

**TERS (REVERSE) PASİF HEMAGLUTİNASYON (RPHA) TESTİ İLE İSHALLİ
BUZAĞILARIN GAITALARINDA ROTAVİRUSLARIN TESPİTİ**

**Feray Alkan¹ Hüseyin Pulat² Zafer Yazıcı¹
İbrahim Burgu³**

**Detection of bovine rotavirus in faeces of calves with diarrhea by reverse passive
haemagglutination (RPHA) method.**

Summary: *The rotaviruses cause infection characterized with diarrhea in newborn animals and they are widespread all countries.*

In this research, 97 faeces samples obtained from calves with diarrhea were tested for detection of rotaviruses using RPHA test. It is found that 26 (26.8 %) of tested faeces samples contained rotavirus.

This research also indicated that RPHA test is simple, time -sawing and sensitive method on detection of rotavirus.

This is the first investigation of which rotaviruses were diagnosed using the RPHA test in Turkey.

Özet: *Rotavirüsler yenidoğanlarda ishal ile karakterize bir enfeksiyonun sebebi olup, tüm dünyada yaygındırlar.*

Bu araştırmada, ishalleri buzağılardan sağlanan 97 gaita örneği rotavirüs yönünden RPHA testi ile kontrol edildi. Test edilen gaita örneklerinden 26 (% 26.8)'sında rotavirüs varlığı saptandı.

Araştırmada, RPHA testinin rotavirüslerin tesbitinde kolay uygulanabilen, kısa zamanda çok sayıda materyalin test edilebildiği ve duyarlı bir yöntem olduğu belirlendi.

Bu araştırma, Türkiye'de rotavirüs enfeksiyonlarının teşhisinde RPHA testinin kullanıldığı ilk çalışmadır.

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

2 Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi., Viroloji Bilim Dalı, Kars.

3 Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi., Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

Giriş

Yenidoğanlarda ishalin nedenleri çok çeşitli olup, enfeksiyöz ajanlar, çevre, beslenme ve hijyenik faktörler hastalığın çıkışında rol oynar. Bunlardan başka parvo-, astro-, caliciviruslar, bovine viral diarrhoea (BVD) virusu, Breda ajan ve virus benzeri partiküller de yenidoğan buzağuların ishal olaylarının diğer ajanlarıdır (1).

Rotaviruslar ilk kez 1943 yılında Light ve ark. tarafından, çocuklarda görülen bir ishal epidemisinde tesbit edilmişlerdir (13). Mebus ve ark. (17) da ishalleri buzağulardan alınan gaitalar ile klostrum almamış buzağularda deneysel olarak enfeksiyonu oluşturmuşlar ve hastalık etkeninin filtre sistemlerinden geçebildiğini saptamışlardır. Daha sonraki yıllarda Mebus ve ark. (18)'nin Nebraska calf diarrhoea virusu, Kapikian ve ark. (14)'nin Norwalk virusu olarak isimlendirdikleri virusları izole etmeleri ile rotaviruslara ilgili çalışmalar yoğunlaşmış ve nihayet 1974 yılında Flewett ve ark. (8) etkenin morfolojik olarak araba tekerleğine benzemesi nedeniyle bu virusu, latince terminolojide tekerlek anlamına gelen "rota" kelimesi ile adlandırmışlardır.

Rotavirus enfeksiyonları genellikle genç hayvanlarda görülmektedir. Buzağı (16), kuzu (25), tay (4, 9) ve yavru domuzlardan (22) şiddetli ishal salgınlarında izole edilmişlerdir. Kedi (11) ve köpek (10) yavrularında da ishal ile karakterize enfeksiyonun nedenidirler.

Rotavirusların çoğalma alanı bağırsak kanalıdır ve virus sadece gaita ile saçılmaktadır. Enfekte bir hayvanın gaitası ile 10^9 - 10^{16} partikül/gr virus saçıldığı saptanmıştır (15). Hastalığın bulaşması enfekte gaita ile bulaşık yem ve sular ile oral yoldan olmaktadır. Erişkin hayvanlar genellikle subklinik enfekte olduklarından, hastalığın sürü içinde yayılmasında önemli rol oynarlar.

Rotavirus enfeksiyonu sulu, sarı renkli, bazen mukuslu ve nadiren kanlı ishal ile karakterizedir. Hastalığın başlangıcında ateş normalin üstündedir. Daha sonra normale döner. Hayvanda kilo kaybı, tüylerde düzensizlik ve keçeleşme dikkati çeker. Dehidrasyon ve sıvı elektrolit dengesinde bozulmaya bağlı olarak hipovolemik şok ve ölüm şekillenebilir. E. Coli, salmonella, clostridia, criptosporidium, v.s. gibi etkenler ile komplikasyon mortalitenin artmasına neden olur (15).

Virusun başlıca replikasyon alanı ince bağırsaktaki villus epitel hücreleridir. Bununla beraber virus antijeni kalın bağırsaklarda da tesbit edilmiştir. Ölen hayvanların otopsilerinde ise, özellikle duod-

numda olmak üzere ince bağırsaklarda ödem ve tonositide azalma dikkati çeker. Bazı olaylarda bağırsak mukozasında hemorajik odaklar görülür (15).

Rotavirus enfeksiyonlarının teşhisi genellikle gaitada virusun ya da virus antijeninin varlığının saptanması esasına dayanmaktadır. Bu amaçla elektron mikroskopi (EM) (9, 19, 26), poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) (7), ELİSA (7, 27) ve hücre kültürlerinde immunfloresan (2,10) yöntemleri kullanılmaktadır. Son yıllarda rotavirus enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılmaya başlanan bir diğer yöntem ise ters (reverse) pasif hemaglutinasyon (RPHA) testidir.

RPHA testi ilk kez Saneketa ve ark. (23) tarafından insan rotaviruslarının saptanması amacıyla tanımlanmıştır. Daha sonra buzağı (7), at (26) ve kedilerin (19) rotaviruslarının tesbiti için de kullanılmıştır.

Türkiye'de sığırlarda rotavirus enfeksiyonuna ilgili ilk çalışma Burgu ve Akça (3) tarafından yapılmıştır. Araştırmada (3), sağlıklı sığırların % 31'inde rotavirus antikoruna saptanmıştır. İshalli buzağılarda rotavirusların araştırılmasına ilgili olarak Yazıcı (27)'nin yaptığı çalışmada ise, ishallerden sağlanan gaitaların % 17'sinde rotavirus antijeninin varlığı ELİSA testi ile saptanmıştır.

Bu çalışmada, RPHA testi ile 0-1 ay yaş grubuna dahil ishallerden buzağuların gaitaları rotaviruslar yönünden kontrol edilerek, hem yenidoğanların rotavirus enfeksiyonu oranının, hem de RPHA testinin rotavirusların tesbitinde kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre Kültürü: Madin darby bovine kidney (MDBK) ve fetal dana böbrek (FDB) hücre kültürleri kullanıldı. Hücre kültürlerinin üretilmesinde % 10 dana serumlu Eagle MEM vasatı kullanıldı.

Viruslar: RPHA testinin spesifitesi ve sensitivitesinin kontrol edilmesi amacıyla bovine rotavirus Northern Irland 75/447 suşu ve bovine coronavirus S₂ suşu kullanıldı.

Northern Irland 75/447 suşu MDBK, coronavirus S₂ suşu FDB hücre kültüründe üretildi.

Rotavirus Antiserumu: UK rotavirus ve B 223 (Bovine serotip 3) rotavirusa karşı tavsanlardan elde edilerek purifiye edilen ve 5 mg/ml Ig G içeren rotavirus antiserumu kullanıldı.

Antiserum Moredun Araştırma Enstitüsü, Edinburg, İngiltere'den sağlandı.

Gaita Örnekleri: Araştırmada, 0-1 ay yaş grubunda bulunan ve akut ishal semptomu gösteren 97 buzağıya ait gaita örneği kullanıldı. Materyaller Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dahiliye Kliniğine tedavi amacıyla getirilen buzağular ile Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğüne bağlı İşletmelerde bulunan buzağılardan sağlandı.

Buzağılardan direkt olarak alınan materyaller kullanılmıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

Eritrositlerin Purifiye Antikolarla Kaplanması: Bu amaçla Sato ve ark. (24)'nın bildirdiği yöntemden yararlanıldı.

Koyun kanı alsever solusyonu içine alındı. Eritrositler 5 kez PBS ile yıkandıktan sonra, PBS içinde % 10'luk eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Daha sonra eritrosit süspansiyonu PBS içinde hazırlanan % 1'lik glutaraldehit solusyonu ile eşit miktarda karıştırıldı. Karışım bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de fikzasyon için bekletildi. Fikze olan eritrositler 4 kez PBS ile yıkanarak, PBS ile % 10'luk eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyona PBS içinde hazırlanan 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tannik asit solusyonundan eşit miktarda ilave edilerek 37°C 'de 15' inkube edildi. Bu sürenin sonunda eritrositler tekrar 5 kez PBS ile yıkanarak, PBS içinde % 10'luk eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Eritrosit süspansiyonu PBS içinde hazırlanan ve 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ig G içeren rotavirus antiserumu ile eşit miktarda karıştırıldı ve 1 saat oda ısısında inkube edildi. İnkubasyon süresi sonunda eritrositler 2 kez test sulandırma sıvısı (% 2 fetal dana serumu ve % 0.2 NaN_2 içeren PBS) ile yıkandı ve sulandırma sıvısı kullanılarak % 1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı.

Gaita Örneklerinin Hazırlanması: Gaita örnekleri phenol red içermeyen PBS ile 1/5 oranında sulandırılarak, 5000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar alınarak -gaita örneklerinde bulunan ve non-spesifik reaksiyonların oluşmasına neden olabilecek hemaglutininlerin uzaklaştırılması amacıyla - glutaraldehit ile fikze edilmiş koyun eritrositleri ile 37°C 'de 30' inkube edildi. İnkubasyon süresinin

sonunda eritrositler tüpün dibine çöktü. Üst sıvılar alınarak RPHA testinde kullanıldı.

RPHA Testi: Test Saneketa ve ark. (23)'ün bildirdiği yöntemce göre yapıldı.

RPHA testi için hazırlanan gaita örnekleri, test sulandırma sıvısı kullanılarak log 2 tabanına göre sulandırıldı (1/2, 1/4, ..., 1/128). Bu amaçla, tabletin ilk sırasında bulunan gözlere her gaita örneği için 2 göz kullanılarak 50'şer µlt gaita örneklerinden, diğer gözlere 25'er µlt test sulandırma sıvısından konuldu. Özel bir pipet¹ yardımıyla ilk sıradan başlayarak aşağıdaki gözlere 25'er µlt aktarıldı. Daha sonra tabletin tüm gözlerine bovine rotavirus antikoruna ile kaplanmış koyun eritrositlerinin % 1'lik süspansiyonundan 25 µlt ilave edilerek, tabletler oda ısısında 1 saat inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda gaita örneklerinin hemaglutinasyon değerleri okundu.

Test örneklerinin RPHA titresi, hemaglutinasyonun olduğu en yüksek sulandırma değeri olarak belirlendi.

Testte kontrol virus olarak bovine rotavirus Northern Irland 75/447 suşu ve bovine coronavirus S₂ suşu kullanıldı.

Bulgular

İshal semptomu gösteren 97 buzağıdan sağlanan gaita örneklerinden 26 (% 26.8)'sında rotavirus varlığı saptandı (Tablo 1). Araştırmada Sato ve ark. (24)'ün bildirdikleri gibi 1/2 ve daha yüksek sulandırmalarda hemaglutinasyon veren gaita örnekleri rotaviruslar bakımından pozitif kabul edildi.

Test örneklerinin RPHA testi titresi, hemaglutinasyonun görüldüğü en yüksek sulandırma basamağı olarak değerlendirildi. Gaita örneklerindeki rotavirusların RPHA titresinin 1/2 - 1/128 arasında olduğu belirlendi (Tablo 1).

Kontrol olarak kullanılan rotavirus 75/447 Northern Irland suşu (10^{4.45}/0.1 ml) 1/32 titre verdi. Testin spesifitesini kontrol etmek amacıyla kullanılan bovine coronavirus S₂ suşu (10^{5.5}/0.1 ml) ise hemaglutinasyon oluşturmadı.

¹ Titertek Laboratories, Finlandiya.

Tablo 1. RPHA testi sonuçları.

RPHA Testi titresi	Test Materyali sayısı
<1/2	71
1/2	10
1/4	4
1/8	2
1/16	2
1/32	7
1/64	--
1/128	1
TOPLAM	26*/97**

* Pozitif gaita sayısı

** Toplam gaita sayısı.

Rotavirus 75/447 Northern Irland suşu, glutaraldehit ile fikze olmuş eritrositleri ya da fikze olmuş ve tannik asitle muamele edilmiş eritrositleri hemaglutine etmedi. Rotavirus anti serumu ile kaplanmış eritrositler de virusun yokluğunda aglutine olmadılar.

Tartışma

Rota-, corona-, astro-, caliciviruslar, Breda ajan ve BVD virusu yenidoğan buzağılarda ishal ile karakterize enfeksiyonun sebebidirler. Birçok araştırmada ishalleri buzağılardan rotavirusların varlığı tesbit edilmiştir. Murakami ve ark. (21), Japonya'da 22 farklı sürüde bulunan 51 ishalleri buzağıdan 14'ünde, Crouch ve ark. (6), 121 ishalleri buzağının 53'ünde, Moon ve ark. (20), 12 ayrı sürüde bulunan 18 ishalleri buzağının 11'inde ve kontrol edilen sürülerden 6'sında, Edwards ve ark. (7), 209 buzağıdan 77'sinde rotavirusların varlığını bildirmişlerdir.

Türkiye'de rotavirus enfeksiyonuna ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olup, ishalleri buzağılardan rotavirusların tesbitine ilgili bir tek araştırma (27) bulunmaktadır. Yazıcı (27) çalışmasında, ELİSA testi ile kontrol ettiği 87 gaita örneğinden 13 (% 17)'ünde rotavirus antijeninin varlığını saptamıştır. Bu araştırmada ise, 0-1 ay yaş grubunda bulunan 97 ishalleri buzağıdan 26 (% 26.8)'sında rotavirus enfeksiyonu tesbit edilmiştir. Rotavirus enfeksiyonlarının teşhisinde RPHA testinde başka, EM, hücre kültüründe IF, PAGE, ve ELİSA yöntemleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Araştırmacılar (7,23,26), RPHA

testinin PAGE testi ile benzer duyarlılık gösterirken, EM tekniği ve ELİSA testine oranla yüksek duyarlılığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Saneketa ve ark. (23), 94 çocuğa ait gaitalardan RPHA testi ile 58'inde, EM tekniği ile 45'inde rotavirus tesbit etmişlerdir. Edwards ve ark. (7)'nin çalışmalarında ise 209 gaita örneğinden 69'u PAGE ve RPHA testi ile pozitif sonuç verirken, ELİSA testi ile sadece 49 gaita örneğinde rotavirus varlığı saptanmıştır. Bu çalışmada gaita örnekleri yalnızca RPHA testi ile test edilmiş ve rotavirus enfeksiyonu oranı Yazıcı (27)'nin bildirdiğinden oldukça yüksek bulunmuştur. Bu oran muhtemelen RPHA testinin ELİSA testine oranla daha yüksek duyarlılığa sahip olmasından kaynaklanmakta ve Türkiye'de rotavirus enfeksiyonu oranının gerçekte Yazıcı (27)'nin bildirdiğinden daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. House (12), iki ayrı kaynağa ait verileri değerlendirerek A.B.D.'de 1970-1976 yılları arasında yenidoğan buzağı ishalleri nedeniyle 95 milyon dolar/yıl ekonomik kaybın olduğunu ve bu değerın 3.1 ve 8.7 milyon dolar'ının rotavirus enfeksiyonlarından kaynaklandığını bildirmiştir. Bu araştırmadan elde edilen yenidoğan buzağuların rotavirus enfeksiyonu oranı gözönünde bulundurulduğunda, Türkiye'de de rotavirüslerle ilgili ekonomik kayıpların küçümsenemeyecek ölçülerde olduğu açıkça görülmektedir.

Bu araştırmada kullanılan RPHA testi kolay uygulanan, kısa sürede çok sayıda materyalin test edilmesine imkan sağlayan, duyarlı bir yöntemdir. Cranage ve ark. (5), glutaraldehit ile fikze edilmiş eritrositlerin uygun koşullarda uzun süre saklanabileceğini bildirmişlerdir. Edwards ve ark. (7)'da bir merkez laboratuvarında hazırlanan fikze olmuş eritrositlerin gerektiğinde daha küçük teşhis laboratuvarlarına nakledilmesi suretiyle birçok merkezde rotavirus enfeksiyonlarının teşhisinin kolaylıkla yapılabilceğini belirtmişlerdir. RPHA testinin kullanımını sınırlayan en önemli etken ise, non-spesifik hemaglutinasyona neden olan faktörlerdir. Cranage ve ark. (5) bu amaçla test sulandırma sıvısında deterjanların (Tween 20) ve rotavirus antikoru taşımayan serum ilavesini önermişlerdir. Bu araştırmada, hem Cranage ve ark. (5)'nin önerdikleri gibi sulandırma sıvısında fetal dana serumu kullanılarak ve hem de gaita örneklerinin 1/5'lik sulandırmaları glutaraldehit ile fikze edilmiş eritrositler ile inkubasyona bırakılarak, nonspesifik reaksiyonlar önlenmiştir.

Bu araştırma sonunda, RPHA testinin kolay uygulanabilen, kısa zamanda çok sayıda materyalin test edilebildiği, duyarlı bir test oldu-

ğu belirlenmiş ve RPHA testi rotavirus enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan diğer yöntemlere alternatif olarak önerilmiştir. Ayrıca elde edilen veriler, Türkiye'de rotavirus enfeksiyonlarının yüksek oranda bulunduğunu da ortaya koymuştur.

Kaynaklar

1. **Bachmann, P.A.** (1984). *Viral gastroenteritis in calves*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 3(4): 819-842.
2. **Barnett, B., Spendlove, R.S., Peterson, M.W., Hsu, L.Y., La Salle, V.A. and Egbert, L.N.** (1975). *Immunoflorescent cell assay of neonatal calf diarrhoea virus*. Can. Jour. of Comp. Med. 39: 462-465.
3. **Burgu, I. ve Akça, Y.** (1983). *Sığırlarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerinde serolojik araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 30 (1): 35-44.
4. **Corner, M.E. and Darlington, R.W.** (1980). *Rotavirus infection in foals*. Am. Jour. Vet. Res. 41(10): 1699-1703.
5. **Cranage, M.P., Gurner, B.W. and Coombs, R.R.A.** (1983). *Glutaraldehyde stabilisation of antibody linked erythrocytes for use in reverse passive and related haemagglutination assays*. Jour. of Immun. Methods. 64: 7-16.
6. **Crouch, F.C. and Acres, D.S.** (1984). *Prevalance of rotavirus and coronavirus antigen in the feces of normal cows*. Can. J. Comp. Med. 48: 340-342.
7. **Edwards, S., Chasey, D., Naphthine, P., Banks, J., Hewitt-Taylor, C. and Cranage, M.P.** (1987). *A comparison of three rapid diagnostic methods for the detection of rotavirus infection in calves*. Vet. Microbiol. 13: 19-25.
8. **Flewett, J.H., Bryden, A.S., Dawies, H., Woode, G.N., Bredger, J.C. and Derick, J.M.** (1974). *Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves*. Lancet, II: 61-63.
9. **Flewett, J.H., Bryden, A.S. and Dawies, H.** (1975). *Virus diarrhoea in foals and other animals*. Vet. Rec. 96: 447.
10. **Fulton, R.W., Johnson, C.A., Pearson, N.J. and Woode, G.B.** (1987). *Isolation of a rotavirus from a newborn dog with diarrhea*. Am. J. Vet. Res. 42 (5): 841-843.
11. **Hoshino, Y., Baldwin, C.A. and Scott, F.W.** (1981). *Isolation and characterisation of feline rotavirus*. J. gen. Virol. 64: 313.
12. **House, J.A.** (1978). *Economic impact of rotavirus and neonatal disease agent of animals*. J. Am. Vet. Med. Assos. 173: 573-576.
13. **Joklik, K.W.** (1985). *Virology*. Second Edition. Appleton Centry Grofts, Norwalk, Connecticut, USA.
14. **Kapikian, Z.A. and Chanock, M.R.** (1990). *Rotaviruses* pp: 1353-1404. In: Fields, N.B., Knipe, M.D. *Virology*. Second Edition. Raven Press, New York, USA.
15. **Mc Nulty, M.S.** (1978). *Rotaviruses*. J. gen. Virol. 40: 1-18.

16. **Mc Nulty, M.S. and Mc Ferran, 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.
17. **Mebus, C.A., Underdahl, N.R., Rhoades, M.B. and Twiehaus, M.J.** (1969). *Calf diarrhoea (scours): Reproduced with a virus from a field outbreak*. University of Nebraska Agricultural Experiment Station Research Bulletin. No: 233.
18. **Mebus, C.A., Kono, M., Underdahl, N.R., Rhoades, M.B. and Twiehaus, M.J.** (1971). *Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus*. Can. Vet. Jour. 12: 69-72.
19. **Mochizuk, M. and Makoto, Y.** (1987). *Detection of rotaviruses in feces*. Jpn. J. Vet. Sci. 49(1): 159-160.
20. **Moon, H.W., Mc Clurkin, A.W., Isaacson, R.E., Pohlenz, J., Skatvel T.S.M., Gillette, K.G. and Baetz, A.L.** (1978). *Pathogenic relationships of rotavirus escherichia coli and other agents in mixed infections in calves*. J. Am. Vet. Med. Assos. 173: 577-583.
21. **Murakami, Y., Nishioka, N., Hashiguchi, Y. and Kunisayu, C.** (1981). *Neutralising pattern of anti-bovine rotavirus (Lincoln) serum against cytopathic bovine rotaviruses isolated from calves in Japan*. Microbiol. Immunobiol. 25(10): 1097-1100.
22. **Rodger, S.M., Craven, J.A. and Williams, I.** (1975). *Demonstration of reovirus-like particules in intestinal contents of piglets with diarrhoea*. Aust. Vet. Jour. 51: 536.
23. **Saneketa, T., Yoshida, Y. and Oda, K.** (1979). *Detection of rotavirus from feces by reversed passive haemagglutination method*. J. Clin. Pathol. 32: 963.
24. **Sato, K., Inaba, Y., Takuhso, S., Miura, Y., Kaneko, N., Asagi, M. and Matumato, M.** (1984). *Detection of bovine coronavirus in feces by reversed passive hemagglutination*. Arch. of. Virol. 80: 23-31.
25. **Snodgrass, D.R., Smith, W., Gray, E.W. and Herring, J.A.** (1976). *A rotavirus in lambs with diarrhoea*. Res. Vet. Sci. 20: 113-114.
26. **Takahashi, T., Goto, M., Imagawa, H., Arita, H., Hayashi, S. and Ogata, S.** (1988). *Virological and serological studies of rotavirus infection in foals raised in race horse farms*. Res. Bull. Obihiro. Univ. 1 (15): 255-263.
27. **Yazıcı, Z.** (1992). *Buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu*. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.