önce inaktivasyon ve sterilizasyon işlemlerinden geçirildiler, araştırmaya kadar -20°C de saklandılar.

Atatürk Orman Çiftliği	93 Adet
Eskişehir bölgesi	35 "
Konya "	21 "
Kars "	147 "

Virus üretimi :

Virusun enfeksiyözite gücünü artırmak amacıyla Clark ve arkadaşları (2) ve Thiel (17) in bildirdikleri yöntemden yararlanıldı. Doku kültürü şişelerinde 1/1 subkültürleri yapılarak 24 saat'de üretilen MDBK hücre kültürlerine Rotavirus 75/447 (İrland) suşu tripsin ile muamele edilerek inokule edildi. Virus 10 $\mu\text{gr/ml}$ de tripsin kapsayan vasatla karıştırılıp 1 saat 37°C de tutuldu. Daha sonra MDBK hücre kültürlerine adsorbsiyon tekniğine göre inokule edildi. Virus üretme vasatı olarak 5 $\mu\text{gr/ml}$ de tripsin kapsayan Eagle vasatı

kullanıldı. Virus üretimi 37°C de yapıldı. Kontrol hücre olarak kullanılan MDBK hücre kültürüne de aynı şartlar altında 5 µgr/ml de trip sinli Eagle vasatı konuldu.

Enfeksiyözite gücü saptanması :

Virusun enfeksiyözite gücü mikrotitrasyon yöntemi ile tesbit edildi. Sonuçlar kaerber (5) e göre değerlendirildi.

Serum nötralizasyon testi :

Araştırmada kullanılan toplam 296 kan serumunda rotavirus 75/447 (İrland) suşuna karşı nötralizan antikor varlığını saptamak ve pozitif serumlardaki nötralizan antikorların SN₅₀ değer dağılımlarını tesbit etmek amacıyla mikronötralizasyon testinden yararlanıldı. Bu amaçla önce kan serumları 1/5 sulandırmada, 100DKID₅₀ = 10^{1,2}/ml 75/447 virus suşu ile eşit oranda karıştırılarak MDBK hücre kültürlerinde antikor taraması yapıldı. Bu tarama sonunda 1/5 sulandırmada pozitif sonuç veren serumlar 1/5-1/80 arasında SN₅₀ değer dağılımı testine tabi tutuldular. Serum nötralizasyon testi uygulamasında 100 DKID₅₀, virus kontrol, hücre kontrol ve serum toksisite testleri de birlikte yapıldı.

Eritrosit elde edilmesi :

Hemaglutinasyon ve HI testlerinde kullanılan domuz kanı, Alsever solüsyonu içinde Federal Almanya Hannover Veteriner Yüksek Okulu Viroloji Enstitüsünden sağlandı.

İki kısım domuz kanı ve bir kısım alsever solüsyonu karışımı şeklinde getirilen kan 2000 devirde 30 dakika santrifüje edildi ve eritrositler çöktürüldü.

Çöken eritrositler 3 defa PBS-M ile yakındıktan sonra hemaglutinasyon ve HI testleri için %0,8 lik olarak PBS-M içinde süspanse edildiler. Eritrosit süspanسیونu 4°C da saklandı.

Mikrohemaglutinasyon testi :

HI testinde kullanılacak olan Rotavirus 75/447 (İrland) suşunun hemaglutinasyon aktivitesi mikrohemaglutinasyon yöntemi ile saptandı. Bu amaçla mikrohemaglutinasyon tablasının ilk sırasındaki dört gözüne Rotavirus 75/447 (İrland) suşundan 0,1 ml konuldu. Bu sıranın altındaki gözlere özel damlatıcı pipet yardımı ile 0,05 ml PBS-M damlatıldı. Sonra üst sıradaki virus, özel taşıyıcılar (0,05 ml) yardımı ile PBS-M bulunan gözlere 0,05 ml aktarılacak virusun 1/2-1/1024 arası sulandırması yapıldı. Bu sulandırma işleminden

sonra bütün gözlere %0,8 lik domuz eritrositinden 0,05 ml ilave edildi. Mikrohemaglutinasyon tablası iki saat oda sıcaklığında tutulduktan sonra sonuç değerlendirildi. Hemaglutinasyon birimi ve 4H birimi saptandı.

HI testi için serumların hazırlanışı :

Mikronötralizasyon testi sonunda nötralizan antikor yönünden pozitif sonuç veren kan serumları HI testi yardımı ile kontrol edildi. Bu serumlar HI testine alınmadan önce kaolin ile muamele edildi. Bu amaçla önce serum numuneleri 0,5 ml lik porsiyonlar halinde plastik deney tüplerine aktarıldılar. Serumlar üzerine PBS-M için %50 oranında sulandırılmış domuz eritrositlerinden 1,0 ml konuldu. Bu serum + eritrosit karışımı 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2000 devirde 30 dakika santrifüje edildi, ve üstte kalan serum 0,5 ml olarak temiz plastik deney tüplerine aktarıldı. Eritrosit süspansiyonu ile ön işleme tabi tutulan bu serumların üzerine PBS-M içinde hazırlanan %0,25 lik kaolin süspansiyonundan (PH 7.4) 1,0 ml ilave edilerek yeniden oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Daha sonra bu serum + %0,25 lik kaolin karışımı 2000 devirde 30 dakika santrifüje edildi ve üstteki serum pipetle alınarak mikrohemaglutinasyon-inhibisyon testine tabi tutuldu.

Mikro HI testi :

Mikronötralizasyon testinde pozitif sonuç veren ve kaolinle muamele edilen serum numuneleri, mikrohemaglutinasyon tablalarında, içinde 0,02 ml sığır albumini bulunan PBS-M ile 1/5-1/80 arası sulandırıldılar.

Sulandırılan serum numuneleri üzerine Rotavirus 75/447 (Irland) suşu 4H birimi (1/8) oranında özel pipet yardımıyla 0,05 ml olarak damlatıldı. Mikrohemaglutinasyon tablası bir saat oda sıcaklığında bırakıldıktan sonra bütün gözlere yine özel pipet ile 0,05 ml %0,8 lik domuz eritrositi ilave edildi. Yeniden bir saatlik oda sıcaklığında bekletilme işleminden sonra HI sonuçları değerlendirildi.

Hemaglutinasyon ve HI testleri için Thiel'in (17) bildirdiği yöntemlerden yararlanıldı.

Bulgular

10 µgr/ml tripsin ile muamele edildikten sonra tripsinli Eagle vasatı içinde MDBK hücre kültürlerine ekilen Rota virus 75/447

(İrland) suşu 48 saat içinde tam bir sitopatolojik efekt (CPE) meydana getirerek üredir. Aynı şartlar altında tutulan kontrol MDBK hücrelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Üretilen virusun mikrotitrasyon yöntemi ile ölçülen enfeksiyözite gücü $DKID_{50} = 10^{3,5}/1.0$ ml olarak saptandı.

Mikronötralizasyon testi ile, nötralizan antikor yönünden Rota virus 75/447 (İrland) suşuna karşı kontrol edilen 296 kan serumundan 92 sinde (%31,08) 1/5 sulandırma da nötralizan antikorların varlığı tesbit edildi (Tablo 1). Pozitif sonuç veren 92 kan serumundaki SN_{50} dağılımları 1/11.9-1/28.2 arasında ölçüldü (Tablo 2).

Tablo 1: Rotavirus 75/447 (İrland) suşu ile sığır serumları arasında uygulanan mikronötralizasyon testi sonuçları.

Serum adeti	Virus	1/5 Sulandırmada Pozitif Serumlar	Pozitif Serumlar Yüzdesi (%)
296	Rotavirus (75/447 İrland)	92	31.08

Mikrohemaglutinasyon yöntemi ile Rotavirus 75/447 (İrland) suşunun H.Birimi 1/32 olarak saptandı. Mikronötralizasyon testi sonunda 1/5 sulandırmada nötralizan antikor yönünden pozitif sonuç veren 92 adet kan serumu ile yapılan mikro HI testinde 23 serumun (%25) inhibisyon verdiği ve bu serumların HI değerlerinin 1/5-1/40 arasında dağılım gösterdiği saptandı (Tablo 3). Gerek mikronötralizasyon ve gerekse mikrohemaglutinasyon testlerinde toksik etki gösteren serumlara rastlanmadı. Bütün testlerdeki virus kontrol ve hücre kontrollerinin doğru çalıştığı gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç

Neonatal diyareli hastalıklara neden olan rotavirüsler karşı da-na ve sığırlarda antikor varlığını saptamak amacıyla yapılan bu çalışmada, toplam 296 serum numunesinden 92 adedinde (%31,08) 1/5 sulandırmada nötralizan antikorlara rastlanmış olup bu nötralizan antikorlar, SN_{50} değeri olarak 1/11,9-1,28, 2 arasında dağılım göstermişlerdir. Bu durum öncelikle rotavirüslardan ileri gelen enfeksiyonların ülkemizde mevcut olduğunu ortaya koymaktadır. SN_{50} değer dağılımlarının oldukça düşük titrede olmalarının serum numuneleri alınan hayvanların ileri yaşlarda olmalarından kaynaklanabile-

Tablo 2: Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN_{50}) değerlerine göre dağılımı.

(SN_{50})	1:11,9	1:12,1	1:12,3	1:12,5	1:12,9	1:14,2	1:16,6	1:23,5	1:28,2	Toplam
Pozitif Serum	26	9	13	6	1	28	3	4	2	92

Tablo 3: Nötralizan antikor kapsayan serumların HI değerlerine göre dağılımı.

Pozitif Serum Adedi	Serumdaki Antikor Titreleri					Pozitif Serumlar	
	Negatif < 1/5	Pozitif				Toplam	(%)
		1/10	1/20	1/40	1/80		
92	69	15	7	1	-	23	25

ceği kanısındayız. Özellikle genç hayvanlarda nötralizan antikorlarının SN_{50} değerleri Schlafer ve Scott'un (16) bildirdiği gibi daha yüksek titrelere ulaşmaktadır.

Diğer taraftan nötralizasyon testi sonunda nötralizan antikor taşıdığı saptanan 92 serum numunesi ile yapılan HI testinde bu serumlardan ancak 23 adedinin (%25) 1/10-1/40 arasında inhibisyon özelliği gösterdikleri tesbit edilmiştir. Bu duruma göre rotavirus antikorlarının tesbitinde HI testinin, nötralizasyon testine oranla daha az duyarlı olduğu Thiel (17) ve Hafez ve arkadaşları (4) nında bildirdikleri gibi bir kere daha saptanmıştır.

Rotavirusların üretiminde McNulty ve arkadaşlarının da (7) bildirdikleri gibi MDBK hücre kültürlerinin duyarlı kültürler olduğu tarafımızdan da gözlenmiştir.

Rotavirus suşlarının enfeksiyözite güçlerinin yükseltilmesi ve özellikle enfeksiyözite gücü yüksek suşların HI testinde kullanılmaları amacıyla, virus suşlarının tripsinle muamele edilerek hücre kültürlerine inokule edilmelerinde Thiel (17) ve Clark ve arkadaşlarının (2) bildirdikleri yöntem uygulanmış olmasına rağmen, araştırmacıların (2,17) belirttikleri $DKID_{50}$ değerine ulaşamamıştır. Bunda kanımızca tripsinle muamele edilmiş virusun hücre kültürlerindeki pasaj sayısının rolü bulunmaktadır.

Bununla birlikte çalışmamızda elde ettiğimiz $DKID_{50} = 10^{3,5}$ /ml değeri nötralizasyon ve özellikle HI testinde iyi sonuç vermiştir.

Sonuç olarak Türkiye'de rota virüsüne karşı antikor varlığını saptamak amacı ile yaptığımız bu ön çalışma da, değişik bölgelerden gelen hayvanlardan alınan serum numunelerinde antikor saptanması, ülkemizde diyare ile seyreden viral nedenli neonatal hastalıklar içinde rotavirus enfeksiyonlarının göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, oldukça ileri yaşlardaki hayvanlarda rotaviruslara karşı antikor saptanması bu virüslardan ileri gelen enfeksi-

yonların çok yeni olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan geniş kapsamlı bir antikor taramasının, özellikle devlet kurumlarında, antibiyotik sağıtımlarına cevap vermeyen yeni doğmuş buzağı ishal-lerinde rotavirüslerin rolünü saptamaya yardımcı olacağı kanısındayız. Rota virus izolasyonları üzerindeki çalışmalarımız devam etmektedir.

Literatür

- 1- **Brunner, R.** (1978): *Serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Rota-Virusinfektionen beim Rind in Bayern.* Inaug. Diss. München.
- 2- **Clark, S.M., Barnett, B.B. and Spendlove, R.S.** (1979): *Production of high-titer bovine rota virus with trypsin.* J. Clin. Microbiol., 9 (3): 413-417.
- 3- **Frey, H.R., Marchall, H.J. und Liess B.** (1979): *Rotavirus-infektionen in norddeutschen kälberbeständen: Nachweis mittels Elektronmikroskopie und Virusanzüchtung in Zellkulturen.* Dtsch. Tierärztl. Wschr., 86 (3): 100-104.
- 4- **Hafez, S.M., Lange, S., Niebuhr, L. and Liess, B.** (1980): *Serological survey for the prevalence of antibody to rota virus bovine leukemia virus amongst buffaloes and cattle in Egypt.* Bull. Off. Inst. Epiz. 92 (11-12): 1193-1203.
- 5- **Kärber, G.** (1964): *In diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases.* Public Health Ass. New-York, 3: 48-50.
- 6- **Madin, S.H. and Darby, N.B.** (1958): *Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origine.* Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 574-576.
- 7- **McNulty, M.S., Allan, G.M. and McFerran J.B.** (1976): *Isolation of a cytopathic calf rota virus.* Res. Vet. Sci. 21: 114-115.
- 8- **McNulty, M.S., McFerran, J.B., Bryson, D.G., Logan, E.F. and Curran W.L.** (1976): *Studies on rotavirus infection and diarrhoea in young calves.* Vet. Rec. 99: 229-230.
- 9- **McNulty, M.S., Alian, G.M. and McFerran J.B.** (1977): *Cell culture studies with a cytopathogenic bovine rota virus.* Arch. Virol. 54: 201-209.
- 10- **McNulty, M.S.** (1978): *Rotaviruses.* J. Gen. Virol. 40: 1-8.
- 11- **Mebus, C.A., Underdahl, N.R., Rhodes, M.B. and Twiehaus, M.J.** (1969): *Calf diarrhoea (Scours): reproduced with a virus from a field outbreak.* Univ. Neb. Agric. Exp. Stat. Res. Bull. 233.
- 12- **Niebuhr, L.** (1980): *Versuche zur Isolierung und Züchtung von Rotavirus porziner Herkunft in Zellkulturen sowie zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Rotavirus in Feldseren von Schweinen im Lande Niedersachsen.* Inaug. Diss. Hannover.
- 13- **Reinhard, B.** (1978): *Serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Rota-Virusinfektionen beim Rind in Bayern.* Inaug. Diss. München.
- 14- **Reissbauer, K., Romer, H., Wagenseil, F., Albrecht, E. und Oesterle, P.** (1981) *Die Verbreitung von Rotavirus - infektionen in Rinderbeständen des Regierungsbezirks Tübingen.* Tierärztl. Umsch. 36, (5): 334-336.

- 15- **Rolle, M. and Mayr, A.** (1978): *Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre.* Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. 404-407.
- 16- **Schlafer, D.H. and Scott, F.W.** (1979): *Prevalence of neutralizing antibody to the calf rota virus in New York cattle.* Cornell. Vet. 69, 262-271.
- 17- **Thiel, E.** (1980): *Kinetik der hamagglutininbildung und Gewinnung hamagglutininierender Präparate zur Verwendung im Hämagglutinationshemmungstest mit Feldseren von Schweinen und Rindern.* Inaug. Diss. Hannover.

Yazı 4.2.1983 günü alınmıştır.

Received on 4.2.1983.