

DANA VE BUZAĞILARDA VİRAL ENTERİTİSLER
I- VIRUS İZOLASYONU ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

İbrahim Burgu* **Yılmaz Akça**** **Hikmet Ünsüren*****

Viral enteritis of Calves I. Studies on the virus isolation.

Summary: *In this study fecal samples were collected from 26 suckling calves and young calves suffering from diarrhea. These animals between 1 day - 8 months of age, belonged to the different part of Ankara and were brought to veterinary Faculty, Internal Disease Clinic for treatment.*

Fecal samples were diluted in 1 : 10 PBS containing 10 x antibiotic solution. Two parts of each fecal samples were mixed 1 part of 1, 1, 2-Tri chlor-triflourethene and were shaken 5 minutes. These mixtures were centrifugated in 3000 rpm for 30 minutes to remove debris. The supernatants were taken and after the sterilization control, they were stored at -80°C., till use.

From each sample 0,2 ml. was inoculated in two tubes of MDBK cell culture and they incubated at 37°C. These culture tubes were examined daily for 7 days to determine the cytopathogenic effect (CPE). All samples were passaged 3 times in MDBK cell cultures.

In 5 out of 26 fecal samples, cytopathic changes were observed and they were regarded as positive. These positive samples were passaged up to 9 th in MDBK, twice in primary calf testes and fetal lamb muscle epithel ana one time in fetal lamb kidney ana fetal calf kidney cell cultures.

The titers of the isolated viruses were found between $TCID_{50} = 10^{3,25}$ to 10^8 /ml. in MDBK cell cultures.

Studies on the identification of these isolatea viruses will be continued.

Özet: *Fakültemiz iç hastalıkları kliniğine enteritis semptomları ile*

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

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

*** Doç.Dr. Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Bilim Dalı, Ankara.

getirilen 1 günlükle 8 aylık arası 26 buzağı ve danadan gaita numuneleri toplandı.

Bu numunelerden MDBK hücre kültürlerine yapılan inokulasyonlar sonunda sitopatolojik efekt meydana getiren 5 virus izole edildi.

Giriş

Buzağı ve danalarda, diyareli enfeksiyonların etkenleri arasında viral ajanlarında bulunduğu bilinmektedir. Özellikle viral nedenli enteritiser büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Buzağı ve danalarda Bovin Viral Diarrhae-Mucosal Disease (BVD-MD) (2,7, 13,14), Enterocytopathogenic Bovin Orphan (ECBO) (7,11), ve sığır Adeno viruslarından (2,7,14) ileri gelen enteritis olayları yanında son yıllarda yapılan çalışmalar, Rota viruslar (1,5,8,10,12,16), Corana viruslar (5,10,16) ve Parvo virusların da (10,17,18) diyareli hastalıklara neden olduklarını ortaya koymuştur.

Finci (6) Türkiye'de yaptığı çalışmada danalardan BVD-MD virusunu izole ettiğini bildirmiştir. Bunun dışında ülkemizde buzağı ve danalarda enteritis olaylarına neden olan viruslarla ilgili herhangi bir izolasyon çalışması mevcut değildir.

Bu çalışmamızda, Fakültemiz İç Hastalıkları Kliniğine akut enteritis semptomları ile getirilen 1 günlük ile 8 aylık buzağı ve danalardan sağlanan gaita numunelerinden enteritislere neden olan viral ajanlar izole etmeyi amaçladık.

Materyal ve Metot

Klinik tanı :

Fakültemiz iç hastalıkları kliniğine enteritis semptomları ile getirilen buzağı ve danaların, yapılan klinik muayenelerinde, bitkinlik, durgunluk, yürümede isteksizlik, çevreye olan ilgi azlığı, mermerin kuruması, kaşeksi, dehidrasyon, kulak, burun ve extremitelerde uçlarında soğuma, konjunktivalarda hiperemi ve vücut ısısında geniş varyasyonlar (37,3°C-41,4°C) ortak semptomlar olarak görüldü. Klinik muayenesi yapılan ve gaitalarında bol miktarda mukus bulunan dana ve buzağuların 2 tanesinde askaridosiz, 3 tanesinde koksidiosiz 3 tanesinde diyare ile birlikte bronchopneumonic tesbit edildi. Uygulanan antibiyotik sağtımları sonunda 4 hayvanın kesinlikle sağıtıma cevap vermedikleri saptandı.

Gaita numuneleri :

Enteritisli 26 adet buzağı ve danaya ait gaita numuneleri steril petri kutularına veya ucu pamuklu steril çubuklar (swab) yardımı ile steril tüplere alındı.

Doku kültürü :

Gaita numunelerinden virus izolasyonu ve virusların enfeksiyözite güçlerinin saptanması için MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) devamlı hücre kültürleri kullanıldı. Ayrıca fetal dana böbrek, fetal kuzu böbrek, fetal kuzu kas epitel hücre kültürleri ile primer dana testis hücre kültürlerinde de virus üretme denemeleri yapıldı. MDBK hücre kültüründe hücre üretme vasatı olarak %15 inaktif dana serumlu Eagle MEM vasatı, fetal ve primer hücre kültürlerinde de %10 inaktif dana serumlu Hank's vasatı kullanıldı.

Gaitaların ekime hazırlanışı :

Steril petri kutuları ve tüpler içine alınan gaita numunelerinin ekime hazırlanmasında Frey ve arkadaşlarının (8) bildirdikleri yöntemden yararlandı. Bu amaçla gaita numuneleri önce içinde 10 x Antibiyotik solüsyonu (100 I.E. penicilline/ml., 100 gamma streptomycine/ml., 0,005 mg kanamycine/ml) bulunan PBS (Phosphat Buffer Solution pH 7,4) içinde 1/10 oranında süspanse edildiler.

Bu gaita süspanسیونları, 2 kısım gaita süspanسیونu + 1 kısım 1,1,2- Trichotrifluorethan* ile karıştırıldılar ve 5 dakika süre ile çalkalandılar. Daha sonra bu karışım 30 dakika süre ile 3000 devirde santrifuj edilerek üst kısım pipetle çekildi ve steril tüplerde -80°C de inokulasyon zamanına kadar saklandı. İnokulasyon için hazırlanan bütün gaita numuneleri sterilite kontroluna alındı.

Doku kültürüne inokulasyon :

Gaita numunelerinden virus izolasyonu için, MDBK hücre kültürleri 10 ml'lik vidalı kapaklı doku kültürü tüplerinde 3×10^5 hücre/ml. hesabıyla üretildiler. Yirmidört saat içinde üremesini tamamlayan hücre kültürlerinin üretme vasatları döküldü ve hücre yüzeyleri iki defa PBS-M ile yıkandı.

Daha sonra her bir gaita numunesi için iki adet hücre kültürü tüpüne 0,2 ml. inokulasyon yapıldı. 37°C de 1 saatlik adsorbsiyon süresinden sonra gaita inokulumları dökülerek hücre yüzeyleri yeniden

* E.Merck, Darmstadt.

iki defa PBS-M ile yıkandı ve tüplere 2 ml (%50 Earle Laktalbumin + %50 Eagle MEM + %5 fetal dana serumu) virus üretme vasatı konuldu.

Doku kültürü tüpleri 37°C lik etüvlere kaldırılarak hergün sitopatolojik effekt (CPE) yönünden kontrol edildi. Hücre kontrol birlikte uygulandı. Bu yöntemle gaita numuneleri MDBK hücre kültürlerinde üç defa pasajlandı.

Virus izolasyonu :

MDBK hücre kültürlerinde yapılan üç pasaj sonunda 26 adet gaita numunesinden 5 adedin de Gaita (7) (Protokol No: 433), Gaita (8) (Protokol No: 464), Gaita (10) (Protokol No: 483), Gaita (13) (Protokol No: 551), Gaita (14) (Protokol No: 553) CPE görülmesi üzerine bu gaita numuneleri 100 ml'lik doku kültürü şişelerinde üretilen MDBK hücre kültürlerinde 9.cu pasaja kadar yeniden pasajlandılar. Ayrıca aynı gaita numuneleri ile 1 pasaj fetal kuzu böbrek, 1 pasaj fetal dana böbrek, 2 pasaj primer dana testis ve 2 pasaj fetal kuzu kas epitel hücrelerinde adsorpsiyon tekniği ile üretim yapıldı. *İzole edilen virusların enfeksiyözite güçlerinin tesbiti :*

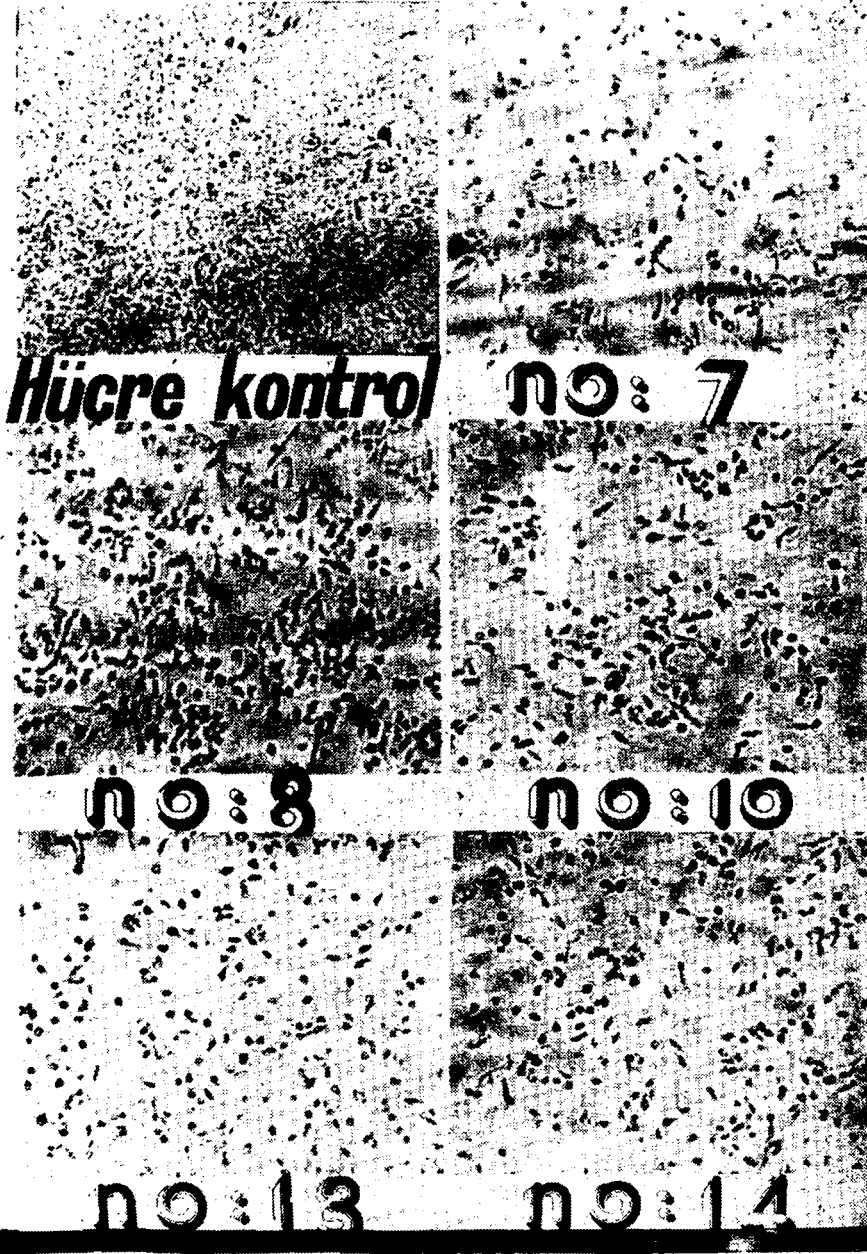
MDBK hücre kültürlerinde yapılan pasajlar sonu 5 gaita numunesinden izole edilen virusların enfeksiyözite güçleri Burgu (3) ve Gürtürk ve arkadaşlarının (9) bildirdikleri mikrotitrasyon yöntemi ile MDBK hücre kültürlerinde saptandı.

Bulgular

Fakültemiz iç hastalıkları kliniğine akut enteritis semptomları ile getirilen çeşitli ırklara mensup buzağı ve danalardan alınan 26 adet gaita numunesinden MDBK hücre kültürlerine yapılan düzenli pasajlar sonunda 24-48 saat içinde tam bir CPE meydana getiren 5 virus izole edilmiştir (Gaita No: 7, No: 8, No: 10, No: 13, No: 14) (Resim 1).

Diğer gaita numunelerinden bazıları birinci MDBK pasajında toksik etki göstermişler, diğer pasajlarda herhangi bir hücre dejenerasyonu oluşturmamışlardır.

Bazı gaita numuneleri ise birinci pasajdan itibaren hiç bir hücre dejenerasyonu göstermemişlerdir. MDBK hücre kültürlerinde 5 gaitadan izole edilen viruslar 3.cü pasajdan itibaren MDBK hücre kültür-



Resim 1: Enfekte edilmiş MDBK hücre kültürü ve Gaita numunelerinden izole edilen virusların oluşturdukları CPE görünümü.

lerinde yapılan 9.cü pasaja kadar düzenli CPE oluşturmuşlardır. Aynı izolatlar 3.cü MDBK pasajından itibaren fetal kuzu kas hücrelerinde 2 defa pasajlanmışlardır.

Bu pasajlar sonunda 7 ve 8 no'lu viruslar tam bir CPE oluşturmuş 10,13 ve 14 nolu viruslar aynı hücre kültüründe CPE meydana getirmemişlerdir. Primer dana testis hücre kültüründe 3.cü MDBK pasajından yapılan iki pasajda da 13 ve 14 no'lu viruslar tam bir CPE oluşturmuşlar, 7,8 ve 10 no'lu viruslar CPE meydana getirmemişlerdir. Fetal kuzu böbrek ve fetal dana böbrek kültürlerine 3.cü MDBK pasajından yapılan inokulasyonlar sonunda gaitadan izole edilen 5 virusunda tam CPE oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 1), MDBK hücre kültüründe yapılan 3.cü pasajdan elde edilen 5 izolatin aynı hücre kültürlerinde mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan enfeksiyozite gücü ölçümünde No: 7 $DKID_{50} = 10^{6,7}/ml.$, No: 8 $DKID_{50} = 10^{3,25}/ml.$, No: 10 $DKID_{50} = 10^{5,25}/ml.$, No: 13 $DKID_{50} = 10^{7,5}/ml.$ ve No: 14 $DKID_{50} = 10^{8,0}/ml.$ değerlerine ulaştıkları gözlenmiştir (Tablo 1).

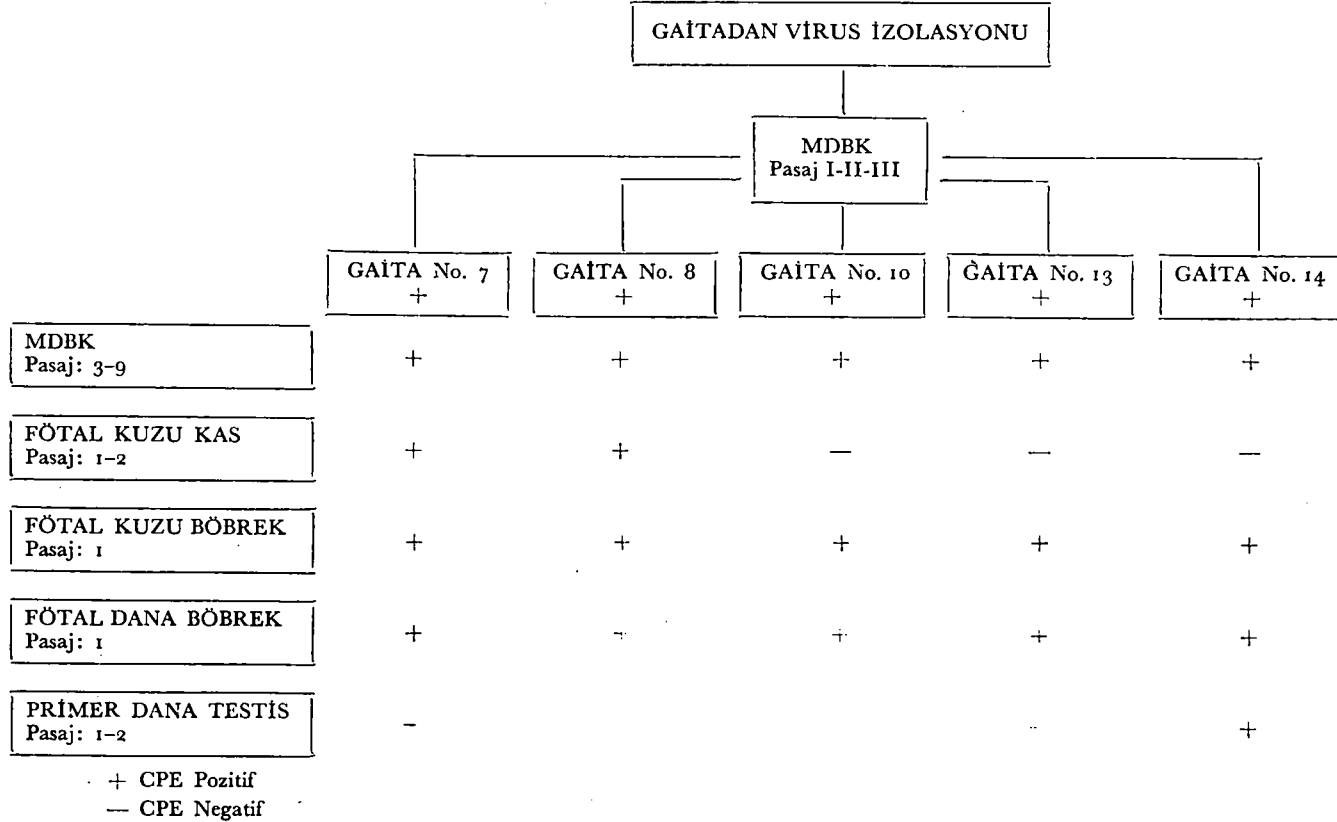
Tartışma ve Sonuç

Fakültemiz iç hastalıkları kliniğine getirilen enteritisli buzağı ve danelardan sağlanan 26 gaita numunesinden MDBK hücre kültürlerinde gerçekleştirilen 5 virus izolasyonu bu hayvanlarda enteritislere neden olan viral hastalıkların etyolojisi yönünden büyük önem taşımaktadır. Frey ve arkadaşlarının (8) aynı yöntemle MDBK hücre kültürlerinde gerçekleştirdikleri rota virus izolasyonu gibi, izole ettiğimiz viruslarda 1.pasajdan itibaren MDBK hücre kültürlerinde düzenli CPE oluşturarak üremişlerdir.

Frey ve arkadaşları (8), Rota virus izolasyonu 14 günlüğün altındaki buzağılardan topladıkları gaita numunelerinden başarmışlardır. İzole ettiğimiz 5 virus protokol kayıtlarına göre 40 günlüğün üzerindeki enteritisli hayvanlardan alınan gaita numunelerinden elde edilmiştir.

Bu durum, izolatların özellikle rota, parvo ve corana viruslar olabileceği ihtimalini azaltmaktadır. Diğer taraftan ECBO viruslar Adenoviruslar ve BVD-MD virus izolasyonları bu yaş ve daha yakın yaşlardaki hayvanlardan sık gerçekleştirilmiştir (4,7,11,13,14). Fakat BVD-MD virusunun MDBK hücre kültürlerinde ürememesi izole edilen virusların BVD-MD virusu olma şansını da azaltmaktadır (15).

ŞEKİL 1: GAİTA NUMUNELERİNDEN İZOLE EDİLEN VİRUSLARIN DOKU KÜLTÜRLERİNDE ÜRETİLME SONUÇLARI



Tablo 1: İzole edilen virusların MDBK hücre kültüründe mikrotitrasyon yöntemi ile ölçülen enfeksiyözite değerleri.

İ Z O L A T L A R	ENFEKSİYÖZİTE DEĞERLERİ (DKID ₅₀ /1,0 ml.)
GAİTA No. 7	10 ^{6,7}
GAİTA No. 8	10 ^{3,25}
GAİTA No. 10	10 ^{5,25}
GAİTA No. 13	10 ^{7,5}
GAİTA No 14.	10 ⁸

Sonuç olarak ülkemizde ilk kez 1 günlük ile 8 aylık enteritis semptomlu buzağı ve danalardan alınan gaita numunelerinden virus izole edilmesi ve toplam 26 numuneden 5 inde CPE oluşturan ajana rastlanması bu tür klinik tabloya neden olan viral enfeksiyonların ülkemizde yaygın olabileceği kanısını uyandırmıştır.

İzole edilen viruslar üzerindeki identifikasyon ve tiplendirme çalışmaları devam etmektedir.

Literatür

- 1- **Afsar, A.U.R.A.Tadayon** (1979): *Rotavirus in diarrhoeic calves in Iran*. Vet.Rec. 100-400.
- 2- **Amstutz, H.E.** (1965): *Occurrence and Etiology of infectious calf diarrhea*. J.Am.Vet.Med. Assoc. 147: 1360-1363.
- 3- **Burgu, İ.** (1979): *Koyunlarda abort yapan orbivirüsler dahil bir serotipin özellikleri ile Türkiye'deki durumu üzerine araştırmalar*. A.Ü.Vet.Fak.Derg. XXVI, (3,4): 135-150.
- 4- **Daniels, L.B., D.Fineberg, J.M., Cockrill, Q., Hornbsy, H.P., Peterson and L. Stratton** (1977): *Use of trimethoprimisul fadiazine in controlling Calf Scours*. Vet.Med. Small.Anim.Clinc. 72: 93-95.
- 5- **Durham, P.J.K., B.C.Farguharson u.B.J. Stevenson** (1979): *Rota und Coronaviren bei kälberdiarrhoen*. New zeel. Vet.J. 27, 266, 271-272.
- 6- **Finci, E.** (1972): *Türkiye'de Mucosal Disease (VD) üzerinde çalışmalar*. A.Ü.Vet.Fak. Doçentlik Tezi.
- 7- **Frank, F.W.** (1970): *New concepts in calf Scours-Agri*. Sci.Rev. USDA, 8: 36-40.
- 8- **Frey, H.R., H.J. Marschall und B.Liess** (1979): *Rotavirusinfektionen in norddeutschen kälberbeständen: Nachweis mittels Elektronmikroskopie und Virusanzüchtung in Zellkulturen*. Dtsch.tierärztl. Wschr. 86, 100-104.

- 9- **Gürtürk, S., E. Finci ve I. Burgu** (1974): *Yurdumuz sığırlarında Enfeksiyöz rhinotracheitis (IBR) üzerinde araştırmalar. I. Türkiye'de sığırlarda IBR virusuna karşı antikor titresi.* A.Ü.Vet.Fak.Derg. XXII, (3-4): 104-111.
- 10- **Höfmann, W. und M. Arents** (1981): *Corona-Rota und Parvovirus-Infektionen beim kalb aus klinischer sicht.* Dtsch.tierärztl Wschr. 99, 316-321.
- 11- **Huck, R.H., S.F. Cortwright:** *Isolation and classification of viruses from cattle during out breaks of mild respiratory disease and from herds with reproductive disorders.* J.Com.Path. 74 (1964) 346.
- 12- **Koves, B.** (1979): *Isolati of cytopathogenic rotavirus from neonatal Calves.* Acta Microbiol. Acad.Sci.Hung. 26, 255-231.
- 13- **Lambert, G. and A.L. Fernelius** (1968): *Bovine viral diarrhea and Escherichia coli in neonatal calf enteritis.* Can.J. Comp. Med. 32: 440-446.
- 14- **Paterson, A.B.** (1962): *Virus diseases of calves.* Vet.Rec. 74: 1384-1389.
- 15- **Rolle, M. und Mary A** (1978): *Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre Ferdinand Enke Verlag Stuttgart* 417-420.
- 16- **Sibalin, M., H. Szekely U.F. Burki** (1980): *Rotavirusinfection in einem göreseren Rinderbestand.* Wien.Tierärztl. Wschr 67, 122-127.
- 17- **Storz, J.etal.** (1978): *Parvovirus Infection of the bovine fetus.* Amer J.Vet.Res. 39, 1099-1102.
- 18- **Woso, Lo, R.H. Joanson, I. Goodchild U.P. Bachmann** (1979): *Isolation of bovine parvovirus type 1 in Australia.* Austral. Vet.J. 55, 199-200.

Yazı 4.2.1983 günü alınmıştır.

Received on 4.2.1983