

YENİDOĞAN İSHALLİ BUZAĞILARDA ROTAVİRUSLARIN ELEKTRON MİKROSKOPİ (EM), ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) VE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (PAGE) TEKNİKLERİ İLE ÇABUK TEŞHİSİ VE ANTİJENİK KARAKTERİZASYONU*

İbrahim BURGU**

Aykut ÖZKUL****

Yılmaz AKÇA***

Taner KARAOĞLU*****

Feray ALKAN***

Rapid Detection and Antigenic Characterization of Rotaviruses in Newborn Diarrheic Calves Using Electron Microscopy (EM), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Techniques

Summary: *In this research, presence of bovine rotavirus (BRV) infection was investigated using EM, ELISA and PAGE techniques in diarrheic calves reared either in the intensive dairy herds or in the private small capacity farms. In closed dairy herds where 78 diarrheic calves had been sampled, 31 (41%) cases were caused by BRV whereas 5 (17%) of 29 diarrheic calves were proven to be affected by BRV in private sector. As a result of serological monitoring of affected calves and their dams, neutralizing antibodies against BRV were found in 36 (45%) diarrheic calves and in 19 (28.3%) dams.*

At the end of this research it has been concluded that, BRV infection was found as to be predominant cause of 33.6 percent of detectable neonatal diarrhea cases in Turkey and the corresponding agent could be diagnosed with high sensitivity using ELISA and PAGE techniques. Besides, the data obtained from the research have indicated that newborn calves have not been protected enough by means of colostral antibodies against BRV infection.

Özet: *Bu araştırmada hem yoğun besicilik yapılan kapalı süt yetiştirmeleri hem de halk elinde bulunan yeni doğmuş ishalli buzağılarda Sığır Rotavirus (BRV)'lerinin varlığı EM, ELISA ve PAGE teknikleri ile araştırıldı. 78 ishalli buzağının örneklendiği kapalı yerleştirmelerde 31 (%41) olguda ve halk elinde beslenen 29 ishalli buzağının 5 (%17) tanesinde her üç testten en az bir tanesi ile BRV tespit edildi. Yapılan serolojik kontrollerde ise kan serumu alınan 80 ishal olgusunun 36 (%45) adedinde, bu hayvanlara ait annelerin ise 19 (%28.3) adedinde BRV'ye karşı nötralizan antikolar saptandı.*

Bu araştırma neticesinde BRV enfeksiyonunun, tespit edilebilen neonatal ishal olgularının %33.6'sında primer etken olduğu ve sözkonusu enfeksiyonun ELISA ve PAGE teknikleri ile yüksek bir duyarlılıkla tespit edilebileceği sonucuna varıldı. Araştırma bulguları, ayrıca, kapalı yetiştirmelerdeki buzağuların, kolostroal yolla BRV enfeksiyonuna karşı yeterli bağışıklık edinemediklerini de ortaya koydu.

* Bu araştırma AÜ Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No. 92.10.00.13.

** Prof. Dr. AÜ. Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD, Ankara.

*** Doç. Dr. AÜ. Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD, Ankara.

**** Dr. AÜ. Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD, Ankara.

***** Araş. Gör. AÜ Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD, Ankara.

Giriş

Yenidoğanlardaki enteritis olaylarında enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan çok sayıda etken rol oynamaktadır. Enfeksiyöz karakterli ishal olgularından sorumlu olarak bildirilen virus enfeksiyonları özellikle yoğun besicilik yapılan kapalı yetiştirmelerde yenidoğanları tehdit eden faktörlerin başında gelmektedir (5, 9, 25). Sözkonusu viruslar arasında yeralan rotaviruslar, enteritis etkeni olarak bir çok türün yeni doğanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (9, 15, 25).

Sığır rotavirusları (BRV) özellikle sonbahar ve kış aylarında yenidoğan buzağuları etkileyerek (14) ve önlem alınmadığı takdirde sürü içinde mortalitenin artmasına (15) neden olarak, kapalı yetiştirmelerde verimliliği düşüren önemli unsurlar arasında yer almaktadır.

Reoviridae familyasının bir üyesi olan etken 11 segment taşıyan çift iplikçikli ve pozitif polariteli RNA'ya sahiptir. Segmentlerin moleküler ağırlıkları 2×10^6 - 0.2×10^6 dalton arasında değişmektedir (12). Zar içermeyen rotaviruslar 60-80 nm çapında olup, bir veya iki dış ve bir iç protein kılıfa sahiptirler (11).

Bilinen bütün rotavirusların iç kapsit tabakalarında ortak grup antijenleri yeralırken, tip spesifik antijenlerin dış kapsit tabakasında bulunduğu tespit edilmiştir. Jel elektroforez yöntemiyle yapılan genom segment analizlerinde çok farklı RNA kalıpları tespit edilmiş (18) olmasına karşın serotip sayısı sınırlıdır (3, 17).

Rotaviral enteritisler çoğunlukla 1-8 haftalık buzağularda sulu, sarı renkli ishale karakterizedir. Etkenin oral yolla alınmasından 16-24 saat sonra ile enfeksiyon belirtileri oluşmaya başlar. İncebarsak villilerinin etkilenmesi sonucu deformasyon oluşur ve barsak lümeninde laktoz gibi disakkaritlerin enzimlerinin azalması ve glukoza bağlı Na⁺ transportunun durması meydana gelir. Sindirilmemiş laktozun bakteriyel üremenin artışından sorumlu olduğu bildirilmiştir (16).

Enfeksiyonun teşhisi amacıyla geliştirilen farklı teknikler arasında en yaygın olarak kullanılanlar Elektron mikroskopi (EM) (5, 11, 20, 23), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (9, 20, 23, 26), Immuno electro osmophoresis (IEOP) (6), Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) (7, 10, 17, 21), Revers Passive Haemagglutination (RPHA) testi (1), Immunofluorescent Test (FAT) (2) olarak bildirilmektedir.

Wandeler ve ark. (25) 416 adet gaita örneğinde rotavirusların varlığını FAT ve ELISA ile

karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. 307 örnek her iki testle pozitif sonuç verirken, 3 numune yalnız FAT, 34 numune ise sadece ELISA ile pozitif sonuç vermiştir. Araştırmacılar (25) aynı araştırma kapsamında ayrıca, takip ettikleri bazı olgularda ishahın devam ettiği klinik dönem süresince, virus antijenlerinin ELISA ile aniden tespit edilemez düzeylere düştüğü bulgusu da elde etmişlerdir.

Simhan ve ark. (23) ELISA ve EM'yi karşılaştırdıkları bir araştırmada, EM ile BRV tespit edilemeyen %5.6'lık olgu dilimini ELISA ile pozitif olarak saptamışlardır.

Ellens ve de Leew (6) yaptıkları bir araştırmada, en çarpıcı sonuçlardan bir tanesini semikantitatif EM teşhisi ve ELISA testinin duyarlılığını tespit etmek amacıyla elde etmişlerdir. Araştırmacılar (6) gaita ekstratı 10^5 partikül içerdiğinde ELISA testinin, 10^7 partikül içerdiğinde ise EM'nin pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (6) ayrıca ELISA, EM ve IEOP tekniklerini karşılaştırmak amacıyla 98 ishahli dana gaitası kullanmışlar ve sonuçta ELISA'nın IEOP'den 100 kat daha duyarlı olduğunu saptamışlardır.

Enfeksiyonun Türkiye'deki tespiti ilk kez serolojik olarak Burgu ve Akça (4) tarafından erişkin sığırlarda yapılmıştır. Yenidoğanlardaki ishal olaylarında BRV varlığı ise Yazıcı (26) tarafından %17'lik bir oranla tespit edilmiştir. Alkan ve ark (1) tarafından yapılan bir diğer araştırmada ise 0-1 ay yaş grubunda ishal semptomu gösteren buzağulardan alınan 97 adet gaita örneğinin 26'sında (%26.8) RPHA testi ile rotavirus antijenlerinin varlığı tespit edilmiştir.

Bu araştırmada yenidoğan ishahli buzağularda sığır rotaviruslarının PAGE, ELISA ve EM tekniklerini kullanarak süratle teşhis edecek en duyarlı test sisteminin saptanması amaçlanmıştır. Yine bu araştırma ile, etkilenen buzağuların gaitalarında tespit edilen BRV'ların PAGE tekniği kullanılarak genom segment analizleri yapılmış ve bilinen rotavirus alt grupları içindeki yeri tespit edilmiştir.

Materyal ve Metot

Gaita Örnekleri: Araştırmada hem yoğun besicilik yapılan kapalı işletmeler, hem de halk elindeki ishal semptomu gösteren 0-48 günlük buzağulardan alınan toplam 107 adet gaita örneği kullanıldı. Toplanan 107 adet gaita örneğinin 78 adedi kapalı yetiştirmelerden, 29 adedi ise halk elinde yetiştirilen hayvanlardan elde edildi (Tablo 1).

Serum Numuneleri: Gaita örneği alınan 107 adet diarreha olgusunun 80 tanesinden aynı

zamanda serum numunesi de alındı. Ayrıca bu 80 adet buzağının anaları tespit edilmek suretiyle, 67 tanesinden kan serumu alınarak BRV yönünden serolojik olarak kontrole tabi tutuldu. Serum numunesi alınamayan olgular, özellikle halk elinde bulunan ve yalnızca gaita numuneleri anabilim dalımıza gönderilen olgular olarak kaydedildi.

Hücre Kültürü: Virus izolasyonu ve serum nötralizasyon testi ile diğer direkt teşhis tekniklerinde kullanılan kontrol antijenlerinin hazırlanması amacıyla MDBK hücre kültüründen yararlanıldı.

Virus: Araştırmada BRV'nin Northern Ireland 75/447 suşu kullanıldı.

BRV Nükleik Asitinin Ekstraksiyonu: Bu amaçla Herring ve ark (10) tarafından bildirilen metot kullanıldı. Gaita numuneleri %1 sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 0.1 M Na-asetat tamponu içinde (pH 5.0) 1:4 oranında sulandırıldı. Gaita süspansiyonuna eşit hacimde 8-hidroksikinolin içeren Fenol-Kloroform karışımı (3:2, v/v) ilave edildi ve 1 dakika müddetle vortekste karıştırıldı. Emülsiyon halindeki karışım 10 dakika 2000 devirde santrifüj edilerek, berrak üst kısım alındı. Numune daha sonra %0.2 Bromfenol mavisi içeren %25'lik sukroz ile karıştırılarak, PAGE için hazır hale getirildi.

PAGE'de kullanılan pozitif kontrol, MDBK hücre hattında üretilen BRV Northern Ireland 75/447 suşundan elde edildi. Virusa ait sitopatik etki (cpe) %80 düzeyine ulaşınca, 3 kez dondurulup çözülen süpernatanttan 0.45 ml alındı ve 0.05 ml SDS ve 0.5 ml fenol-kloroform ile karıştırılmak suretiyle daha önce belirtilen basamaklara tabi tutuldu.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE): Test Herring ve ark. (10) tarafından bildirildiği şekilde yapıldı.

%7.5 olacak şekilde hazırlanan poliakrilamid jele, (akrilamid: bisakrilamid, 37.5: 1), özel enjektör yardımıyla 0.04 ml hacminde numuneler konuldu. Numunelerin yerleştirilmesi sırasında komşu kuyucuklara karışma olmamasına özen gösterildi. Jel ve elektrod tamponu olarak 0.036 M Tris-0.03 M Na_2HPO_4 -0.001 M EDTA (pH 7.8) kullanıldı. Elektroforezis işlemi +4°C'de 20 miliAmper'de 16 saat süreyle gerçekleştirildi. Süre sonunda özenle küvet içine alınan jel gümüş boyamaya tabi tutuldu.

Gümüş Nitrat Boyama: Sammons ve ark. (22) tarafından bildirilen yöntemle yapıldı. Bu amaçla jel %10 Etanol ve %0.5 Asetik asit karışımında 30 dakika süreyle yıkandıktan sonra, 20 dakika 0.01 M AgNO_3 içinde bekletildi.

Jelin distile su ile yıkanmasını takiben bantlarını gözle görülebilir hale gelmesi için 0.1 M formaldehit içeren 0.75 M NaOH, jele muamele edildi. Kısa sürede şekillenen bantların netleşmesi amacıyla, 10 dakika bekletilen karışıma 0.07 M Na_2CO_3 ilave edilerek reaksiyon tamamlandı.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Bu amaçla ticari ELISA test kiti (Mercia Diagnostics, Shalford, Surrey, UK) kullanıldı. Üretici firma tarafından belirtilen uygulama yönergesi doğrultusunda, 1:10 sulandırılmış gaita örnekleri (w/v), tavşan- α -BRV serumu ile kaplanmış ELISA pleyti gözlerine 0.1 ml hacimde konuldu. Benzer şekilde pozitif ve negatif kontrolleri yerleştirilen pleyt, 60 dakika 37°C'de inkube edildi. Süre sonunda 3 kez yıkanan pleytin tüm gözlerine biotin ile işaretli tavşan- α -BRV IgG'si ve streptoavidine konjug edilmiş HRPO konjugat karışımından (TRACER) 0.1 ml hacminde konularak, aynı şartlarda inkube edildi. Yenilenen yıkama işleminden sonra tetrametil benzidin (TMB) kromojeni, substrat tamponu içinde hazırlanarak pleyt gözlerine dağıtıldı. 30 dakika sonra reaksiyon 2 M H_2SO_4 ilavesi ile durduruldu. Test spektrofotometrik olarak 450 nm filtre absorbanları okunmak suretiyle değerlendirildi.

Elektron Mikroskopi (EM): EM ile kontrol amacıyla kullanılacak preparatlar, gaita numunelerinden flotasyon tekniği kullanılarak hazırlandı. İshalli buzağılardan alınan gaitaların 1:10'luk süspansiyonları (w/v) hazırlanarak 3000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant'dan alınan bir damla gaita süspansiyonu parafilm üzerine konulduktan sonra üzerine formvar/karbon kaplı grid yerleştirilerek 45 dakika bekletildi. Süre sonunda grid %1 Fosfontungstik asit (PTA) (pH 7.0) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Carl Zeiss EM 9 S-2 model EM'de incelendi.

Hücre Kültürü İzolasyonu: Direkt teşhiste kullanılan her üç testten en az bir tanesi ile BRV yönünden pozitif olarak saptanan gaitalar, Kutsuzawa ve ark (13) tarafından bildirilen yöntem ile hücre kültürüne inokule edildi. Bu amaçla MEM içinde %10 olacak şekilde sulandırılan gaita numunesi 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant içinde 20 g/ml tripsin içeren MEM ile eşit hacimde karıştırılarak 20 dakika inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda numune MDBK devamlı hücre kültürü kaplanmış rolling tüplere 0.2 ml hacimde inokule edildi. 37°C'de 60 dakika süreyle yapılan inkubasyondan sonra, vasat 0.5 g/ml tripsin içerecek şekilde yenilendi. İnkubasyona 10 gün

Tablo 1. Araştırmada kullanılan ishal semptomlu buzağuların yetiştirilme şekilleri ve BRV prevalansı.

Table 1. The housing conditions of diarrheic calves used in the research and prevalence of BRV infection.

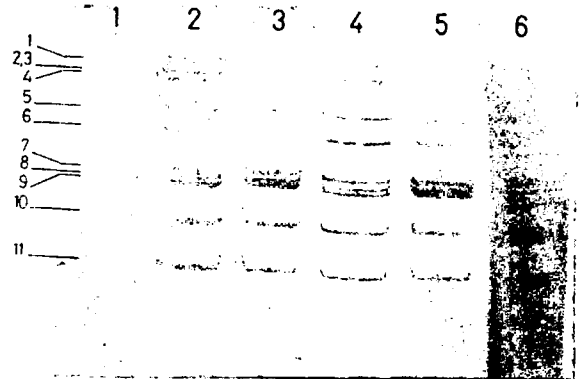
İşletme Kodu	İli	Yetiştirme Şekli	Örneklenen Buzağı Sayısı	+	BRV %
I	Muğla	KY ¹	12	5	42
II	Kırklareli	KY	4	3	75
III	Tekirdağ	KY	1	1	100
IV	Samsun	KY	3	2	67
V	Denizli	KY	3	1	34
VI	Ankara	KY	3	-	-
VII	Muş	KY	2	1	50
VIII	Bursa	KY	50	18	72
Ara Toplam 1			78	31	41
IX	Izmir	KçY ²	2	1	50
X	Eskişehir	KçY	3	-	-
XI	Ankara	KçY	24	4	17
Ara Toplam 2			29	5	17
TOPLAM			107	36	34

1 Kapalı süt yetiştirmesi

2 Küçük yetiştirme

Sıra No	Olgu No	Yaş (Gün)	Cinsiyet D ¹ ,E ²	PAGE	EM	ELISA
1	RP-01	48	D	+	-	-
2	RP-03	17	F	-	-	+
3	RP-05	15	D	+	-	-
4	RP-07	12	F	-	-	-
5	RP-09	11	D	+	-	+
6	RP-11	27	D	+	+	+
7	RP-12	27	F	-	+	+
8	RP-13	30	E	+	-	+
9	RP-14	26	D	+	-	-
10	RP-15	15	D	+	-	-
11	RP-16	17	D	+	-	-
12	RP-20	14	D	+	-	+
13	RP-24*	BY ³	BY	+	-	+
14	RP-30	10	D	-	-	+
15	RP-38	12	D	+	-	+
16	RP-39	12	D	+	+	+
17	RP-40	09	D	+	+	+
18	RP-44	07	D	+	-	-
19	RP-45	13	D	+	+	+
20	RP-48	07	D	+	-	+
21	RP-49	07	D	+	-	-
22	RP-51	07	D	+	-	+
23	RP-52	07	D	-	-	-
24	RP-53	11	D	+	-	+
25	RP-54	11	D	+	+	+
26	RP-55	11	D	-	-	+
27	RP-56	12	D	+	-	+
28	RP-60	11	D	+	-	+
29	RP-62	10	D	+	+	+
30	RP-63	07	D	+	-	+
31	RP-73	15	D	-	-	+
32	RP-75	17	D	-	-	+
33	RP-92*	BY	BY	-	+	+
34	RP-94*	BY	BY	+	-	+
35	RP-97*	BY	BY	+	+	+
36	RP-99*	BY	BY	+	-	-
%				28.3	8.4	27.1

* Küçük yetiştirmelerden yollanan numuneler.

¹ Dişi² Erkek³ Bilgi yokTablo 2. İshal semptomlu buzağularda BRV veya BRV antijenlerinin PAGE, EM ve ELISA testlerine göre dağılımı.
Table 2. Distribution of BRV or BRV antigens in diarrheic calves according to PAGE, EM and ELISA tests.

Resim 1: Gaita numunelerinde tespit edilen BRV nükleik asitlerinin elektroforetik genom segment analizi.

Figure 1: Electrophoretic segment analysis of BRV nucleic acids detected in fecal samples.

1. Sütun - BRV Northern Ireland 75/447 suşu (Virus Kontrol)
 2. Sütun - Olgu no RP-11, 3. sütun - Olgu no RP-20,
 4. sütun - Olgu no RP-25, 5. sütun - Olgu no RP-29,
 6. sütun - Olgu no RP-35

süre ile devam edilerek, hücrelerde BRV'ye özel sitopatolojik değişiklikler (cpe) arandı.

Serum Nötralizasyon Testi (SNT): Test Frey ve Liess (8) tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı.

Serum numuneleri 1:5'den başlamak üzere log₂'ye göre 4 basamak sulandırıldı ve her sulandırma BRV'un Northern Ireland 75/447 suşu



Resim 2. EM ile gaita numunelerinde tespit edilen BRV partikülleri (x 300.000).
Figure 2. BRV particles detected in fecal specimens by EM (Magnification x 300.000).

(100 DKID₅₀=10^{-1.7}/0.05 ml) ile eşit hacimde karıştırıldı. Nötralizasyon işlemi için 37°C'de CO₂ etüvde 1 saat inkübe edilen pleytlerin gözlerine 300.000/ml olacak şekilde sulandırılan MDBK hücre süspansiyonundan 0.05 ml hacimde konuldu. Test, virus kontrol için ayrılan gözlerde %100 cpe saptandığı anda değerlendirildi.

Bulgular

Örneklenen Sürüler: Gerek kapalı yetiştirmelerden ve gerekse halk elinden örneklenen ishal olgularında, araştırmada kullanılan her üç testin en az bir tanesi ile BRV tespit edilen olgu sayısı ve işletme veya sürü düzeyinde BRV prevalans değerleri Tablo 1'de sunuldu.

PAGE: Yapılan PAGE analizi neticesinde 30 adet (%28.3) numunede BRV genom segmentleri tespit edildi (Tablo 2). Oluşan PAGE kalıpları incelendiğinde BRV pozitif numunelerin 11 RNA segmentine sahip A tipi rotavirus oldukları saptandı (Resim 1).

EM: Sığır rotaviruslarının tekerliği andıran karakteristik görünümü flotasyon tekniği ile sadece 9 numunede (%8.4) tespit edildi (Tablo 2), (Resim 2).

ELISA: ELISA testi ile 29 adet (%27.1) gaita numunesinin BRV antijeni taşıdığı saptandı (Tablo 2).

Virus İzolasyonu: Yapılan hücre kültürü inokulasyonları neticesinde BRV için karakteristik cpe bulgusuna rastlanmadı.

Serum Nötralizasyon Testi (SNT): SN testi ile BRV antikorları yönünden test edilen 80 adet buzağı serumunun 36 tanesi (%45), 67 anne serumundan ise 19 adedinde (%28.3) 1/5

ve daha yüksek sulandırmalarda BRV antikor pozitif bulundu (Tablo 3). Seropozitif buzağılarda serum nötralizan dozu (SN₅₀) değerlerinin 1:5 - 1:30, annelerde ise 1:5 - 1:20 arasında oldukları tespit edildi (Tablo 3). Gaitalarında BRV veya BRV antijenleri tespit edilen 36 buzağıdan 15 adedinin BRV-spesifik nötralizan antikorları taşıdığı (Tablo 4) saptanırken, gaita örneklerinde herhangi bir test yöntemi ile BRV tespit edilemeyen buzağuların 21 adedinin de aynı şekilde söz konusu antikorlara sahip olduğu saptandı (Tablo 5). Serum örneği alınan buzağuların 44 adedinde ise ne gaita örneklerinde BRV ne de serumlarında BRV-nötralizan antikorları tespit edilememiştir. Yine gaitalarında BR virus veya viral antijenleri tespit edilen buzağuların sadece 10 tanesinin annesi BRV'ye karşı seropozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 4).

Gaitalarında her üç yöntemden en az bir tanesi ile BRV veya BRV antijeni tespit edilen buzağılarda BRV'ye karşı ortalama 1:8.4 antikor titresi tespit edilirken (Tablo 4), herhangi bir yöntemle gaitalarında BRV bulunamayan buzağılarda ise bu değer 1:8.8 olarak tespit edildi (Tablo 5). Annelerde hesaplanan ortalama antikor titresi ise 1: 8.2 olarak saptandı (Tablo 4, Tablo 5).

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada klinik olarak diarrhea semptomu gösteren 107 adet buzağının gaita örneklerinde ELISA, PAGE ve EM teknikleri kullanılarak sığır rotaviruslarının direkt teşhisi amaçlanmıştır. Gaitalarda tespit edilen BRV'lerin elektroforetik olarak tiplendirilmesinin yanısıra, gerek ishalli danalar gerekse annelerinden alınan serum numuneleri SN testine tabi tutularak, enfeksiyonun seroprevalansı yanında, buzağılarda tespit edilecek seropozitifliğin muhtemel sebebi ve koruyuculuk durumu da araştırılmıştır.

Örneklenen olguların 36 adedinde (%33.6) her üç testten en az bir tanesi ile BRV'nin varlığı

Tablo 3. İshalli buzağular ve annelerinde tespit edilen SN₅₀ değerleri dağılımı.

Table 3. Distribution of ND₅₀ values of diarrheic calves and their dams.

	SN ₅₀						TOPLAM
	5	7.5	10	15	20	30	
Buzağı	11	10	6	4	4	1	36
Anne	8	4	1	4	2	-	19

Sıra No	Olgu No	BRV (Pozitif Test/Testler)	SN ₅₀ ¹	
			Buzağı	Anne
1	RP-01	† (PAGE/ELISA)	-	-
2	RP-03	+ (ELISA)	-	-
3	RP-05	+ (PAGE)	-	-
4	RP-07	+ (ELISA)	10	-
5	RP-09	† (PAGE/ELISA)	-	-
6	RP-11	† (PAGE/EM/ELISA)	-	-
7	RP-12	† (PAGE/EM/ELISA)	-	-
8	RP-13	+ (PAGE/ELISA)	5	20
9	RP-14	+ (PAGE)	-	-
10	RP-15	† (PAGE)	7.5	-
11	RP-16	+ (PAGE)	5	-
12	RP-20	+ (PAGE/ELISA)	-	-
13	RP-24	+ (PAGE/ELISA)	-	5
14	RP-30	† (ELISA)	-	SY ²
15	RP-38	† (PAGE/ELISA)	20	-
16	RP-39	- (PAGE/EM/ELISA)	7.5	7.5
17	RP-40	+ (PAGE/EM/ELISA)	20	15
18	RP-44	† (PAGE)	7.5	-
19	RP-45	+ (PAGE/EM/ELISA)	-	-
20	RP-48	+ (PAGE/ELISA)	7.5	5
21	RP-49	† (PAGE)	7.5	7.5
22	RP-51	- (PAGE/ELISA)	5	-
23	RP-52	- (PAGE/ELISA)	-	-
24	RP-53	+ (PAGE/ELISA)	-	10
25	RP-54	+ (PAGE/EM/ELISA)	-	20
26	RP-55	+ (PAGE/ELISA)	7.5	-
27	RP-56	+ (PAGE/ELISA)	20	-
28	RP-60	+ (PAGE/ELISA)	10	-
29	RP-62	+ (PAGE/EM/ELISA)	-	15
30	RP-63	+ (PAGE/ELISA)	-	-
31	RP-73	+ (ELISA)	5	-
32	RP-75	+ (ELISA)	-	5
33	RP-92	† (EM/ELISA)	SY	SY
34	RP-94	† (PAGE/ELISA)	SY	SY
35	RP-97	+ (PAGE/EM/ELISA)	SY	SY
36	RP-99	† (PAGE)	SY	SY
ORTALAMA			8.4	8.2

¹ Nötralizan serum sulandırma değerleri

² Serum numunesi yok

Tablo 4. BRV tespit edilen ishalleri buzağular ve annelerinde tespit edilen nötralizan antikor (SN₅₀) değerleri.

Tablo 4. Neutralizing dose (ND₅₀) values of diarrheic calves in which BRV had been detected and their dams.

ğı tespit edilmiştir. Söz konusu hayvanlarda BRV'nin teşhisi, 8 olguda her üç test ile yapılırken, 7 olgunun teşhisi sadece PAGE, 5 olgunun teşhisi sadece ELISA, 15 olgunun teşhisi hem ELISA hem PAGE ve 1 olgunun teşhisi ise hem ELISA ve hem de EM ile yapılmıştır.

Gaita beraberinde serum numunesi de alınan 80 adet ishalleri buzağıdan 36 tanesinde (%45) BRV'ya karşı nötralizan antikor saptanmış olup, bunların SN₅₀ değerleri 1:5-1:30 arasında dağılım göstermiştir. Gaita örneğinde BRV tespit edilen 36 adet olgunun 4 tanesinden serum örneği elde edilememiş, 18 olgu ise seronegatif olarak değerlendirilmiştir.

Araştırma sonucunda 107 ishal olgusunun 36'sında (%34) tespit edilen BRV enfeksiyonunun prevalansı daha önce Yazıcı (26) tarafından ELISA ve ark. (1) tarafından RPHA testi ile elde edilen prevalans değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bu oran muhtemelen seçilen ishalleri buzağuların daha önceki araştırmacıların (1, 26) örneklediği buzağılara oranla daha

Sıra No	Olgu No	Yaş (Gün)	Cinsiyet D ² ,E ³	SN ₅₀ ¹	
				Buzağı	Anne
1	RP-10	11	D	10	-
2	RP-18	27	D	5	SY ⁴
3	RP-22	10	E	7.5	15
4	RP-23	02	D	5	-
5	RP-31	04	E	15	5
6	RP-32	04	E	20	5
7	RP-33	04	E	5	7.5
8	RP-34	03	E	15	-
9	RP-35	03	E	10	5
10	RP-36	03	E	10	-
11	RP-37	18	D	7.5	5
12	RP-43	06	D	15	7.5
13	RP-46	05	D	5	-
14	RP-58	14	D	5	-
15	RP-59	15	D	10	-
16	RP-64	07	D	5	-
17	RP-65	07	D	5	-
18	RP-66	06	D	30	-
19	RP-68	03	D	15	-
20	RP-69	03	D	7.5	15
21	RP-76	18	D	7.5	5
ORTALAMA				8.8	8.2

¹ Nötralizan serum sulandırma değerleri

² Dişi

³ Erkek

⁴ Serum numunesi yok

Tablo 5. BRV veya BRV viral antijenleri tespit edilemeyen ishalleri seropozitif buzağular ile annelerinin serum nötralizasyon değerleri.

Table 5. Serum neutralization values of mothers and their diarrheic calves in which BRV and/or BRV antigens were not able to be detected.

küçük yaşta olmalarından kaynaklanmaktadır.

Bu araştırmada kapalı yetiştirmelerde tespit edilen BRV enfeksiyonunun prevalansı (%41), küçük kapasiteli özel yetiştirmelerdeki enfeksiyon prevalansından (%17) daha yüksek bulunarak (p<0.05), birçok araştırmacı tarafından (9, 15, 25, 26) bildirildiği üzere, BRV enfeksiyonunun kapalı yetiştirmeler için önemli bir risk faktörü olduğu bir kez daha ortaya konulmuştur.

BRV enfeksiyonundan şüphelenilen olgularda etkenin direkt tespiti amacıyla kullanılan her üç test arasında duyarlılık açısından benzerlik ve farklılıklar saptanmıştır. 107 adet ishal olgusundan elde edilen numunelerin PAGE ile yapılan kontrolünde 30 (%28.3) adedinde BRV nükleik asidi, ELISA tekniği kullanılarak yapılan kontrolünde ise 29 (%27.1) adedinde BRV antijeni bulunmuştur. Elde edilen bulguların yapılan istatistik analizleri neticesinde, söz konusu her iki testin birbirine benzer duyarlılıkta olduğu saptanmıştır (p>0.05).

Diğer taraftan EM tekniği kullanılarak kontrolü yapılan aynı sayıdaki gaita örneklerinden sadece 9 adedinde etken tespit edilmiş olması, bu tekniğin hem PAGE hem de ELISA tekniklerinden daha az duyarlı olduğu sonucunu

ortaya çıkarmıştır ($p < 0.001$). EM tekniği ile yapılan direkt BRV teşhisinde diğer test tekniklerine oranla bu kadar farklı sonuç elde edilmesinde, aşağıdaki noktaların önemli birer faktör olabilecekları sanılmaktadır; i) Benfield ve ark (2) doğru bir EM teşhisi için gaitada 10^6 - 10^8 virus partikülü/ml bulunması gerekliliğini bildirmektedir. Bu nedenle incelenen örneklerdeki virus partikül sayısının bildirilenden az olması, ii) preparatların hazırlanma tekniği olan flotasyon işlemi sırasında grid yüzeyine çok miktarda gaita içeriğinin tutunarak virus partiküllerini maskeleymesi, iii) gaita içinde bulunan serbest virus partiküllerinin morfolojilerini kaybetmiş olmaları. Olası sebepler arasında verilen son durumun (iii) geçerli olması halinde, parçalanmış protein kılıftan serbest kalan nükleik asitin PAGE ile ve diğer tüm viral komponentlerin ELISA testi ile saptanmasının mümkün olması bu düşüncüyü destekleyen bir diğer önemli noktadır. Ellens ve deLeew (6) tarafından yapılan bir çalışmada ELISA testi ile EM tekniği arasında saptanan farklılık, burada sunulan çalışmada elde edilen bulgular ile aynı paralellikte belirtilmiştir.

İshalli buzağuların yapılan serolojik kontrolleri neticesinde BRV tespit edilen ve BRV tespit edilemeyen gruplarda ortalama antikor titre değerleri ayrı ayrı 1:8.4 ve 1:8.8 olarak saptanmıştır. Enfeksiyon anında tespit edilen bu durum, Snodgrass ve Wells (24) tarafından bildirildiği şekilde, sirkülasyondaki antikorların BRV enfeksiyonundan korunmada etkin rol oynamadıkları savını da doğrular mahiyettedir.

Annelerde tespit edilen %28.3'lük BRV seroprevalansı ile 1:8.2 değerinde ortalama nötralizan antikor titresi yavrulara kolostrum yoluyla verilecek pasif immünite için yetersiz değerler olarak saptanmıştır. Tablo-3'de verilen değerler incelendiğinde, BRV tespit edilemeyen seropozitif buzağulara ait bazı titreler maternal titre değerlerinden yüksek bulunurken, bir diğer kısım buzağıya ait annede hiç antikor tespit edilememiştir. Bu durum söz konusu buzağularda kaydedilen seropozitiflerin akut BRV enfeksiyonu neticesinde meydana gelmiş olduğu sonucunu güçlendirmektedir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi, ishalli buzağularda, bildirilen üç teşhis metodundan en az bir tanesi ile BRV veya BRV antijenlerinin tespit edildiği en erken dönem doğumu izleyen 7. gün olarak saptanmıştır. Tüm BRV pozitif olgularda kaydedilen yaş ortalaması ise 12.7 gün olarak bulunmuştur. Garcia-Sanches ve ark. (9) tarafından yapılan bir çalışmada PAGE ile BRV nükleik asit segmentlerinin tespiti en erken doğumu takip eden 2. günde yapılabilmüş ve virus saçılımı en çok ilk tespitteki sonraki 7. güne

kadar devam etmiştir. Araştırmacılar (9) ortalama enfeksiyon yaşını ise doğumdan sonraki 13. gün olarak belirtmişlerdir.

PAGE tekniği kullanılarak yapılan genom segment analizleri sonucunda, toplam 30 adet BRV pozitif numunede RNA'ların 11 segmentli olduğu tespit edilmiştir (Resim-1). Elde edilen tüm segment profilleri incelendiğinde ise çalışmada teşhis edilen rotaviral diarreya olgularında, Pedley ve ark (18) tarafından bildirilen tipik A grubu rotavirusların segment dağılımı saptandı. Her ne kadar aynı grup içindeki BRV'nın segment dağılımlarında farklı kalıplara rastlanabileceği Pocock (19) tarafından bildirilmiş ise de, bu çalışmada segment dağılımlarına ilgili detaylı bir inceleme yapılmamıştır.

Özellikle doğumu izleyen 7. günden sonra karşılaşılan enteritis olgularında BRV enfeksiyonunun önemle üzerinde durulması gerekmektedir. Yapılan anne-buzağı serolojik test değerlendirmeleri dikkate alındığında ise, annelerin kolostrum veya sütle yavruyu korumaya yetecek düzeyde periferik antikor taşımadıkları, benzer şekilde buzağularda tespit edilen serolojik yanıtın da buzağıyı sözkonusu enfeksiyondan korumak için yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır.

Bu araştırma neticesinde özellikle yoğun besicilik yapılan kapalı işletmeler için BRV'nın önemle üzerinde durulması gereken bir enteritis etkeni olduğu ve Türkiye'de sözkonusu enfeksiyonun prevalansının daha önce değişik araştırmacılar (1, 4, 26) tarafından bildirilenlerden daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada sonuçlarına göre her üç ishal olgusundan birinin etkeni olan rotavirusların sebep olabileceği ekonomik olumsuzlukların önüne geçilebilmesi, kapalı statüde yoğun besicilik yapılan işletmelerde doğum sonrası hijyenik şartların düzenlenmesi ile mümkün olabilecektir. Doğumu izleyen en kısa sürede buzağının kolostrum alması enfeksiyondan korunmada ne kadar gerekli ise ishal semptomu gösteren buzağulara, süt diyetinin uygulanmasının da bakteriyel komplikasyonların önlenmesi yönünden ayrı bir önemi olduğu hatırlanmalıdır.

Kaynaklar

1. Alkan, F., Pulat, H., Yazıcı, Z. ve Burgu, İ. (1992). Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon testi ile ishalli buzağı gaitalarında rotavirusların tespiti. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg., 39: 238-246.
2. Benfield, D.A., Stotz, I.J., Nelson, E.A. and Groon, K.S. (1984). Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with electron microscopy, fluorescent antibody, and virus isolation for the detection of bovine and porcine rotavirus. Am J Vet Res, 45: 1989-2002.

3. **Brussow, H., Marc-Martin, S., Eichhorn, W., Sidoti, J. and Fryder, V.** (1987). *Characterization of a second bovine rotavirus serotype*. Arch Virol, 94: 29-41.
4. **Burgu, İ. ve Akça, Y.** (1983). *Sığırlarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerinde çalışmalar*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 30: 35-44.
5. **El-Ghorr, A.A., Snodgrass, D.R. and Scott, F.M.M.** (1988). *Evaluation of an immunogold electron microscopy technique for detecting bovine coronavirus*. J Virol Meth, 19: 215-224.
6. **Ellens, D.J. and deLeew, P.W.** (1977). *Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves*. J Clin Microbiol, 6: 530-532.
7. **Espejo, R.T., Munoz, O., Serefin, F. and Romero, P.** (1980). *Shift in prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences*. Infect Immun, 27: 351-354.
8. **Frey, H.R. und Liess, B.** (1971). *Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-methode*. Zbl Vet B, 18: 61-71.
9. **Garcia, Sanchez, J., Corral, C., Halaihel, N.G., Simn, M.C., Alonso, J.L., Muzquiz, J.L., Ortega, C. and Girones, O.** (1993). *Survey of rotavirus infection in a dairy herd: comparison between polyacrylamide gel electrophoresis and two commercial tests*. Vet Microbiol, 34: 321-332.
10. **Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R. and Menzies, J.D.** (1982). *Rapid diagnosis of Rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels*. J Clin Microbiol, 16: 473-477.
11. **Iwagawa, H., Woda, R. and Hirasawa, K.** (1983). *Electron microscopy of equine rotavirus in MA-104 cell*. Bull Eq Res Inst, 20: 154-157.
12. **Kalica, A.R., Wyatt, R.G. and Kapikian, A.Z.** (1978). *Detection of differences among human and animal rotaviruses using analysis of viral RNA*. JAVMA, 173: 531-537.
13. **Kutsuzawa, T., Konno, T., Suzuki, H., Kapikian, A.Z., Ebina, T. and Ishida, N.** (1982). *Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture*. J Clin Microbiol, 16: 727-730.
14. **McNulty, M.S.** (1978). *The rotaviruses*. J Gen. Virol, 40: 1-18.
15. **McNulty, M.S.** (1983). *Longitudinal survey of rotavirus infection in calves*. Vet Rec, 113: 333-335.
16. **Mebus, C.A., Stair, E.L., Underdahl, N.R. and Twiehaus, M.J.** (1971). *Pathology of neonatal calf diarrhea induced by reolike virus*. Vet Pathol, 8: 490-505.
17. **Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R. and Herring, A.J.** (1984). *Evidence for serotypic variation among bovine rotaviruses*. Arch Virol, 79: 161-171.
18. **Pedley, S., Bridger, J.C., Brown, J.F. and McRea, M.A.** (1983). *Molecular characterization of rotavirus with distinct group antigens*. J Gen Virol, 64: 2093-2101.
19. **Pocock, D.H.** (1987). *Characterization of rotavirus isolates from subclinically infected calves by genome profile analysis*. Vet Microbiol, 13: 27-34.
20. **Reynold, S.M., Chasey, D., Scott, A.C. and Bridger, J.C.** (1984). *Evaluation of ELISA and EM for detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces*. Vet Rec, 114: 397-401.
21. **Rodger, S.M., Bishop, F.R., Birch C., McLean, B. and Holmes, I.H.** (1981). *Molecular epidemiology of human rotavirus in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979 as determined by electrophoresis of genom ribonucleic acid*. J Clin Microbiol, 13: 272-278.
22. **Sammons, D.W., Adams, L.D. and Nishizawa, E.E.** (1981). *Ultrasensitive silver-based color staining polypeptides in polyacrylamide gels*. Electrophoresis, 2: 135-141.
23. **Simhan, A., Amato, S., Hernandez, F., Yolken, R.H. and Mata, I.** (1979). *Diagnostico de rotavirus por microscopia electronica y el ensayo, inmunosorbente enzima conjugada (ELISA)*. Bol Sanit Panam, 86: 391-397.
24. **Snodgrass, D.R. and Wells, P.W.** (1978). *The influence of colostrum on neonatal rotaviral infections*. Ann Rech Vet, 9: 335-336.
25. **Wandeler, A., Kunzli C., Kunz, U. and Steck, F.** (1980). *Rotavirus infections in calves*. Experientia, 36: 498.
26. **Yazıcı, Z.** (1991). *Buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu*. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktor Tezi, Ankara.