

KLİNİK OLARAK SAĞLIKLI VEYA DİYARE SEMPTOMLU KOYUNLARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONUNUN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) VE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (PAGE) TEKNİKLERİ İLE ARAŞTIRILMASI¹

*İbrahim Burgu*²
*Aykut Özkul*³
*T.Çiğdem Oğuzoğlu*⁵

*Yılmaz Akça*²
*Taner Karaoğlu*⁴
*Seval Bilge-Dağalp*⁴

*Feray Alkan*²
*Kadir Yesilbağ*⁵
*M.Tolga Tan*⁶

*The investigation of rotavirus infections in diarrheic and non-diarrheic sheep
using PAGE and ELISA.*

Summary: *In this research, presence of Rotavirus antigen/nucleik asid was investigated using ELISA and PAGE technique in 40 diarrheic and 56 clinically normal lamb and 175 sheep in 5 intensive sheep flock. Additionally, 298 serum samples collected from in 6 sheep flock were tested for antibodies by microneutralisation technique.*

At the end of this study, the presence of the Rotavirus infection were not detected in controlled lamb and sheep serologically and virologically.

Key words: *Sheep, rotavirus, PAGE, ELISA, microneutralisation.*

Özet: *Bu çalışmada, 40 adedi ishalleri, 56 adedi sağlıklı görünümlü 96 kuzu ile 175 koyuna ait 271 gaita örneği ELISA ve PAGE yöntemleri ile Rotavirus yönünden test edildi. Ayrıca, 6 farklı koyunculuk işletmesinde bulunan 298 adet koyun kan serumu örneğinde BRV Northern Ireland 75/447 suşu kullanılarak uygulanan mikronötralizasyon testi ile Rotavirus antikorlarının varlığı araştırıldı.*

Elde edilen verilere göre, örneklenen koyunlarda rotavirus enfeksiyonunun varlığı serolojik veya virolojik olarak saptanamadı.

Anahtar kelimeler: *Koyun, rotavirus, PAGE, ELISA, mikronötralizasyon.*

1. Bu araştırma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No: 96-10-00-15) ve TÜBİTAK (VHAG- 1329/ADP) tarafından desteklenmiştir.
2. Prof.Dr. A.Ü.Veteriner Fakültesi Viroloji ABD-Dışkapı/Ankara.
3. Doç.Dr. A.Ü.Veteriner Fakültesi Viroloji ABD-Dışkapı/Ankara.
4. Dr. A.Ü.Veteriner Fakültesi Viroloji ABD-Dışkapı/Ankara.
5. Araş.Gör. A.Ü.Veteriner Fakültesi Viroloji ABD-Dışkapı/Ankara.
6. Araş.Gör. ADÜ Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı /Aydın.

Giriş

Rotaviruslar, viral sindirim sistemi enfeksiyonları içinde gerek yaygınlıkları ve gerekse yüksek mortaliteleri nedeniyle önemli yer tutmaktadır (2,6,15).

Rotavirusların neden olduğu enteritiserler, farklı hayvan türlerinin özellikle yeni doğanlarında ishal, dehidrasyon, kilo kaybı, anoreksi, metabolizma bozuklukları ile karakterizedir (4,8,9,10). Etken, incebarsak villus epitellerini olumsuz yönde etkilemekte, dolayısıyla diğer viral, bakteriyel ya da protozoer etkenler ile komplikasyonların doğmasına ve önlem alınmadığı takdirde ölümle sonuçlanabilen bir klinik seyire de neden olabilmektedir (10).

Reoviridae familyasının bir alt grubunu oluşturan rotaviruslar, 45-70nm. büyüklükte olup, çift iplikçikli ve pozitif polariteli RNA içeren viruslardır. Etken çift katlı ikozahedral simetrik bir kapside sahiptir ve 32 kapsomer içermektedir. Rotavirusların sahip olduğu çift sarmallı RNA 11-12 segmentli olup, bu segmentler dizilim ve elektroforetik migrasyon kabiliyetlerine göre türler arasında bir takım farklılıklar sergilemektedir (10).

Yetişkin hayvanlarda genellikle subklinik enfeksiyona neden olan rotaviruslar, yenidoğan buzağı, kuzu, tay ve domuz yavrularında ishal ile karakterize klinik enfeksiyonun yanı sıra subklinik enfeksiyonlara da neden olmaktadır (5,6,7).

Yapılan literatür taramasında, yurtdışında koyunlar ile yeni doğan kuzularda rotavirus enfeksiyonuna ilgili çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür. Snodgrass ve ark.(15) 41 spesifik patojen free (SPF) kuzunun bulunduğu bir grupta sulu sarı renkli ishal ile karakterize yüksek mortalite oranı gösteren bir salgından immunelektron mikroskopi ve immunfloresan yöntemleriyle rotavirusların tespit edildiğini bildirmişlerdir. Berrios ve ark. (2) 161 adedi üç aydan küçük kuzulardan, 19 adedi erişkin koyunlardan sağlanan 180 gaita örneğinden 17 adedinde (%9.4) ELISA ile rotavirus saptadıklarını ve rotavirus varlığı saptanan gaitalardan 7 adedinin ishalleri kuzulara ait olduğunu belirtmişlerdir. Dimitrova ve ark. (6) ise, Sofya'da bulunan 12 çiftlikteki 79 ishalleri kuzudan 28 adedinin (% 35.4) gaitasının rotavirus antijeni yönünden pozitif olduğunu kaydetmişlerdir. Amerika Birleşik Devletlerinde ise koyunlarda rotavirus enfeksiyonu ilk kez 1995 yılında Theil ve ark.(16) tarafından saptanmıştır. Araştırmacılar (16) ABD'de bir araştırma çiftliğinde çıkan, sarı renkli-sulu ishal, ağırlık kaybı, ateş ve dehidrasyon ile karakterize, %75 mortalite oranına sahip bir enfeksiyonda, ishalleri hayvanların tümünün gaitasında elektron mikroskopi yöntemi ile rotavirus partiküllerinin saptandığını bildirmişlerdir.

Türkiye'de koyunlarda rotavirus enfeksiyonuna ilgili herhangi bir bildirim ise rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, Türkiye'de sığırlarda Rotavirus enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak araştırıldığı çalışmalardan (1,3,4,18) hareketle, bu araştırmaların yürütüldüğü kamu işletmeleri ile diğer bazı işletmelerde koyun ve sığırların birarada bulundurulduğu ve türler arası etken nakli olasılığı gözönünde bulundurulurken, ishalleri kuzular ile klinik olarak sağlıklı görünümlü değişik yaş gruplarında bulunan koyunlarda, rotavirusların varlığının virolojik ve serolojik olarak araştırılması ve böylece koyunlarda klinik ya da subklinik olarak rotavirus enfeksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Hücre kültürü: Mikronötralizasyon testinde kullanılan bovine rotavirus (BRV)'un Northern Ireland 75/447 suşunun üretilmesinde, titresinin belirlenmesinde ve serum örneklerine uygulanan mikronötralizasyon testinde Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü kullanıldı.

Virus: Mikronötralizasyon ve PAGE testlerinde referenz virus olarak Rotavirusun Northern Ireland 75/447 suşundan yararlanıldı.

Tablo 1.: Materyal sağlanan işletmeler ve materyal sayıları
Table 1.: The number of sampled animals and distribution of these samples to the flocks.

MATERYAL SAĞLANAN İŞLETMELER	ÖRNEKLENEN MATERYAL			
	Koyun	Gaita		Serum
		Kuzu		
		Sağlıklı	İshalli	
I (Ankara)	50	26	6	50
II (Ankara)	40	25	29	50
III (Bursa)	44	-	5	-
IV (Denizli)	11	5	-	50
V (Balıkesir)	30	-	-	50
VI (Eskişehir)	-	-	-	50
VII (Amasya)	-	-	-	48
TOPLAM	175	56	40	298

Gaita örnekleri: 5 kamu işletmesinde bulunan 96 adet kuzu (40 adeti ishalleri ve 56 adeti sağlıklı görünümlü) ile 175 adet koyundan sağlanan toplam 271 adet gaita örneği kullanıldı. Materyal sağlanan işletmeler ile alınan materyal sayıları Tablo-1'de gösterildi.

Serum örnekleri: Serolojik kontrol amacıyla 6 kamu işletmesine ait toplam 298 erişkin koyundan sağlanan kan serumları kullanıldı (Tablo 1). Kan serumu örnekleri III nolu işletme dışında, gaita örneği alınan koyunlar ile diğer sağlıklı görünümlü koyunlardan alındı.

Metot

ELISA Testi: Gaita örneklerinde rotavirus varlığının araştırılması amacıyla ticari ELISA test kiti (Microgen, İngiltere) kullanıldı. Test, üretici firmanın önerdiği yönetime göre yapıldı.

PAGE Testi: Gaita örneklerinin rotaviral RNA içeriği yönünden kontrolü için uygulanan teste, Herring ve ark.(8) tarafından bildirilen yöntem uygulandı.

Bu amaçla, gaita örnekleri %1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 0.1M Na-asetat tamponu içinde (pH:5.0) 1:4 oranında sulandırıldı. Gaita süspansiyonuna eşit hacimde 8-Hidroksikinolin içeren Fenol-Kloroform ka-

rışımı (3:2Kv/v) ilave edilerek, bir dakika vortexle karıştırıldı. Bu karışımın 2000 devirde 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı alındı. Rotavirusa ait çift iplikçikli RNA'nın saptanması amacıyla, elde edilen santrifüj üst sıvıları %0.2 Bromfenol mavisi içeren %25'lik sukroz ile karıştırılarak, PAGE için hazırlandı.

Yukarıda belirtilen işlemler, virus kontrol olarak kullanılan BRV'un Northern Ireland 75/447 suşu için de aynen uygulandı.

Hazırlanan %7.5 devamlı poliakrilamid jelle (akrilamid:bisakrilamid, 37.5:1), hazırlanan örneklerden özel enjektör yardımıyla 0.04 ml.konuldu. Elektroforez işlemi +4°C'de, 20 mA ve 70 volt'da 16 saat süreyle yapıldı. Bu süre sonunda jel gümüş nitrat ile Sammons ve ark. (13)'nın bildirdiği yönetime göre boyandı.

Mikronötralizasyon Testi: Test, serum örneklerinde rotavirus antikorlarının saptanmasında kullanıldı.

Bu amaçla, serum örneklerinin 1/5'lik sulandırılmalarından mikronötralizasyon tabletinde yan yana bulunan iki göze 0.05 ml konuldu. Daha sonra serum sulandırılmaları üzerine eşit

hacimde 100 DKID₅₀ / 0.05 ml. oranında sulandırılan test virusundan (BRV'un Northern Ireland 75/447 suşu) ilave edildi. Tabletler 37 °C'de 1 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm gözlemlere MDBK hücre süspansiyonu (300 000 hücre/ml) konuldu. Tabletler yeniden 37° C'de 5 gün süre ile inkubasyona bırakıldı. Test, hücrelerde meydana gelen sitopatolojik değişiklikler dikkate alınarak, doku kültürü mikroskopunda değerlendirildi.

Bulgular

Kırk ishalleri, 56 sağlıklı görünümü 96 kuzu ile 175 erişkin koyundan sağlanan gaita örneklerinde gerek ELISA ve gerekse PAGE testleri ile yapılan kontrollerde rotavirus antijeni ya da viral nükleik asit tespit edilemedi. Diğer taraftan, BRV Northern Ireland 75/447 suşu kullanılarak uygulanan mikronötralizasyon testi ile kontrol edilen 298 adet kan serumu örneği de rotavirus antikor yönünden negatif bulundu.

Tartışma ve Sonuç

Tüm dünyada yaygın olan rotavirusların enfeksiyon spektrumunda yeni doğan bebek, buzağı, tay, kuzu, domuz, maymun, geyik, kedi ve köpek ile kanatlı hayvanlar yer almaktadır (4,5,6,11,14,17).

Rotaviruslar erişkin hayvanlarda subklinik enfeksiyona, yeni doğan hayvanlarda ise sıklıkla klinik enfeksiyona neden olmaktadır (1,2,18). Nitekim koyunlarda gaitadan rotavirus tespitinin bildirildiği az sayıda çalışmada (2,6,7,15,16) örneklemeler ishalleri kuzulardan ya da bunlarla aynı işletmede bulunan sağlıklı görünümü kuzulardan yapılmıştır. Bu çalışmada ise örneklemelerin yapıldığı işletmelerde yeni doğan kuzularda yoğun ishal olguları tespit edilememiş ve sadece 40 ishalleri kuzudan materyal sağlanabilmiştir. Ayrıca ishalleri kuzuların yanısıra aynı işletmelerde bulunan 51 sağlıklı görünümü kuzu da örneklenmiştir. Ancak bu hayvanlardan sağlanan gaita örneklerine uygulanan testler sonucunda rotavirus antijeni tespit edilememiştir. Bu veri ishal olgularının, Rotavirus dışında bir etiyolojik ajan yada diğer bazı faktörlerden (beslenme, v.b) kaynaklandığını ortaya koymuştur.

Çeşitli türlerin sağlıklı görünümü erişkinlerinde ve yeni doğanlarında rotavirus varlığı saptanmıştır (1,2,6,7). Ellis ve Daniels (7), rutin teşhis amacıyla laboratuvarlarına gönderilen ishalleri kuzularda rotavirus enfeksiyonunun varlığının saptanması (örneklenen kuzuların %20'si) yanısıra, bu kuzularla aynı işletmelerde bulunan sağlıklı görünümü kuzularda da %11 oranında rotavirus tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, 51'i ishal olgularının gözlemlendiği işletmelerde bulunan toplam 56 sağlıklı görünümü kuzu ve 175 erişkin koyuna ait gaita örneği rotavirus antijeni/nükleik asidi yönünden negatif bulunmuştur. Dolayısıyla virolojik verilere dayanılarak subklinik rotavirus enfeksiyonunun saptanması mümkün olamamıştır.

Serolojik çalışmalar ile etkene spesifik antikorların tespiti de, bir populasyonda enfeksiyonun varlığı ya da oranının belirlenmesinde büyük değer taşımaktadır. Bu çalışmada BRV Northern Ireland 75/447 suşu kullanılarak yapılan nötralizasyon testi sonucunda, 6 kamu işletmesinde bulunan kuzu ve koyunlardan sağlanan 298 kan serumunda antikor tespit edilememiştir. Bununla birlikte bu veri kontrol edilen işletmelerdeki koyunlarda rotavirus enfeksiyonunun bulunmadığı anlamına da gelmemektedir. Çünkü farklı hayvan türlerinden ya da insanlardan izole edilen rotaviruslar ile yapılan kros-nötralizasyon çalışmalarında çoğunlukla ortak nötralizasyon epitopunun bulunmadığı ve hatta aynı türden izole edilen rotavirus suşlarının da bu suşlara karşı elde edilen hiperimmün serumlar ile farklı nötralizasyon sonuçları verdiği tespit edilmiştir (12). Bu nedenle, bu çalışmada koyun orijini rotavirusun kullanılmadığı dikkate alınarak, kontrol edilen işletmelerde BRV Northern Ireland 75/447 suşu ile kros nötralizasyon veremeyen ya da düşük düzeyde antijenik yakınlığı olan bazı koyun ve sığır rotavirus suşlarının varlığı olasılığı gözönünde bulundurulmalıdır. Farklı koyun yada sığır Rotavirus suşları kullanılarak yapılan yeni serolojik çalışmalar bu konuya açıklık getirebilecektir.

Bu çalışmanın amaçlarından birisi de sığır ve koyun türlerinin birarada barındırıldığı işletmelerde türler arasında etken naklinin ara-

tırılmasıdır. Burgu ve ark. (4) ile Yazıcı'nın (18) araştırmalarında, bu araştırmada materyal sağlanan III, IV, V ve VI nolu işletmelerde yeni doğan ishalleri buzağılarda rotavirus varlığı saptanmıştır. Bu işletmelerde sığırlarda rotavirus enfeksiyonunun saptanmış olması, koyunlarda da en azından sığır orijinli rotavirus enfeksiyonlarının muhtemel olabileceğini dűşündürműřtür. Ancak araştırmada BRV spesifik antikor taşıyan koyunlar tespit edilememiştir. Bu durum sűzkonusu işletmelerde sığırlardan koyunlara Rotavirus bulaşmasının olmadığı ya da bulaşmanın serolojik çalışmada kullanılan BRV suřu ile saha virusu arasındaki antijenik ilişki dűzeyinin bir sonucu (12) olarak tespit edilemediği şeklinde değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, bu arařtırmada ishalleri ya da sađlıklı gűrűnűmlű kuzu ve koyunlarda rotavirus enfeksiyonlarının varlıđı saptanamamıřtır. Ancak ۆzellikle yeni dođan kuzularda yođun olarak ishal olgularının gűzlendiđi iřletmelerde, rotavirus yűnűnden yapılacak serolojik, virolojik ve elektron mikroskopik çalıřmaların bu konuda yeni verileri ortaya koyacađı dűřűnűlmektedir.

Kaynaklar

1. Alkan,F., Pulat,H., Yazıcı,Z., Burgu,İ. (1992) *Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon testi ile ishalleri buzağı gaitalarında Rotavirusların tespiti*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 39, 238-46.
2. Berrios,P., Celedon,M.O., Raminez,V. (1988) Ovine Rotavirus: Detection by means of ELISA and isolation in MA-104 Cells. Arch Med Vet, Chile, 20 (2), 108-112. Abstr. Veterinary Bulletin: 1989 (059 - 07044).
3. Burgu,İ., Aka,Y. (1983) *Sığırlarda Rotavirus antikorlarının dağılımları űzerine alışmalar*. Ankara niv Vet Fak Derg, 30 (1) :35-44.
4. Burgu,İ., Aka,Y., Alkan,F., zkul,A., Karaoğlu,T. (1995) *Yenidoğan ishalleri buzağılarda Rotavirusların EM, ELISA ve PAGE teknikleri ile abuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu*. Ankara niv Vet Fak Derg, 42, 491-498.
5. Chasey,D., Banks,J (1984) *The commonest Rotaviruses from neonatal lamb diarrhoea in England and Wales have atypical electrophoretotypes*. Vet Rec.115.326-327.
6. Dimitrova, E., Georgiev, G.K., Milov, B., Haralambiev, K.E., Morolombiev,M (1988) *Intestinal Viral Disease of Sheep*. Vet Sbirka. 86 (5). 34-36.
7. Ellis,G.R., Daniels,E (1988) *Comparison of direct electron microscopy and enzyme immunoassay for the detection of Rotavirus in calves, lambs, piglets and foals*. Australian Vet Journal, 65,133-135.
8. Herring,A.J., Inglis,N.F., Ojeh,C.K., Snodgrass, R.D., 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.
9. Imagawa,H., Fukunaga,Y., Kanemaru,T., Kamada, M. (1989) *Detection of equine Rotavirus in feces by latex agglutination*. Bull Equine Res Inst, 26 : 47-52.
10. Kapikian,Z.A., Chanock,M.R. (1990) *Rotaviruses* pp: 1353-1404. In Fields,N.B., Knipe,M.D.D Virology, Second Edition, Raveb Press, New York, ABD.
11. Makabe,T., Kamoniwa,M., Kishi,Y., Yataya,K., Sato,K., Inaba,Y. (1985) *Isolation of ovine Rotavirus in cell cultures*. Arch Virol, 83 (1-2), 123-127.
12. Ojeh,C.K., Snodgrass,D.R., Herring,A.J (1984) *Evidence for serotypic variation among bovine Rotaviruses*. Arch Virol,79,161-171.
13. Sammons,D.W., Adams,L.D., Nishizawa,E.E. (1981) *Ultrasensitive silver-based color staining polypeptides in polyacrylamide gel electrophoresis*. 2. 135-141.
14. Snodgrass,D.R., Angus,K.W., Gray,E.W. (1977) *Rotavirus infection in lambs : Pathogenesis and Pathology*. Arch Virol, 55 (4) : 263-274.
15. Snodgrass,D.r., Smith,W., Gray,E.W., Herring,J.A. (1976) *A Rotavirus in lambs with diarrhoea*. Res Vet Sci, 20, 113-114.
16. Theil,K.W., Grooms,D.L., Mc Closkey,C.M., Redman,D.R. (1995) *Group B Rotavirus associated with an outbreak of neonatal lamb diarrhoea*. J Vet Diag Invest, 7 (1), 148-150.
17. Tzipori,S., Sherwood,D., Angus,K.W., Campbell,I., Gordon,M. (1981) *Diarrhea in lambs: Experimental infections with enterotoxigenic Escherichia Coli, Rotavirus and Cryptosporidium sp*. Infect Immun, 33 (2), 401-406.
18. Yazıcı,Z. (1992) *Buzađılarda Rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu*. A  Sađlık Bilimleri Enstitűsű, Doktora Tezi, Ankara.