

BUZAĞILARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONLARININ SEROEPİDEMİYOLOJİSİ VE ELİSA TESTİ İLE ROTAVİRUS ANTİJENLERİNİN İDENTİFİKASYONU^{1,2}

Zafer Yazıcı³

Yılmaz Akça⁴

Seroepidemiology of rotavirus infections in newborn calves and studies on the
identification of rotavirus antigens with ELISA.

Summary: In this research presence of rotaviruses which are main causes of gastroenteritis in calves were surveyed by both serologically and virologically in Turkey. 656 sera samples collected from calves were checked by microneutralisation test to detect rotavirus antibodies. Additionally in faeces samples collected from 86 calves with diarrhea were researched for rotavirus antigens by means of ELISA. Of 656 sera samples tested by microneutralisation test, 150 (22.86 %) were found positive in 1/5 dilution. Serum neutralisation value SN_{50} were showed positivity between 1/5.6-1/266 dilutions. In ELISA, of 86 faeces samples for viral antigens, 13 (17.80 %) were found remarkably positive.

Özet: Bu çalışmada Türkiye'de yeni doğan buzağılarda akut gastroenteritlerin en büyük nedenlerinden olan rotavirusların varlığı serolojik ve virolojik olarak araştırıldı. 656 adet buzağından alınan kan serumları mikronötralizasyon testi ile rotavirus antikorları yönünden serolojik olarak kontrol edildi. Ayrıca ishal semptomu gösteren 86 adet buzağından alınan gaita numunelerinde rotavirus antijenleri ELISA testi kullanılarak araştırıldı. Mikronötralizasyon testi ile kontrol edilen 656 adet kan serumundan 150 tanesi (% 22.86) 1/5 serum sulandırılmasında rotavirus antikorları yönünden seropozitif olarak saptandı. Rotavirus antikorları yönünden seropozitif olarak saptanan serumların SN_{50} değerleri 1/5.6-1/266 arasında dağılım gösterdi. ELISA testi ile kontrol edilen 86 adet gaita numunesinden 13 adedi (% 17.80) rotavirus antijenleri yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

1 Bu araştırma AÜ Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 87-30-00-04

2 Bu araştırma aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

3 Dr. AÜ Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

4 Doç. Dr. AÜ Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

Giriş

Yeni doğan buzağuların akut gastroenteritis olayları, entansif besi programları uygulanan büyük ve küçük işletmelerde sık rastlanan problemler arasında yer almaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar yeni doğan buzağuların akut gastroenteritis tablosu ile seyreden enfeksiyonlarında rotavirus grubu virusların gerek mortalite gerekse morbidite yönünden önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (18, 24).

Rotavirus enfeksiyonları, buzağuların yaygın olarak görülen sarı renkli sulu ishal, dehidrasyon, kilo kaybı, anoreksi, depresyon, metabolizma bozuklukları ile karakterize, (5,20,26) ince barsak epitellerinde hasar meydana getirerek çeşitli komplikasyonlara ve gerekli tedbirler alınmazsa ölüme yol açabilen viral bir enfeksiyondur (6, 13,20, 22, 24).

Etken "reoviridae" familyası içinde yer alan altı alt virus grubundan bir tanesi olup, reoviruslara morfolojik ve fizikokimyasal yönden kısmen benzerlik göstermektedir (13, 14, 20, 22). Rotaviruslar çift iplikçikli RNA taşımaktadır (13,14).

Virus eter ve kloroforma karşı duyarsız olup (24), dış ortamlarda enfeksiyon oluşturma kabiliyetini 7-12 ay koruyabilmektedir(6). Etkenin üretilmesinde primer hücre kültürleri, MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre kültürleri ile MK (Monkey Kidney), Vero (African Green Monkey Kidney) ve MA-104 (Rhesus Monkey Kidney) gibi maymun orijinli hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır (3,6,23,24).

Rotaviruslar hücre kültürlerinde zor üreme gösteren bir virus grubudur ve bu yüzden kültürlerine inokule edilmeden önce tripsin, pankreatin gibi proteolitik enzimlerle muamele edilmeleri gerekir (2,3,8,9,16,17). Etken hücre kültürlerinde sitopatolojik değişiklikler meydana getirerek üremekte (6) ve üreme esnasında intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır (20, 24,29,30).

Enfeksiyonun yayılmasında en önemli etken gaitadır (5,6). Ayrıca enfeksiyon enfekte yem, su, süt ile kontakt ve oral yolla da bulaşabilmektedir (6). Virusun plasental bariyeri geçerek fötüsü enfekte ettiğine dair herhangi bir bilgi mevcut değildir (5).

Rotavirus enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan metodlar arasında immünelektron mikroskopi (IEM) (32), floresans antikor tekniği (FAT) (28), agar jel immunodifüzyon testi (AGID), ELISA (31),

hemaglutinasyon (HA) (26), hemaglutinasyon inhibisyon (HI) (7) ve poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) (12) öremleri yer tutmakta ve serum nötralizasyon testi de (SNT) (7) serolojik çalışmalarda sık olarak kullanılmaktadır.

Türkiye'de hayvan rotavirusları üzerine yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Bu virus grubu üzerinde Türkiye'de ilk çalışma Burgu ve Akça (7) tarafından 1982 yılında yapılmıştır.

Bu araştırma Türkiye'de yeridoğan buzağılarda gerçekleştirilen ilk rotavirus araştırmasıdır.

Materyal ve Metot

Antijen: Bu çalışmada rotavirusun Northern Ireland 75/447 suşu kullanıldı.

Hücre Kültürü: Virusun üretilmesi, enfeksiyözite gücünün tesbiti ve mikronötralizasyon testlerinde MDBK hücre kültürlerinden yararlanıldı ve hücre üretme vasatı olarak % 10 inaktif dana serumu içeren EAGLE MEM vasatı kullanıldı.

Serum Numuneleri: 0-1 ay arası 656 adet buzağıdan alınan ve rotavirus antikorları yönünden kontrol edilen kan serumları Türkiye'nin altı bölgesinde yer alan 19 yerleşim biriminden ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniklerine getirilen hayvanlardan toplandı (Tablo 1). Kan serumlarının 247 adedi 0-3 ay arası, 216 adedi 3-6 ay arası, 121 adedi 6-9 ay arası ve 72 adedi de 9-12 ay arası yaşa sahip buzağılardan alındı (Tablo 2). Toplanan kan numuneleri serum nötralizasyon testine tabi tutulmadan önce 56°C'de 30'inaktif edildi ve sterilitte kontrolleri yapılarak test edilinceye kadar -20°C'de saklandı.

Gaita Numuneleri: ELİSA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonunu yapabilmek için 0-1 ay arası yaş grubuna dahil, akut ishal semptomu gösteren ve biri dışında kolostrum almış 86 adet buzağıdan gaita örnekleri toplandı. Alınan gaita örnekleri ELİSA testinde numune hazırlamakta kullanılan SDR (Sample Diluent Reagent) ile 1/10 oranında sulandırıldı. Homojen hale getirilen gaita numuneleri 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan kısım alınarak test edilinceye kadar -80°C'de saklandı.

Tablo 1. Rotavirus antikorları yönünden serolojik kontrol amacıyla toplanan kan numunelerinin bölgesel dağılımı.

Bölge Kodu	Materyal Toplanan Bölgeler ve Şehirler	Serum Sayısı
1	Ankara-İçanadolu Bölgesi	70
2	Ankara-İçanadolu Bölgesi	29
3	Ankara-İçanadolu Bölgesi	32
4	Adana-Akdeniz Bölgesi	19
5	Aksaray-İçanadolu Bölgesi	32
6	Adapazarı-Marmara Bölgesi	50
7	Amasya Karadeniz Bölgesi	32
8	Antalya Akdeniz Bölgesi	41
9	Balıkesir-Marmara Bölgesi	50
10	Canakkale-Marmara Bölgesi	45
11	Eskişehir İçanadolu Bölgesi	49
12	K. Maraş Akdeniz Bölgesi	20
13	Kırklareli-Marmara Bölgesi	50
14	Muş-Doğu Anadolu Bölgesi	11
15	Samsun-Karadeniz Bölgesi	28
16	Samsun Karadeniz Bölgesi	39
17	Sivas-Doğu Anadolu Bölgesi	11
18	Ş. Urfa-G. Doğu Anadolu Bölgesi	13
19	Tekirdağ-Marmara Bölgesi	35
GENEL TOPLAM		656

Tablo 2. Rotavirus antikorları yönünden kontrol edilmek üzere toplanan kan örneklerinin yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş Grubu (Ay)	0-3	3-6	6-9	9-12
Serum Sayısı	247	216	121	72

Virusun Üretilmesi: Serolojik testlerde kullanılacak olan virusun Northern Ireland 75/447 suşu MDBK hücre kültürlerinde Mc Nulty ve ark. (25)'nin geliştirdiği metottan yararlanılarak üretildi. Rotavirus 10 mikrogram /ml tripsin içeren virus üretme vasatı ile muamele edildikten sonra MDBK hücre kültürlerine inokule edildi ve 37°C'de CO₂'li etüvlerde 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Bu süre sonunda 5 mikrogram/ml tripsin içeren virus üretme vasatı ilave edilerek 37°C'lik etüve kaldırıldı. Hergün doku kültürü mikroskobu ile kontrol edildi. Hücre kültürlerinde % 80-90 CPE oluşturduktan sonra -80°C'de

donduruldu ve 37°C'de çözüldü. Bu işlem üç kez tekrarlandıktan sonra 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan ve virus içeren süspansiyon alınarak 1 ml'lik porsiyonlar şeklinde bölündü ve testlerde kullanılucaya kadar -80°C'de saklandı.

Enfeksiyözite Gücünün Tesbiti: MDBK hücre kültürlerinde üretilen rotavirusun enfeksiyözite gücünü tesbit etmek amacıyla Frey ve Liess(15)'in bildirdikleri mikrotitrasyon metodundan yararlanıldı. Sonuçlar Kaerber'in (21) bildirdiği metotla değerlendirilerek rotavirusun titresi $DKID_{50}$: $10^{5.25}/0.1$ ml olarak hesaplandı.

Nötralizasyon Testi: Bu araştırmada rotavirus antikorları yönünden kontrol edilecek olan serumlar 1/5 oranında, virus ise 100 $DKID_{50}$: $10^{2.95}/0.05$ ml oranında sulandırılarak, Frey ve Liess'in (15) bildirdikleri yöntemle mikronötralizasyon testine tabi tutuldu. Test sonunda seropozitif olarak saptanan serumların antikor titre değerlerini saptamak amacıyla da Frey ve Liess'in (15) bildirdikleri mikronötralizasyon metodundan yararlanıldı. Pozitif serumların antikor titre değerleri (SN_{50}) Kaerber'in (21) bildirdiği yöntemle hesaplandı.

ELISA Testi: Akut ishal semptomu gösteren buzağılardan alınan gaita numunelerinden rotavirus antijenlerini tanımlamak amacıyla ticari amaçlı ELISA testi kitinden¹ yararlanıldı. Test sonuçlarının okunmasında renk değişimleri dikkate alındı ve mavi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Sonuçlar ELISA test okuyucusunda² 450 nm adsorbansa sahip filtre ile okundu.

Bulgular

Rotavirusun Northern Irland 75/447 suşu tripsinle muamele edildikten sonra MDBK hücre kültürlerine yapılan inokulasyonlarda, hücre kültürlerinde 5. günde sitopatolojik değişiklikler meydana getirdi. Virusun enfeksiyözite gücü mikrotitrasyon yöntemi ile hesaplanarak $DKID_{50}$: $10^{5.25}/0,1$ ml olarak bulundu.

Araştırmada kullanılan serumlar rotavirus antikorları yönünden mikronötralizasyon testi kullanılarak kontrol edildi. 656 adet buzağıdan 150 tanesi (% 22,86) 1/5 serum sulandırılmasında seropozitif olarak bulundu (Tablo 3). Mikronötralizasyon testinde seropozitif bulunan serumların antikor titre değerlerinin 1/5.6-1/266 arasında olduğu saptandı.

1 Wellcome Diagnostic

2 Titertek Multiskan

0-1 ay arası yaşa sahip ve akut ishal semptomu gösteren 86 adet buzağıdan toplanan gaita numuneleri rotavirus antijenleri yönünden ELISA testi ile kontrol edildi. 86 gaita numunesinden 13 tanesi (% 17.80) pozitif olarak bulundu (Tablo 4).

Tablo 3. Rotavirus antikorları yönünden SN testinde pozitif bulunan serumlar ve bölgelere göre dağılımı.

Bölge kodu	Alınan serum sayısı	Pozitif serum sayısı	Pozitiflik oranı (%)
1	70	31	44.2
2	29	-	-
3	32	-	-
4	19	7	36.8
5	32	-	-
6	50	6	12.0
7	32	-	-
8	41	11	26.8
9	50	13	26.0
10	45	7	15.5
11	49	25	51.0
12	20	10	50.0
13	50	12	24.0
14	11	-	-
15	28	-	-
16	39	-	-
17	11	-	-
18	13	1	7.6
19	35	27	77.1
Toplam	656	150	22.86

Tablo 4. ELISA testi uygulanan buzağuların yaş durumu test sonuçları ve pozitiflik oranları

Yaş (Gün)	Pozitif Hayvan Sayısı	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam Toplam
0-5	3	10.30	26	29
5-10	5	20.80	19	24
10-20	4	15.38	22	26
20-30	1	14.20	6	7
Toplam	13	17.80	73	86

Tartışma ve Sonuç

Rotavirüsler yeni doğan buzağılarda akut gastroenteritilerinin önemli nedenlerinden biridir (1,5,13,22). Bugüne kadar Türkiye'de yeni doğan buzağuların rotavirüs enfeksiyonlarına ilişkin kapsamlı bir araştırma yapılmamıştır. Ancak yetişkin sığırlarda rotavirüs enfeksiyonları üzerine Burgu ve Akça (7) tarafından serolojik bir araştırma yapılmış ve yetişkin sığırlarda pozitiflik oranı % 31 olarak saptanmıştır.

Yeni doğan ve 1 yaşına kadar olan buzağı ve danalarda gerçekleştirilen bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki sağlıklı ve ishelli buzağılardan toplanan 656 adet kan serumu mikronötralizasyon testi ile rotavirüs antikorları yönünden kontrol edilmiş ve 150 adedi (% 22.86) 1/5 serum sulandırmasında seropozitif bulunmuştur. Ayrıca 86 adet ishelli buzağıdan alınan gaita numunelerinde ELISA testi ile rotavirüs antijenleri araştırılmış ve 13 gaita numunesi (% 17.80) rotavirüs antijenleri yönünden pozitif bulunmuştur.

Bu araştırma iki grup hayvan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Grup. 1 içinde yer alan ve 0-12 ay yaş grubuna dahil buzağular ve danalardan alınan 586 adet kan serumu ile Grup. 2 içinde yer alan 86 adet ishelli buzağının 70 adedinden sağlanan kan serumları mikronötralizasyon testi ile kontrol edilmiş ve Grup. 1 içinde 119 hayvan (% 20.30), Grup. 2 de 31 hayvan (% 44.28) olmak üzere 150 hayvan (% 22.86) rotavirüs yönünden seropozitif olarak tespit edilmiş ve antikor titre değerleri 1/5.6-1/266 arasında bulunmuştur. Rotavirüs antikorları yönünden tespit edilen % 22.86'lik seropozitiflik oranı bu enfeksiyonun ülkemizde var olduğunu ortaya koymaktadır. Schlafer ve Scott (33), A.B.D.'de yaptıkları çalışmalarda seropozitiflik oranını % 98, Castrucci ve ark. (10), İtalya'da seropozitiflik oranının % 90'nın üzerinde olduğunu bildirmektedir.

Grup. 1 içinde yer alan 586 hayvandan 193 tanesi 6-12 ay yaş grubuna, 393 hayvan da 0-6 yaş grubuna dahildir. 6-12 ay yaş grubuna dahil hayvanlardan 53 tanesi, 0-6 yaş grubuna dahil hayvanlardan 66 tanesi rotavirüs antikorları yönünden seropozitif bulunmuştur. 6-12 ay yaş grubuna dahil seropozitif hayvanların rotaviral antikorları doğumdan sonra alma ihtimalleri oldukça zayıftır. Çünkü kolostrum yolu ile alınan maternal antikorlar yaşamın ilk 6 ayında pasif bir immünite sağlamakta, daha sonraki dönemlerde ise etkisini kaybetmektedir. Bu yüzden 6-12 ay arası yaşa sahip hayvanlardan

seropozitif olanları enfeksiyonu klinik veya subklinik olarak geçirmiştir. Grup. 1 içinde yer alan 0-6 ay arası yaşa sahip seropozitif hayvanların antikor titre değerleri 1/5.6-1/266 arasında bulunmuştur. Seropozitif olan hayvanlardan 5 tanesi oldukça yüksek titre değerlerine ulaşmıştır. Bu 5 hayvan enfeksiyonu geçirmiş olanlardır. Bunun dışında kalan 0-6 ay yaşa sahip seropozitif hayvanların rotavirus antikorlarını doğumdan sonra kolostrum yolu ile alma ihtimali yüksektir.

Grup. 2 içinde yer alan ve akut ishal semptomu gösteren hayvanların kan serumlarından 31 tanesinde rotavirus antikorları saptanmıştır. Seropozitif olarak saptanan bu hayvanların aynı zamanda ishal semptomu göstermesi nedeniyle bu grupta yer alan pozitif hayvanların bir kısmının enfeksiyona yeni yakalandığını, bir kısmının da enfeksiyonu uzun bir seyir dönemi ile geçirdiğini söylemek mümkündür.

Gerek grup. 1 içinde gerekse grup. 2 içinde yer alan 0-6 ay arası yaşa sahip seropozitif hayvanlarda saptanan antikorların intrauterin dönemde şekillenebilecek bir rotavirus enfeksiyonu sonucunda oluşma ihtimali de vardır. Mc Nulty ve ark. (24), rotaviruslerin plesantal bariyeri geçerek fötusu enfekte ettiklerini ileri sürmektedirler. Ancak Blood ve Handerson (5) ve Dageinas (11), rotaviruslerin plesantal bariyeri geçme yeteneği olmadığını bildirmektedir. Bu yüzden 0-6 ay yaş grubuna dahil seropozitif hayvanlarda saptanan antikorların intrauterin dönemde şekillenen rotavirus enfeksiyonu sonucu olup olmadığı konusu açık değildir.

Grup. 2 içinde akut ishal semptomu gösteren 0-1 ay yaş grubuna dahil 86 buzağıdan alınan gaita numunesi ELISA testi ile rotavirus antijenleri yönünden kontrol edilmiş ve 13 gaita numunesi (% 13.80) pozitif olarak bulunmuştur. Bellizoni ve ark. (4) Arjantin'de pozitiflik oranını % 52.1, Opdenbosch ve Wallemans (31), % 70.1 ve Möstl ve ark. (27), % 74.4 olarak bulmuşlardır.

Bu çalışmada gaita örneklerinde rotavirus antijenlerinin varlığı saptanarak rotavirus enfeksiyonlarının yeni doğan buzağılardaki önemi ortaya konmuştur. Serolojik çalışmalarda kullanılan serumların ise sahadaki hayvanlardan sağlanmış olması ve annelerinin rotavirus enfeksiyonları yönünden kontrol edilememelerinden dolayı seropozitifliğe ilgili veriler ancak enfeksiyona bağlı oluşan immun yanıt ve materyal immunityle ilgili veriler ışığında tartışılmıştır. Bu nedenle kolostrum almamış buzağuların örneklediği anne ve yavruların birlikte kontrol edilebildiği araştırmalar yapılmasının, hastalığın patogenezini ve Türkiye'de rotavirus enfeksiyonlarının insidensi konusunda daha sağlıklı sonuçlar vereceği inancını taşımaktadır.

Kaynaklar

1. **Albert, J.M., Unicom, L.E., Tzipori, S.R. and Bishop, R.F.** (1987). *Isolation and serotyping of animal rotaviruses and antigenic comparison with human rotavirus.* Arch. Virol., 93: 123-130.
2. **Babiuk, L.A. and Mohammed, K.A.** (1987). *Trypsin and bovine rotavirus replication.* Vet. Rec., 102:61-62.
3. **Bachmann, A.P.** (1981). *Routine isolation and cultivation of bovine rotaviruses in cell culture.* Am. J. Vet. Res., 42 (12): 2149-2150.
4. **Bellizoni, R.C., Mattion, N., Torre, J.L. and Scodellar, E.A.** (1987). *Incidence rotavirus infection in beef herds in Argentina.* Res. Vet. Sci., 42 (2): 257-259.
5. **Blood, D.C., Radostit, O.M. and Handerson, J.A.** (1983). *Veterinary Medicine.* Sixth Edition. Baillere. Tindal, London, U.K.
6. **Burgu, İ.** (1980). *Özel Viroloji Teksiri*, 4.
7. **Burgu, İ. ve Akça, Y.** (1983). *Siğirtalarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerine çalışmalar.* A.Ü. Vet. Fak. Derg., 30 (1): 35-44.
8. **Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, F., Cilli, V., Danelli, G., Angelilli, G. and Bruggi, M.** (1983). *A study of cythopathic rotavirus isolated from calves with acut enteritis.* Comp. Immun. Mis. Infect. 6 (3): 253-264.
9. **Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, F., Cilli, V., Ferruca, L. and Donelli, G.** (1985). *Isolation and characterisation of rotavirus from rabbit.* Arch. Virol., 83: 99-104.
10. **Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, F., Cilli, V., Guzlandi, G., and Aldrovandi, J. J.** (1988). *Neonatal calf diarrhea induced by rotavirus.* Com. Immun. Mic. Infect. 11 (2): 71-84.
11. **Dageinas, L.** (1981). *Failure to isolation of rotavirus from bovine meconium.* Vet. Rec., 108: 11-13.
12. **Edwards, S., Chasey, D., Napthine, P., Banks, J., Taylor, N.C. and Cranage, P.M.** (1987). *Comparison of three rapid diagnostic methods for the detection of rotavirus infection in calves.* Vet. Mic., 13: 19-25.
13. **Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.P.B., Murphy, A.F. and Studdert, J.M.** (1987). *Veterinary Virology* Academic Press, Orlando, Florida, U.S.A.
14. **Flewett, J.H. and Woode, N.G.** (1987). *The Rotaviruses.* Arch. Virol. 57: 1-23.
15. **Frey, H.R. and Liess, B.** (1971). *Vernehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark cytopathogen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit mikrotiter methode.* Zbl. Vet. Med., 18: 61-71.

16. **Fukushoa, A.A., Shimizu, Y. and Hoy, Y.** (1981). *Isolation of cythopathic porcine rotavirus roller culture in presence of trypsin.* Arch. Virol., 69: 49-60.
17. **Fulton, R., Johnson, A.C. and Woode, N.G.** (1981). *Isolation of rotavirus from a newborn dog with diarrhea.* Am. J. Vet. Res., 42 (5): 841-843.
18. **Hiruma, M., Ide, S. and Kume, T.** (1985). *Case of neonatal calf diarrhea associated with natural infection with rotavirus.* Jpn. J. Vet. Sci., 47 (3): 517-521.
19. **Iwagawa, M., Hirosawa, K., Akiyama, Y. and Omari, R.** (1982). *Seroprevalence survey on rotavirus infection in foals.* Jpn. J. Vet. Sci., 44: 819-821.
20. **Joklik, K. W.** (1985). *Virology.* Second edition, Appleton, Century Croft, Norwalk, Connecticut, U.S.A.
21. **Kaerber, G.** (1964). *In diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases.* Public Health Ass (New York), 48: 50.
22. **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. U.S.A
23. **Lennette, H.E.** (1985). *Laboratory diagnosis of viral infection* Marcel Decker Inc, Madison Avenue New York, U.S.A.
24. **Mc Nulty, M.S.** (1987). *The Rotaviruses,* J. Gen. Virol., 40: 1-18.
25. **Mc Nulty, M.S., Allan, M.G. and Mc Ferran, B.J.** (1977). *Cell culture studies with cythopathic bovine rotavirus.* Arch. Virol., 54: 201-209.
26. **Mochizuki, M. And Ata, M.** (1986). *Characterisation of canine rotavirus hemagglutinin.* Jpn. Vet. Sci., 48 (5): 1011-1014.
27. **Mostl, L.K., Nowostny, N. and Nowarth, E.** (1986). *Vergleichende untersuchung von kalbertkont proben auf rotavirus antigen Mitte's rotazyme 2 ELISA test kits sowie eines laboringen double sandwich ELISA's.* Wien Tierarztl. Mochr. 73: 10.
28. **Nagano, N., Goto, H. and Shimizu, K.** (1984). *Virological and serological studies of rotavirus infection in cattle.* Res. Bull. Obihiro. Univ. 14: 1-18.
29. **Nagasha, N., Raghavan, R. and Lal, S.M.** (1985). *MDBK cell line for isolation of bovine rotavirus from clinical cases of neonatal calf diarrhea.* Indian, J. Virol., 1 (12): 224-225.
30. **Ojeh, C.K.** (1984). *Isolation and propagation bovine rotavirus in cell culture.* Rev. Elev. Vet. Med. Pays. Trop., 37 (4): 400-405.
31. **Opdenbosch, E. and Wallemans, G.** (1981). *Rotavirus detection in cat faeces: A comparison between rotazyme test (Abbot), immunodifusion test and neutralization of immunofluorescence test.* Diargeneeskundig Tijdschrift, 51 (1): 11-17.
32. **Reynolds, J.D., Chasey, D., Scott, C.A. and Bridger, C.J.** (1984). *Evaluation of ELISA and electron microscopy for detection of corona and rotavirus in faeces.* Vet. Rec., 114: 397-401.
33. **Schlafer, H.D. and Scott, M.F.** (1979). *Prevalence of neutralizing antibody to the calf rotavirus in New York cattle.* Cornell Vet. 69 (3): 261-271.