

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIRLARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONUNUN
EPİDEMİYOLOJİSİNDE GEBELİĞİN VE MATERNAL
ANTİKORLARIN ROLÜ**

Vet. Hek. Kezban CAN ŞAHNA

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

123798

123798

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feray ALKAN

**EC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

2002 – ANKARA

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIRLARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONUNUN
EPİDEMİYOLOJİSİNDE GEBELİĞİN VE MATERNAL
ANTİKORLARIN ROLÜ**

Vet. Hek. Kezban CAN ŞAHNA

123798

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feray ALKAN

Bu tez, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 00-50-1
proje numarası ile desteklenmiştir

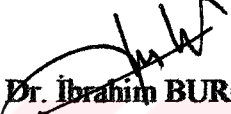
2002 – ANKARA

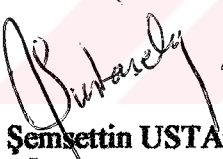
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Doktora Programı

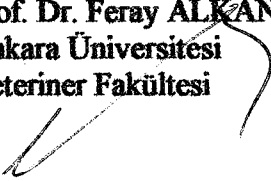
**Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: 10 / 4 / 2002


Prof. Dr. İbrahim BURGU
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Şemsettin USTAÇELEBİ
Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi


Prof. Dr. Feray ALKAN
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi


Doç. Dr. Jale ERDEĞER
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Raportör

ÖNSÖZ

Rotavirusların neden olduğu buzağı ishalleri, son yıllarda endüstri kavramıyla ifade edilmeye başlanan hayvancılık sektöründe, özellikle de entansif süt sığırcılığı işletmelerinde, neonatal ölümler, enfekte hayvanlarda gelişme geriliği, medikal girdiler vb. nedenler ile oldukça önemli bir konum kazanmıştır.

Rotavirusların neden olduğu klinik enfeksiyon, ishal ve buna bağlı olarak şekillenen fizyolojik değişikliklerle karakterizedir. Enfekte hayvanlarda dehidrasyon ve zayıflama gözlenir. Bakteriyel ve protozoer ikincil enfeksiyonlarla birlikte seyreden olgularda önlem alınmadığı takdirde ölüm şekillenebilir.

Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde klinik enfekte yenidoğanların yanı sıra, subklinik enfekte erişkin sığırlar ve sağlıklı görünümlü buzağuların da neonatal dönemdeki buzağılara enfeksiyonun bulaşması ve dolayısıyla sürüde enfeksiyonun devamlılığında rol oynayabildiği bildirilmiştir.

Erişkin sığırlarda rotavirus enfeksiyonları çoğunlukla subklinik bir seyir izler ve bu hayvanlar sürü içerisinde virus saçıcısı pozisyonundadırlar. BRV enfeksiyonunun devamlılığında sağlıklı görünümlü erişkin saçıcıların önemli rol oynadığı, enfekte annelerin genellikle buzağılama sırasında yenidoğan yavrularını enfekte ettikleri ve enfekte buzağuların da yüksek miktarda virus saçarak diğer yenidoğanlar için enfeksiyon kaynağı oldukları bildirilmiştir.

Bu çalışmada, erişkin sığırların buzağılama döneminde BRV saçtıkları, bu saçıcıların doğum sırasında yavrularını enfekte ettikleri ve enfekte buzağuların da aynı zamanda doğan diğer buzağular için enfeksiyon kaynağı oldukları belirlenmiş olup, elde edilen veriler ışığında hastalığın kontrol ve eradikasyonuna ilgili öneriler ortaya konulmuştur.

Çalışmamın bütün aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof.Dr. Feray ALKAN'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan Sayın Prof.Dr. İbrahim BURGU'ya, olumlu yönlendirmeleri ile katkı sağlayan tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof.Dr. Yılmaz AKÇA ve Sayın Doç.Dr. Jale ERDEĞER'e, sürekli yardım ve desteklerini gördüğüm Doç.Dr.Aykut ÖZKUL'a, doktora tez çalışmam boyunca birlikte görev yaptığım Araştırma Görevlisi arkadaşlara, bu çalışmanın Karaköy Tarım İşletmesi Müdürlüğü'nde yürütülmesine izin veren TİGEM'e ve saha çalışmasına yardımcı olan Karaköy Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne, bu araştırmayı proje olarak kabul ederek maddi açıdan destekleyen Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu'na ve bu süre boyunca benden sabrını ve desteğini esirgemeyen sevgili eşime teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Resimler	ix
Çizelgeler	x
Grafikler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	4
1.2. Epidemiyoloji	8
1.3. Patogenez ve Patoloji	11
1.4. Klinik Bulgular	12
1.5. Teşhis	13
1.6. İmmunoloji	15
1.7. Tedavi ve Kontrol	17
1.8. Araştırmanın Amacı	20
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Gereç	21
2.1.1. Araştırma Planı ve Örneklenen Hayvanlar	21
2.1.2. Hücre Kültürü	24
2.1.3. Virus	24
2.1.4. Serum Örnekleri	24
2.1.5. Süt Örnekleri	24
2.1.6. Gaita Örnekleri	25
2.2. Yöntem	25
2.2.1. Virusun Üretilmesi	25

2.2.2. Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Enfeksiyözite Gücünün Belirlenmesi	26
2.2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	26
2.2.4. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Testi	27
2.2.4.1. BRV Nükleik Asidinin Ekstraksiyonu	27
2.2.4.2. PAGE	27
2.2.4.3. Gümüş Nitrat Boyama	28
2.2.5. Serum Nötralizasyon Testi	28
2.2.6. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN ₅₀) Değerinin Mikronötralizasyon Yöntemi ile Saptanması	29
3. BULGULAR	30
3.1. Virusun Üretilmesi	30
3.2. Virusun Enfeksiyözite Gücü	30
3.3. ELISA	30
3.3.1. Erişkin Sığırlara Ait ELISA Sonuçları	32
3.3.2. Buzağılara Ait ELISA Sonuçları	32
3.4. PAGE Testi	34
3.4.1. Erişkin Sığırlara Ait PAGE Testi Sonuçları	34
3.4.2. Buzağılara Ait PAGE Testi Sonuçları	34
3.5. ELISA ve PAGE Testi Sonuçlarının Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi	37
3.6. Serum Nötralizasyon Testi	39
3.6.1. Erişkin Sığırlara Ait Kan Serumu Sonuçları	39
3.6.2. Kolostrum/Süt Serumu Sonuçları	42
3.6.3. Buzağılara Ait Kan Serumu Sonuçları	44
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ	55
ÖZET	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGID	Agar jel immünodiffuzyon
AgNO ₃	Gümüş nitrat
BCV	Bovine coronavirus
BRV	Bovine rotavirus
BSC-1	African Green Monkey Kidney
BVDV	Bovine viral diarrhoea virus
°C	Santigrat derece
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CF	Komplement fikzasyon
CO ₂	Karbondioksit
CPE	Sitopatojenik etki
CsCl	Sezyumklorid
DKID ₅₀	Doku kültürü infektif doz 50
ds	Double strain
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektron mikroskop
FAT	Flouresan antikor tekniği
HA	Hemaglütinasyon testi
HI	Hemaglütinasyon inhibisyon testi
IEM	İmmun elektron mikroskop
Ig	İmmunglobulin
LLC-MK-2	Rhesus Monkey Kidney
MA-104	Monkey Kidney
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MEM	Minimum Essential Medium
MK-2	Monkey Kidney
mM	Milimolar
ml	Mililitre

mRNA	Messenger RNA
Na	Sodyum
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
NS	Non structural
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
RNA	Ribonükleik asit
SN	Serum nötralizasyon
ss	Single strain
Vero	African Green Monkey Kidney
VP	Viral protein



RESİMLER

	Sayfa No
Resim 3.1. : ELISA sonuçları (Reaksiyon durdurulmadan önce)	31
Resim 3.2. : ELISA sonuçları (Reaksiyon durdurulduktan sonra)	31
Resim 3.3. : PAGE testi pozitif numuneler	36



ÇİZELGELER

	Sayfa No
Çizelge 2.1 : Araştırmada kullanılan hayvan sayısı	22
Çizelge 2.2 : Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularından sağlanan materyallerin örnekleme dönemlerine göre dağılımı	23
Çizelge 3.1 : Grup I'de BRV antijeni tespit edilen annelerin sayısı	32
Çizelge 3.2 : Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularına ait ELISA sonuçları	33
Çizelge 3.3 : Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularına ait PAGE testi sonuçları	35
Çizelge 3.4 : Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularına ait ELISA ve PAGE testi sonuçları	38
Çizelge 3.5 : Grup I'deki sığırların kan serumu antikor titreleri ve örnekleme dönemlerine göre geometrik ortalamaları	40
Çizelge 3.6 : Grup II'deki sığırların kan serumu antikoru dağılımı	41
Çizelge 3.7 : Grup II'deki sığırların kan serumu antikor titrelerinin geometrik ortalama değerleri	42
Çizelge 3.8 : Kolostrum/süt örneklerinde BRV spesifik antikor titreleri ve örnekleme dönemlerine göre geometrik ortalamaları	43
Çizelge 3.9 : Buzağların kan serumu antikor titreleri ve örnekleme dönemlerine göre geometrik ortalamaları	45

GRAFİKLER**Sayfa No**

Grafik 3.1 : Annelerin doğum sonrası kolostrum/süt örneklerindeki antikor titreleri	44
Grafik 3.2 : Annelerin kan-süt ve yavruların kan serumu antikor titreleri dağılımı	46



1.GİRİŞ

Buzağılarda diyareye sebep olan enterik enfeksiyonlar, yaşamın erken dönemlerinde oluşan yüksek mortalite ile medikal girdiler ve gelişme geriliği sonucunda önemli ekonomik kayıplara neden olurlar. Bu enfeksiyonların etiolojisinde bir çok faktör rol oynamaktadır. Bunlar arasında mantar ve kimyasal toksinler, bakteriler, viruslar, protozoalar ve yetersiz besleme, düşük sıcaklık, kötü hijyen, kalabalık ortam, kolostrum alamama ve bireysel duyarlılık gibi faktörler yer alır. Diğer faktörler ise, buzağılarda maternal immunitenin transferi ve immun cevabın gelişimidir (Kodituwakku ve Harbour, 1990; Garcia-Sanchez ve ark., 1993).

Buzağılarda viruslar tarafından oluşturulan diyarenin en önemli etkenleri rota ve coronaviruslardır. Bununla birlikte, Breda virus, calici-benzeri virus, parvovirus, bovine viral diarrhoea virus (BVDV), adeno ve astroviruslar da ishalli buzağılardan izole edilen etkenlerdir. Enterotoksijenik E.coli, Salmonella, Camphylobacter jejuni gibi bakteriler ile Koksidial parazitler de diyarenin ortaya çıkışında etkili diğer enfeksiyöz etkenlerdir (Abraham ve ark.,1992; Kodituwakku ve Harbour,1990; Van Opdenbosch ve ark.,1979).

Rotavirusların neden olduğu enteritisler farklı hayvan türlerinin yenidoğanlarında yaygın olarak görülmekte olup, akut sarı renkli ishal, dehidrasyon, kilo kaybı, anoreksi, metabolizma bozuklukları ile karakterizedirler. Etken ince barsak villus epitellerinde tahribat meydana getirerek diğer viral ya da bakteriyel etkenlerle komplikasyonların doğmasına ve önlem alınmadığı takdirde ölümle sonuçlanabilen bir klinik seyire de neden olabilmektedir (Blood ve ark.,1983; McNulty,1983).

Tüm dünyada yaygın olan rotavirusların enfeksiyon spektrumunda yenidoğan bebek, buzağı, tay, kuzu, domuz, maymun, geyik, kedi ve köpek ile kanatlı hayvanlar yer almaktadır (Fenner ve ark.,1987).

Rotaviruslar üzerine ilk çalışmalar, 1943 yılında Light ve arkadaşları tarafından çocuklarda görülen bir ishal epidemisinden topladıkları gaita örneklerinden, bakterilerin geçemediği filtre sistemlerinden geçen bir ajanı izole etmeleriyle başlamış, ancak bu ajanın doku kültürlerinde zor remesinden dolayı araştırmalar uzun yıllar boyunca yavaş ilerlemiştir (Joklik, 1985). Mc Nulty (1978), Mebus ve arkadaşlarının 1969 yılında deneysel olarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada, sahadan alınan gaita örneklerinden elde ettikleri inokulumu kolostrum almamış buzağılara vererek ishalin oluşabileceğini ortaya koyduklarını bildirmiştir. Bishop ve ark. (1973) akut gastroenteritis semptomu gösteren çocukların doudenum mukozasından aldıkları biyopsi materyallerinden 70 nm büyüklükte olan insan rotaviruslarını identifiye ederek, bu virusun Norwalk virusuyla ortak enfeksiyon oluşturduğunu ortaya koymuşlardır.

1977 yılında domuz rotavirusları proteolitik enzimlerle muamele edilerek doku kültürlerine adapte edilmiş ve seri pasajlar şeklinde üretilmiştir (Matsuda ve Nagakami, 1989). Aynı sene içinde Mc Nulty ve ark. (1977) MDBK hücre kültürlerinde buzağı rotaviruslarını tripsinle muamele ederek başarı ile üretmişlerdir.

Rotaviral enteritisler en çok kiş ve sonbahar aylarında artan insidensle seyretmektedir. Seçici olarak özellikle genç hayvanları etkileyen hastalığın yayılmasında en önemli yol olarak gaita bildirilmiştir. Ayrıca etken gaita ile bulaşmış yem, su ve süt ile de indirekt olarak nakledilebilmektedir (Chauhan ve Singh, 1996).

Rotavirus enfeksiyonu yetişkin hayvanlarda genellikle subklinik olarak seyretmektedir. Birçok araştırıcı (Alkan ve ark., 1999; Burgu ve ark.,1995; Crouch ve Acres, 1984) erişkin sığırlarda rotavirus antikorlarının tespit edildiğini bildirmiştir. Erişkin hayvanlar herhangi bir klinik semptom göstermeksizin uzun süre virusu saçarak, sürüde virusun varlığının devamlılığında önemli rol oynarlar. Rotavirus enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde erişkin virus saçıcı hayvanların önemi domuzlarda Benfield ve ark. (1982) tarafından ortaya konulmuştur. Goto ve ark.(1986) da iftlikte BRV enfeksiyonunun sürdürülmesinde asemptomatik erişkin saçıcıların önemli rol oynadığını, enfekte annelerin genellikle buzağılama sırasında yenidoğan buzağıları

enfekte ettikleri ve enfekte buzağların da yüksek miktarda virus saçarak diğer yenidoğanlar için enfeksiyon kaynağı olduklarını bildirmişlerdir. Murakami ve ark.(1987) da buzağılama sezonunda rotavirus salgını görülen bir işletmede, BRV antijeninin ilk önce erişkin bir sığırdan doğum yaptığı gün saptandığını, ertesi gün bu sığırın yavrusunda ve daha sonra da işletmedeki yenidoğanlarda yoğun rotavirus enfeksiyonunun ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Erişkin sığırların büyük bir çoğunluğunda antikor saptanmasına karşın, kolostrum ile yenidoğana aktarılan antikor titresinin koruyucu rolü tartışma konusudur. Sığırlarda bu antikorlar 1.gün kolostrum ile yüksek konsantrasyonda saçılır ve doğumdan sonra birkaç gün içinde hızla negatif düzeye düşer (Crouch ve Acres, 1984; Kapikian ve Chanock, 1990). Bu nedenle yenidoğanların BRV enfeksiyonundan korunmasında hijyen tedbirleri, uygun bakım ve beslemenin sağlanması önerilmektedir. Bunun yanı sıra, yenidoğanların aktif immunizasyonu muhtemel bir yaklaşım olarak değerlendirilmiş ve hazırlanan attenüe aşılar ticari olarak sunulmuş ise de, sahadaki sonuçları tartışmalıdır. Alternatif yaklaşım olarak gebeliğin ileri dönemlerinde aşılanan annelerde yüksek titrede antikor oluşumunun sağlanması ve kolostrum ile sağlanan pasif immunité ile yenidoğanların enfeksiyondan korunması düşünülmüş ve bu amaçla hazırlanan aşılar ticari olarak kullanıma sunulmuştur. Bu aşılarda sahadaki etkinlikleri, aşı virusu ile saha izolatlarının antijenik yakınlıkları konuları birçok araştırmacının üzerinde yoğun olarak çalıştığı konulardır (Archambault ve ark.,1988; Kim ve ark., 2002; Van Zaane ve ark.,1986; Ward ve ark., 1990).

Türkiye’de rotavirüslerle ilişkin enteritislerin varolduğu, sığırlarda rotavirus enfeksiyonunun prevalansının belirlenmesi, ishalleri buzağılarda rotavirüslerin rolü ve rotavirus enfeksiyonlarının teşhisinde duyarlı yöntemlerin belirlenmesi amaçlarına yönelik araştırmalar (Alkan, 1998; Alkan ve ark.,1992; Burgu ve Akça, 1983; Burgu ve ark., 1995; Yazıcı, 1992) ile ortaya konulmuştur. İshalleri buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının araştırıldığı çalışmalarda (Alkan,1998; Burgu ve ark.,1995, Yazıcı,1992) materyal sağlanan yetiştirmelerde ishal olgularında rotavirüsler %17-53 oranında etiyolojik ajan olarak saptanmıştır. Erişkin sığırlarda BRV antijeninin

EC YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
KOORDİNASYON MERKEZİ

araştırıldığı Alkan ve ark. (1999) çalışmasında çoğunluğu 7-9 aylık gebe olan 585 sığira ait gaita örneğinden hiçbirisinde BRV tespit edilememiştir. Ancak erişkin sığırlarda BRV enfeksiyonu oranlarının serolojik olarak belirlenmesine yönelik araştırmalarda (Alkan ve ark.,1999; Burgu ve Akça,1983; Burgu ve ark., 1995) %28.3-43.8 oranında seropozitiflik saptanmıştır.

1.1. Etiyoloji

İnsan ve hayvan rotavirüsleri, Reoviridae ailesinde yer alan, ortak morfolojik ve biyokimyasal özellikler taşıyan virus grubudur (Flores ve ark.,1987; Glass ve ark.,1985).

Olgun rotavirus partiküllerinin çapı 70 nm dir. Rotavirus partikülleri zarsız ve yağ eriticilerine karşı dayanıklıdır. Etken, iç ve dış olmak üzere, ikozahedral simetriye sahip iki kapsid ve kordan oluşmaktadır. Viral partiküller RNA'ya bağımlı RNA polimeraz ve baskılanmış RNA transkriptlerini sentezleyebilen enzimleri taşır (Fields ve ark.,1996).

Etken çift iplikçikli RNA (dsRNA) içerir ve genom 11 segmentten oluşmuş olup, purifiye segmentler enfeksiyöz değildir. Çift iplikçikli RNA fragmentleri poliakrylamide gel electrophoresis (PAGE)' de migrasyonlarına göre 1'den 11'e kadar numaralandırılır. Her bir segment en az bir viral proteini kodlar (Parwani ve ark.,1995).

Virusun VP1, VP2 ve VP3 proteinleri kor'da yer alır. VP2 viral RNA'ya bağlanır ve çift iplikçikli RNA segmentlerinin replikasyonunda ve rotavirus virionlarının kapsid içerisine toplanmasında (enkapsidasyonunda) görev alır (Boyle ve Holmes, 1986; Brüssow ve ark., 1990; Clark ve Desselberger, 1988; Zeng ve ark., 1994). VP4 (VP5*+VP8*) ve VP7 dış kapsidde, VP6 ise iç kapsidde bulunan diğer yapısal proteinlerdir. VP4 non-glikolize yüzey proteindir ve tripsin ile muamelede

VP5* ve VP8* olmak üzere iki proteine bölünür. Bu bölünme ürünleri de enfektiviteden sorumludur (Arias ve ark., 1996; Bridger ve ark.,1992). VP4 ve VP7 nötralizasyondan sorumlu proteinlerdir. Ancak gerçek anlamda reaktif olan viral antijen glikoprotein yapısındaki VP7'dir. Bunun bir nedeni VP7'nin virionun dış kapsidinin büyük bir yüzdesini oluşturması, diğeri ise seçici olarak spesifik antikor oluşumunu daha fazla uyarmasıdır (Bridger ve ark., 1992; Matsuno ve Inouye,1983; Sabara ve ark.,1985).

Rotavirusların yapısal proteinleri virus partikülü içinde bulunurlar. NS20, NS26, NS34, NS35 ve NS53 proteinleri ise yapısal olmayıp, olgunlaşmış partikülde bulunmayan ancak enfekte hücrede tespit edilen rotaviral proteinlerdir (Fields ve ark., 1996; Gallegos ve Patton, 1989).

Elektron mikroskop ile yapılan incelemelerde, rotavirus partikülleri farklı morfolojik görünüm sergiler. Genellikle EM'da çift kabuklu, tek kabuklu ve kor olmak üzere üç tip partikül görülür. Çift kabuklu partiküller düzgün kenarlı ve tekerlek görünümündedirler. Tek kabuklu partiküllerin görünümü muntazam olmayıp, yüzeyleri pütürlüdür. Daha seyrek görülen korlar ise, genellikle genomik RNA içermez ve gruplar halinde bulunur (Fields ve ark., 1996).

Rotaviruslar hücre kültürlerinde CPE oluşturarak ürer. Primer hücre kültürleri oldukça duyarlıdır. Bunun yanısıra MA-104, MK-2, LLC-MK-2, BSC-1, Vero ve MDBK hücre kültürleri de virusun üretilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Bachmann ve Hess, 1981; Ihara ve ark., 1983).

Rotaviruslar hücre kültürlerinde üremek için proteolitik enzimlere ihtiyaç duyarlar. Çünkü bu enzimler, dış kapsitte yer alan polipeptid tabakanın yarılmasına ve enfeksiyözitenin artmasına neden olurlar (Arias ve ark.,1996; Bachmann ve Hess, 1981). Etken hücrenin stoplazmasında inklüzyon cisimciği oluşturarak ürer (Musalem ve Espejo, 1985). Hücreler dsRNA'yı replike edecek enzimleri içermezler, bu nedenle virus gerekli enzimleri sağlamak durumundadır. Viral transkriptler hem protein

retiminde hem de negatif zincirin üretiminde rol alırlar. dsRNA segmentleri yeni gelişen subviral partiküller içinde oluşur. Serbest dsRNA veya serbest negatif-ssRNA enfekte hücrelerde bulunmaz. Subviral partiküller, viroplazma ile baēlantılı olarak oluşur ve bu partiküller, endoplazmik retikulum zarından tomurcuklanarak olgunlaşır. Bu süreçte partiküller dış kapsid proteinlerini elde ederler. Partiküller enfekte hücrelerin parçalanması yolu ile aıēa çıkarlar (Fields ve ark.,1996; Gallegos ve Patton,1989).

Enfeksiyözite dış kapsidin bulunup bulunmamasına baēlı olduēundan, kalsiyum ile şelasyon yapıcı ajanlarla (EDTA,EGTA) yapılan muameleden sonra dış kapsid parçalanır ve enfeksiyözite kaybolur. Kalsiyum, ift kabuklu partiküllerde tespit edilmiş, ancak tek kabuklularda saptanamamıştır. Bu da dış kapsid proteini olan VP7 nin protein zincirinde yer alan kalsiyum baēlanma alanından kaynaklanmaktadır (Cohen ve ark.,1979).

Rotavirusların hücre içerisine girmesi, transkripsiyon aktivitesi, morfogenezisi, hücre lizisi ve olgun partiküllerin salınımı Ca^{+2} baēımlı bir yapı izler. Extraseller ortamda, Ca^{+2} viral kapsidin yapısını stabilize eder (Cohen ve ark.,1979; Ruiz ve ark.,2000).

Rotaviruslar, inaktivasyona karşı, göreceli olarak stabildirler. pH 3-9 arasında en az 15 dakika süre ile enfeksiyzitesini koruyabilir. 4 °C'de 1.5 nM $CaCl_2$ içinde stabilize edildiklerinde 20°C'de aylarca enfeksiyzitesini korurlar. Simian ve buzaēı rotaviruslarının enfektiviteleri 45-50 °C'de bile göreceli olarak stabildir. Ancak hemaglutinasyon aktiviteleri bu ısıda hızla kaybolur. Enfektivite ve hemaglutinasyon aktiviteleri, tekrarlanan dondurma ve eritme işlemleriyle bozulabilmektedir. Virus enfeksiyzitesi fenol, formalin, klorin, betapropiolakton ve ozon gibi dezenfektanlarla inaktive edilebilir. Etanol (%95) en etkili dezenfektandır. Dış kapsidi yok ederek etkisini gösterir (Fields ve ark.,1996, Vaughn ve ark.,1987).

Rotaviruslar, serolojik olarak multiple gruplar ve her bir grupta multiple serotiplerin yer aldığı bir sistemde sınıflandırılmışlardır. Bir rotavirus grubu immunfloresan, ELISA ve immunelektronmikroskopi (IEM) gibi serolojik testlerle görülebilen, çapraz reaksiyon veren antijenleri paylaşan virustan oluşur. Bazı hayvan ve insan rotavirus suşları arasında çapraz-nötralizasyon testi, çapraz-hibridizasyon teknikleri ve dizin analizi ile belirlenen antijenik benzerlikler bildirilmiştir. Bu özellikten yararlanılarak hayvan rotavirus suşlarından insanlar için aşılarda hazırlanarak immunprofilaksiste kullanılmaktadır (Albert ve ark.,1987; Brüssow ve ark.,1991; Dyall-Smith ve Holmes,1984; Glass ve ark., 1985; Flores ve ark.,1986; Nagesha ve Holmes,1991).

Rotaviruslar, iç kapsid proteini olan VP6'daki antijenik farklılıklara bağlı olarak 7 farklı grubu kapsarlar. Grup A, B ve C hem insan hem de hayvanlarda bulunurken, grup D, E ,F ve G rotaviruslar sadece hayvanlarda bildirilmiştir (Lu ve ark.,1994; Tsunemitsu ve ark.,1999). Bunlardan grup A rotaviruslar bebeklerde ve yenidoğan hayvan yavrularında en sık olarak görülen gruptur ve ciddi ishalleri hastalıklara yol açarlar (Lucchelli ve ark., 1992). Grup B rotaviruslar ise insan, domuz, sığır, kuzu ve ratlarda ishal nedenidir. Grup A rotaviruslar ile karşılaştırıldığında grup B rotavirusların tespiti daha zordur. Grup B rotaviruslar ile enfeksiyon İngiltere, Fransa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde saptanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Grup B rotavirusların buzağı ishallerinden daha çok erişkin sığırlarda ishale neden olduğu bildirilmiştir (Gueguen ve ark.,1996; Tsunemitsu ve ark.,1999).

Her grup içindeki virüslerin genetik çeşitlenme yetenekleri olmasına karşın gruplar arasında böyle bir özellik yoktur (Gulati ve ark.,1995).

Rotavirusların, dış kapsidinde yer alan ve nötralizasyondan sorumlu olan VP7 (G tipi) ve VP4 (P tipi) proteinlerinin özelliklerine göre serotipleri vardır. Grup A rotavirusların 14 VP7 serotipi ve 11 VP4 serotipi belirlenmiştir. G1, G2 ve G9 sadece insanlarda, G3, G4 ve G8 hem insan hem de hayvanlarda, G5, G6, G7, G10 ve G11

hayvanlarda bulunan serotiplerdir. Dünyanın bir çok bölgesinden izole edilen bovine rotaviruslar genellikle G6 veya G10 serotiplerine aittir (Ciarlet ve ark.,1997; Huang ve ark.,1992; Hussein ve ark.,1995; Lu ve ark.,1994; Markowska-Daniel ve ark., 1996). De Verdier ve ark.(1999) İsveç'te 4 yıl boyunca 41 sürüde yaptıkları bir araştırmada, pozitif olguların %60'nda serotip G10, %30'unda serotip G6, %1'nde serotip G3, %1'nde serotip G8 tespit ederken, olguların %7'nde serotip tayini yapamamışlardır.

1.2.Epidemiyoloji

Rotavirus enfeksiyonları tüm dünyada yaygındır. Birçok memeli hayvan ve kanatlı türünün erişkinlerinde subklinik, gençlerinde ise enterik hastalıklara neden olurlar (Murphy ve ark.,1999).

Bovine rotaviruslar, yenidoğan buzağı ishallerinde en sıklıkla saptanan etkenlerdir. De La Fuente ve ark. (1998) 1-30 günlük 218 ishalleri buzağı ile yaptıkları bir çalışmada, ishal olgularının %52.3'ünde cryptosporidium, %42.7'sinde rotavirus, %11.9'unda E.coli, %7.3'ünde coronavirus tespit etmişlerdir. Alkan (1998) ise, ishal semptomu gösteren buzağuların %53'ünde BRV, %18'inde BCV saptandığını bildirmiştir.

Genç hayvanların enfeksiyonunda, enfekte eden virusun virulensi, diğer enteropatojenik ajanların varlığı, iklim koşulları, hayvanların doğumdan sonra kolostrum alıp almamaları, sütten kesilme zamanları ve immunité durumları enfeksiyonun seyrini etkileyen faktörler arasında yer almaktadır (Fenner ve ark.,1987). Bridger ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada, virulent virus suşlarının daha fazla sayıda enterositleri etkilediklerini ve daha fazla hasar meydana getirdiğini, düşük virulensin ise villusları daha az etkilediğini, enterositlerde daha az sitopatik etki göstererek doğal subklinik enfeksiyona neden olduğunu bildirmişlerdir.

BRV enfeksiyonunun seyrini etkileyen en önemli faktörlerden birisi kolostrum ile alınan maternal antikorlardır. BRV enfeksiyonunun seyrinde aşılanmış sığırlardan sağlanan yüksek titreli antikor içeren kolostrum alımının etkinliği birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Castrucci ve ark.,1984; Le Rousic ve ark.,2000; Snodgrass ve ark.,1980). Wellemans ve Opdenbosch (1981) ise kolostrum almamış hayvanlarda diyarenin daha erken yaşlarda ve daha şiddetli olduğunu bildirmişlerdir.

Rotavirus enfeksiyonları gerek insanlarda gerekse hayvanlarda mevsimsel ve iklimsel farklılıklar göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, soğuk ve kuru hava ile seyreden aylarda, ılık ve rutubetli seyreden aylara göre daha sık olarak enfeksiyona rastlandığı görülmüştür (Cilla ve ark.,2000; Yazıcı,1992;). Ayrıca melez ve eksotik hayvanlar yerli ırklara oranla rotavirus enfeksiyonuna daha duyarlıdır (Chauhan ve Singh,1996).

Rotavirus enfeksiyonları tipik olarak bebeklerde ve yenidoğan hayvan yavrularında görülür. İnsanlarda vakaların çoğu 6-24 aylık, ancak en sıklıkla 9-12 aylık dönemlerdir. Hayvanlarda ise enfeksiyon 1 yaşın üzerinde nadir olarak görülür. Garcia-Sanchez ve ark.(1993), doğumu takiben 2.günde, Burgu ve ark. (1995) 7.günde, Alkan (1998) 11.günde BRV tespitini bildirmişlerdir. Tüm BRV pozitif olgularda kaydedilen ortalama yaş ise genellikle doğum sonrası ikinci haftaya rastlamaktadır. BRV enfeksiyonu için ortalama yaş, Steiner ve ark. (1997) tarafından 6 gün, Garcia-Sanchez ve ark.(1993) tarafından 13 gün, Burgu ve ark. (1995) tarafından 12,7 gün ve Alkan (1998) tarafından 13,6 gün olarak bildirilmiştir.

Rotavirusların başlıca bulaşma yolu fekal-oral yoldur. Rotaviruslar enfekte hayvanların gaitaları ile yüksek titrede (yaklaşık 10^{11} partikül/gr) saçılırlar ve maximum saçılım enfeksiyonun 3. veya 4. günüdür (Murphy ve ark.,1999). Özellikle BRV enfekte ishallerli buzağuların gaitaları ile yüksek miktarda etken saçılımı olur. Etkenin inaktivasyona dayanıklı olması ve aylarca canlı kalabilmesi sebebiyle gaita önemli bir kontaminasyon kaynağıdır (McNulty ve Logan,1983).

Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde, klinik enfekte yenidoğanların yanı sıra, subklinik enfekte erişkin sığırlar ve sağlıklı görünümlü buzağuların da neonatal dönemdeki buzağulara enfeksiyonun bulaşması ve sürüde enfeksiyonun devamlılığının sağlanmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Benfield ve ark.,1982; Chauhan ve Singh,1996; Goto ve ark.,1986; Myers ve ark., 1984).

Rotaviral enfeksiyonlar erişkin sığırlarda ise genellikle subklinik bir seyir izlemektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda Grup B rotavirusların erişkin sığırlarda ishal meydana getirdiği bildirilmiştir (Tsunemitsu ve ark.,1999). Grup A rotavirusla oral inokulasyon yapılan erişkin insanlarda enfeksiyon ve klinik hastalık oluşmuştur (Murphy ve ark.,1999). Erişkin sığırlarda subklinik BRV enfeksiyonunun virolojik olarak tespiti daha çok tesadüfi olarak bildirilmiştir. Ancak serolojik verilere dayanılarak birçok ülkede ve Türkiye’de enfeksiyonun yaygınlığı bildirilmiştir. Burgu ve Akça (1983) yaptıkları çalışmada seropozitiflik oranını %28,3 olarak bulurken, Burgu ve ark.(1995) bu oranı %31 olarak belirtmişlerdir. Alkan ve ark. (1999) ise ileri gebe sığırlarda bu oranı %43,8 olarak tespit etmişlerdir. Crouch ve Acres (1984) 121 erişkin sığırdaki rotavirus antijeni tespit edememişler, ancak bunların 53 adedinde (%44) rotavirus spesifik antikor varlığını ortaya koymuşlardır.

Erişkin sığırların subklinik enfeksiyonu, BRV enfeksiyonunun epidemiyolojisi açısından önem taşımaktadır. Erişkinlerin enfeksiyonu klinik enfekte hayvanlarla yakın temas yolu ile aldıkları ve kronik olarak saçtıkları virus ile de sürüde enfeksiyonun devamlılığını sağladıkları tespit edilmiştir (Wood ve Bridger,1975). Ishizaki ve ark. (1995) kapalı yetiştirme yapılan bir işletmede 3 yıl boyunca yaptıkları bir çalışmada, ishaller ve sağlıklı buzağulardan identifiye ettikleri BRV’un çalışma süresi boyunca antijenik değişikliğe uğramaksızın persistent olarak kaldığını göstermişlerdir. Erişkin subklinik enfekte sığırlarda rotavirusların saçılımı gebeliğin geç dönemlerinde – özellikle doğum yaptıkları gün- muhtemelen hormonal değişiklikler ve hormonların immun sistemdeki immunsupresif etkilerine bağlı olarak artmaktadır. Bu hayvanlar da yenidoğanların etkeni edinmelerinde ve virusu çoğaltarak yaymalarında önemli rol oynamaktadırlar (Murakami ve ark., 1987).

1.3. Patogenez ve Patoloji

Etkenin oral yolla alınmasını takiben, virus ince barsaklardaki farklılaşmış villus kolumnar epitel hücrelerini (enterosit) enfekte eder. Virusun buradaki hızlı replikasyonu ince barsaklar boyunca enterositlerin yoğun bir şekilde yıkımı ve dökülmeye neden olur. Dökülen epitellerin yerini olgunlaşmamış ve farklılaşmamış küboidal epitelyum alır. İnce barsaklar boyunca bu epitelyum kaybı sonucu villuslarda kısalma ve kaybolma (villöz atrofi), komşu villiler arasında füzyon gözlenir. Yoğun enterosit yıkımı, villilerin luminal yüzeyleri boyunca oluşan normal sindirim-absorbsiyon mekanizmasının bozulmasına ve bunun sonucu olarak da akut, geçici, malabsortif diyareye neden olur (Bridger ve ark.,1992). Diyare, barsak içindeki villilerin olgunlaşmış ve farklılaşmış epitel ile kaplanmasına kadar devam eder. Bu süre enfeksiyon sonrası yaklaşık 7-10. günlere kadardır (Saif ve Theil,1990; Yason ve ark.,1987).

Rotavirus enfeksiyonu genellikle ince barsakların proksimal kısımlarından başlar ve jejunum, ileum ve bazen de kolona kadar yaygınlaşır. Bu yayılım alınan virus miktarına, virusun virulensine ve konağın immunolojik durumuna bağlıdır. Rotaviruslar villusların özellikle tepelerinde bulunan epitel hücrelerine invaze olur. Buna bağlı olarak villuslarda önce genişleme, lamina propriada hafif infiltrasyon ve epitel hücrelerinde zedelenme olur. Biraz daha şiddetli vakalarda, villusların uçlarında kütleleşme, kriptlerin derinliklerinde artma, villus epitel hücrelerinin kolumnar özelliklerini kaybederek küboidal ve yassı görünüm almaları, lamina propriada daha fazla yangısal hücre reaksiyonu şeklinde değişiklikler görülür (Bachmann, 1984; Saif ve Theil, 1990).

Enfeksiyon esnasında herhangi bir karakteristik otopsi bulgusuna rastlanmamakla beraber, genellikle akut bir gastroenteritis tablosu görülmekte ve bu tablo özellikle doudenum ve ince barsağın diğer kısımlarını etkisi altına almaktadır. Makroskobik olarak barsaklarda ödem, gerginlik azalması dikkati çeker. Bazı olaylarda barsak mukozasında hemorajik odaklar görülür (Mc Nulty, 1983).

1.4. Klinik Bulgular

Rotavirus enfeksiyonları genellikle neonatal dönemde, yenidoğan hayvan türleri ve bebekleri enfeksiyon spektrumuna alan viral bir enfeksiyon olup, klinik semptomları tüm türlerde birbirine benzemektedir (Kaminjolo ve Adesiyun, 1994; Murphy ve ark.,1999; Rahman ve ark., 1987).

Rotaviruslar, subklinik enfeksiyondan orta dereceli-şiddetli ishal ve öldürücü dehidrasyona kadar değişen belirtilere neden olurlar (Fields ve ark.,1996; Saif ve Theil, 1990).

Buzağı, domuz, tay ve kuzu rotavirus ishalleri “beyaz ishal” veya “süt ishali” olarak da adlandırılır. Enfeksiyonun inkubasyon periyodu 16-24 saat gibi kısa bir süredir (Murphy ve ark.,1999).

Yenidoğan enfekte hayvanlarda hafif depresyon, bol , sulu, sarı renkli gaita görülür. Gaitada yüksek miktarda mukus olabilir. Yüksek miktarda süt alınması diyarenin şiddetini etkiler. Çünkü rotavirus enfeksiyonu sonucunda villusların yapılarının bozulması ve deformasyon oluşumuna bağlı olarak barsak lumeninde laktoz gibi disakkaritlerin enzimleri azalır ve glukoza bağlı Na^+ transportunun durmasına bağlı olarak sindirilmemiş laktoz bakteriyel üremeyi artırır (Mebus ve ark.,1971; Saif ve Theil, 1990).

Yenidoğanlarda rotavirus enfeksiyonlarında morbidite genellikle %100 iken, mortalite %0 - %50 arasında değişmektedir (Schlafer ve Scott,1979).

Enfeksiyona yakalanan hayvanların çoğu 3-4 günde iyileşir. Patojenik E.coli, kötü hijyen, soğuk hava, kalabalık ve özellikle de az miktarda kolostrum alımı diyarenin şiddetini etkileyen diğer faktörlerdir. Genç hayvanlar, dehidrasyon ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlar sonucu ölebilir (Murphy ve ark.,1999).

Yapılan alışmalar, rotavirus enfeksiyonları esnasında şekillenen semptomların yanı sıra diğerk sistemlerde de çeşitli bozukluklar oluşabildiğini ortaya koymuştur. Rahman ve ark. (1987) ishalleri çocuklar üzerinde yaptıkları çalışmalarda rotavirus enfeksiyonlarının %30 oranında st solunum yollarında çeşitli bozukluklar ile seyrettiğini bildirmişlerdir.

1.5. Teşhis

Rotavirus enfeksiyonunun teşhis edilmesinde en çok kullanılan klinik örnekler, direkt etken tespitine olanak tanıyan gaita, barsak içerikleri ve barsaktan alınan doku parçalarıdır.

Rotaviruslar ilk olarak elektron mikroskopi yöntemi (EM) ile tespit edilmiştir. Bu yöntem rotavirus virion morfolojisinin başka virionlarla karışmaması ve kısa sürede sonuç alınabilmesi sebebiyle özellikle rutin teşhis laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Dezavantajı ise, teşhis için yüksek konsantrasyonda viriona gereksinim duyulmasıdır. Doğru bir EM teşhisi için gaitada 10^6 - 10^8 virus partikülü/ml bulunmasının gerektiğini bildirilmiştir Fakat immunoelektron mikroskopi yöntemi ile bu dezavantaj giderilebilmektedir (Benfield ve ark.,1984; Burgu ve ark.,1995; Ellens ve deLeew,1977).

Elektron mikroskopi yönteminden başka rotavirusların tespitinde Latex aglütinasyon, ELISA ve PAGE testlerinin sıklıkla kullanılan ve güvenilir yöntemler olduğu bildirilmiştir (Rodgers ve Baldwin,1991; Ward ve ark., 1996). Burgu ve ark.(1995) 107 ishal olgusunda BRV tespiti için yaptıkları çalışmada EM, ELISA ve PAGE tekniklerini kullanmışlar, BRV tespiti açısından PAGE ile ELISA'nın benzer olduğunu ancak EM tekniğinin daha az duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Chauhan ve Singh (1996) ise, BRV tespiti için her üç testin benzer sonuçlar verdiğini göstermişlerdir.

Ellens ve deLeew (1977) yaptıkları bir araştırmada, gaita ekstraktı 10^5 partikül içerdiğinde ELISA testinin, 10^7 partikül içerdiğinde ise EM'nin pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Garcia-Sanchez ve ark. (1993) ise ishali buzağılarda yaptıkları çalışmada etken tespiti açısından PAGE, ELISA ve Lateks Aglütinasyon testlerinin benzer sonuçlar (%92) verdiğini belirtmişlerdir. Ancak, Kok ve Burrell (1989) Latex aglütinasyon testinin EM ve ELISA ile karşılaştırıldığında, sırayla %91 ve %93 sensitivite ve %100 spesifite gösterdiği, bu yöntemin PAGE'den daha fazla sensitiv olduğunu bildirmişlerdir. Tazi-Lakhsassi ve ark. (1988) da ELISA ve LA ile BRV pozitif örneklerin yalnızca %59'unun PAGE ile pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir.

Rotavirusların teşhisinde ayrıca, flouresans antikor tekniği (FAT) (Benfield ve ark.,1984), Agar jel immunodiffuzyon tekniği (AGID) (Van Opdenbosch ve Vallemans,1981), hemaglütinasyon (HA) ve hemaglütinasyon inhibisyon (HI), Ters (revers) pasif hemaglütinasyon testi (RPHA) (Alkan ve ark.,1992), komplement fikzasyon (CF) (Iwagawa ve ark.,1982) testleri de kullanılmaktadır. Immun floresan testi özellikle hücre içindeki viral antijenlerin tespitinde sıklıkla kullanılan bir testtir (Markowska-Daniel ve ark.,1996).

Son zamanlarda ise, genomun tespitine dayalı diagnostik testlerden PAGE tekniğinin yanı sıra, gaitadan ekstrakte edilen RNA' nın amplifiye edilmesinde PCR tekniği kullanılmaktadır (Buesa ve ark.,1996).

Xu ve ark. (1990) yaptıkları bir çalışmada, PCR'ın PAGE'den 100.000 kez daha sensitiv olduğunu ve muhtemelen PCR'ın kullanımının asemptomatik erişkinlerde gerçek BRV insidensinin daha doğru saptanmasında önemli yer tuttuğunu bildirilmişlerdir.

Rotavirusların hücre kültürlerinde üretilmeleri ise oldukça zordur. Ancak duyarlı hücre kültürlerine tripsin ilavesi yapılarak etken izolasyonu yapılabilmektedir.

Bu nedenle izolasyon çalışmaları daha çok araştırma amaçlı kullanılmakta, rutin teşhiste daha kısa sürede sonuç veren ve daha kolay yöntemler tercih edilmektedir.

Rotavirus spesifik antikorların tespitinde ise, nötralizasyon, ELISA ve Plak redüksiyon testleri kullanılmaktadır (Benfield ve ark., 1984; Ellens ve ark., 1978; Kohara ve Tsunemitsu, 2000; Lecce ve King,1982; Ward ve ark.,1996).

1.6. İmmunoloji

İnce barsakların resorptif bölgesi sadece enfeksiyöz ajanlara değil, toksik ve allerjik antijenlere de maruz kalmaktadır. Bu yüzden de barsaklarda spesifik ve non-spesifik koruyucu mekanizma vardır.

Mukus sekresyon, mikroorganizmaların enterositlere ulaşmasını engelleyen fiziksel bir fonksiyona sahiptir. Mide, doudenum, pankreas ve karaciğerden bol miktarda salınan glandular sekresyon barsaklarda steril bir ortam sağlar. Peristaltik aktivite, mikroorganizmaların barsağın proximaline doğru hareketine neden olur. Safra tuzlarının enteropatojenik viruslar üzerindeki inaktive edici etkisi de belirlenmiştir (Saif ve Theil, 1990). Ayrıca, viral enfeksiyondan sonra ince barsaklarda interferon üretimi de olmaktadır (La Bonnardiere ve ark.,1981).

Sindirim sistemi enfeksiyonlarında immunitede önemli rol, barsaklardaki lenfoid organlar tarafından sağlanmaktadır. Lenfositler, ince barsak mukozası boyunca yer alan Peyer plaklarında bulunurlar. Peyer plakları %80 B-hücreleri öncüleri ve %20 T-hücreleri öncülerini içerir. B-hücrelerinin büyük kısmı IgA salgılamak, az bir kısmı da IgM antikorlarını salgırlar. Ancak ruminantlarda IgG1 sentezleyen plazma hücreleri daha fazla sayıdadır (Bachmann ve Hess,1983; Besser ve ark., 1988).

İnce barsaklarda oluşan immunizasyonda, jejunal ve ileal Peyer's plakları ve mezenterik lenf nodüllerinde bulunan lenfositler önemli rol oynamaktadır. Spesifik B

ve T hücreleri ilk enfeksiyondan bir hafta sonra ince barsak villuslarında görülür ve dört hafta boyunca burada kalırlar. Periferik kandaki nötralizan antikorlar ise bir hafta sonra görülmeye başlar ve ikinci haftada maximum düzeye ulaşırlar. İmmunitede B hücrelerinin rolü T hücrelerinden daha fazladır (Bruce ve ark.,1995).

Rotaviruslar sadece ince barsak epitellerini enfekte ettikleri için, enfeksiyon sistemik değil lokal bir enfeksiyondur ve serum antikorlarının enfeksiyondan korunmada bir etkinliği yoktur. Bu yüzden, bu enfeksiyonda meydana gelen immunité lokal olup enterositleri korumaya yöneliktir. Bu lokal immunité de ya enfeksiyonu takiben aktif olarak ya da immün annelerden kolostrum/süt ile pasif olarak sağlanmaktadır. Doğum ve enfeksiyona maruz kalma arasındaki periyot çok kısa olduğu için pasif immunité BRV enfeksiyonundan korunmada daha önemli bir yer tutmaktadır. Ancak birçok çalışmada, rotavirusla doğal enfekte hayvanlarda spesifik antikorların, doğumun 1. gününde kolostrumda yüksek miktarda varlığı saptanmış, birkaç günden sonra ise bu antikorların hızla azaldığı ve 10. günden sonra tespit edilemediği bildirilmiştir (Van Opdenbosch ve ark.,1983; Wellemans ve Van-Opdenbosch, 1981; Woode ve ark., 1975).

Maternal aşılama ile sağlanan pasif bağışıklık ise bu anlamda önemli avantaj sağlamaktadır. Van Opdenbosch ve ark.(1981) gebeliğin son trimesterinde aşılanan sığırlarda, BRV spesifik antikorların doğum sonrası 84.güne (yaklaşık 3 ay) kadar sütte varlığı bildirilmişler, Lecce ve King (1982) ise aşıli gebelerde doğum sonrası 120. günde bile sütte BRV antikorlarının tespit edilebilecek düzeyde kaldığını göstermişlerdir. Kolostrum ve sütteki immunglobulinler daha çok IgA ve IgG1 sınıfındandır (Bachmann,1984; Snodgrass ve ark.,1980).

Doğal olarak gelişen BRV enfeksiyonlarında, barsaklarda immuniteden IgA yapısında antikorlar sorumlu iken, aşı ile oluşturulan immunizasyonda daha çok IgG antikorları rol oynamaktadır. Barsaklarda IgA yokluğunda, IgG ve CD4+T ve CD8+T hücreleri primer enfeksiyonda koruyucu iken, ikincil enfeksiyonlarda T hücrelerinin koruyucu etkisi olmamaktadır (O'Neal ve ark., 2000).

1.7. Tedavi ve Kontrol

Buzağı ishallerinde, kompleks etioloji sebebiyle her zaman tam bir koruma sağlamak oldukça zordur. Bu yüzden de başlıca hedef, enfeksiyonun insidensini en düşük seviyede tutmaktır.

Buzağı ishallerinde etkin bir koruma için aşağıdaki 3 unsur yerine getirilmelidir.

- 1) Yenidoğanların enfeksiyöz ajanlara maruz kalma riskini azaltmak
- 2) Yeterli miktarda kolostrum alımı ile yüksek seviyeli non-spesifik dayanıklılığı sağlamak ve iyi bir işletme yönetimi uygulamak
- 3) Gebe hayvanların aşılınması ile yenidoğanların spesifik dayanıklılığını artırmak

Yenidoğanların enfeksiyöz ajanlara maruz kalma riski, çoğunlukla ahırda olan doğumlarla ilişkilidir. Bu nedenle;

- Buzağuların önceden iyice temizlenmiş doğum ünitesinde doğması sağlanmalı
- Gebe sığırların perineum ve etrafı doğum öncesi en kısa sürede yıkanmalı
- Buzağular en az 3 haftalık oluncaya kadar temiz bireysel buzağılıklarda büyütülmeli
- İshalli buzağular sağlıklılarından ayrı bir yere alınmalı
- Doğum üniteleri, buzağılama periyodundan önce hayvanlardan arındırılmalı, bu üniteler mümkün olduğunca kuru ve temiz tutulmalıdır.

Gebe hayvanlar, doğum öncesi yeterli miktarda beslenerek hem buzağuların sağlıklı doğması hem de yeterli miktarda kolostrum oluşumu sağlanmış olur. Kolostrum sadece immunglobulinleri değil, yavrunun sağlıklı beslenmesi için gerekli maddeleri de içerdiğinden hem non-spesifik hem de spesifik koruyuculuğa sahiptir. Bu yüzden de doğum sonrası birkaç saat içinde alınmalıdır. Doğum sonrası bir saat içinde kolostrum alan buzağılarda yüksek miktarda immunglobulin emilimi tespit edilmiştir.

Doğum sonrası 12. saatte alınan kolostrum ile immunglobulin seviyesinde önemli bir artış görülmemiştir (Radostits,1991).

Entansif yetiştirme yapılan işletmelerde, BRV enfeksiyonunun insidensini azaltmak için sadece hijyenin iyileştirilmesi yeterli değildir. Enfeksiyona karşı direnç oluşturmada, sistemik immuniteden çok barsaktaki lokal immunitenin önemi vardır. Evcil hayvanlarda kolostrumdaki rotaviral antikorların, yenidoğanları enfeksiyondan korumada önemi büyüktür. Kolostral antikorların çoğu sirkülasyona girmesine rağmen, serum antikor miktarı korunmada önemli değildir, önemli olan barsak lumenindeki antikor varlığıdır. Kısa zamanda fazla kolostrum alımı, son kolostrum alımını takiben 48 saatlik bir koruma sağlarken, küçük miktarda sürekli kolostrum alımı daha çok koruma sağlamaktadır (Murphy ve ark.,1999; Radostits,1991).

Erişkin sığırlar, özellikle postnatal yaşamın ilk günlerindeki yenidoğan buzağuların enfeksiyondan korunmasında kolostrum ve süt ile salgıladıkları antikor nedeniyle koruyucu role sahiptirler. Bununla birlikte birçok araştırmada, erişkinlerde seropozitiflik oranları yüksek olmasına karşın, antikor titrelerinin düşük olduğu saptanmıştır. Lecce ve King (1982), aşı ve aşısız sığırların kolostrumu ile yaptıkları çalışmada, aşısız grubun % 72'sinde rotavirus spesifik antikor tespit etmişler, ancak bunların sadece % 38'nde 1:10 titrede antikor saptamışlar, diğerlerinde ise bu değerin altında antikor varlığını bildirmişlerdir. Birçok araştırmacı (Lecce ve King,1982; Snodgras ve ark.,1980; Snodgras ve ark.,1982) düşük antikor titresine sahip annelerin yavrularına aktaracakları kolostrum/süt ile yavruları enfeksiyona karşı korumada, özellikle yaşamın ilk birkaç gününden sonra fazla bir etkinliğe sahip olmadıklarını saptamışlardır. Her ne kadar bu durum, kolostrum ile sağlanan pasif bağışıklığın koruyuculuğunu tartışmaya açar gibi görünse de, yüksek titrede rotavirus antikorlu içeren kolostrum alımının koruyucu olduğu bilinmektedir. Nitekim doğal enfekte annelerden doğan buzağılarda ortalama enfeksiyon yaşının genellikle yaşamın 2. haftasında saptanması da kolostrumun BRV enfeksiyonundan korunmadaki rolünü desteklemektedir (Le Rousic ve ark., 2000).

Yenidoğanların BRV enfeksiyonundan korunması için özellikle enfeksiyonun yoğun olarak görüldüğü işletmelerde aşılama programlarının uygulanması önerilmektedir. Rotavirus ishallerinden korunmak için iki şekilde aşılama uygulanmaktadır. Bunlardan birisi, modifiye canlı virus içeren oral aşılar ile yeni doğanların doğum sonrasında hemen aşılanarak aktif immunitenin uyarılması, diğeri ise gebe hayvanların gebeliğin son trimesteri içinde aşılanarak laktogenik immunitenin uyarılmasıdır (Van Opdenbosch ve ark., 1983).

Sahada kullanılan oral aşılar, kolostrumdaki olası antikorların engellemesi sebebiyle fazla etkin değildir. Bu yüzden hastalığın endemik olduğu bölgelerde doğum sonrası oral aşılama uygun bir koruma sağlamaz. Ayrıca modifiye canlı aşılar ile oral olarak aşılanan buzağılarda gaita ile etken saçılımı da bildirilmiştir (Theil ve McCloskey,1995).

Gebe hayvanların parenteral aşılanması ile elde edilen kolostrumdaki spesifik antikorların seviyesi ve sürekliliğinde doğal enfekte bireyler ile karşılaştırıldığında artış gözlenmiştir. Lecce ve King (1982), aşısız gruptaki hayvanlarda hem düşük bir oranda antikor saptamış ve hem de bu antikorların düşük titrede olmasına karşın; aşıli grupta yüksek titrede ve doğum sonrası 120.günde bile saptanabilir seviyede antikor varlığını bildirmişlerdir.

Annelerin doğum öncesi aşılanmaları sonucunda, kolostrum ve sütte yüksek miktarda ve uzun süreli antikor oluşumunun sağlanmasına bağlı olarak yenidoğanlarda enfeksiyon insidensi ve gaita ile etken saçılımında azalma birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (McNulty ve Logan,1987; Snodgrass ve ark.,1980).

Gebe hayvanların aşılanmasında modifiye canlı ve inaktif aşılar kullanılmaktadır. Canlı aşılar ile elde edilen antikor miktarı inaktif aşılarla göre daha fazladır (Radostits,1991).

İnaktif aşılar, genellikle E coli K99, corona ve rotavirusların oluşturduğu kombine aşılar olarak kullanılmaktadır (McNulty ve Logan,1987).

Son yıllarda canlı ve inaktif aşıların yanısıra rekombinant rotavirus aşıları da kullanılmaktadır. Rekombinant aşılar ile aşılanan gebelerden elde edilen kolostrum ile beslenen buzağılarda IgG1 antikorlarının titresinin inaktif aşılarla elde edilenden daha fazla olduğu bildirilmiştir (Fernandez ve ark.,1998). Lee ve ark. (1995) ise, rekombinant VP8* aşısı ile yaptıkları çalışmada oluşan antikor titresinin konvansiyonel aşılarla elde edilen titrele benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ward ve ark. (1990) kullanılan aşıların yanısıra aşılama yolunun da oluşacak immunitede önemli olduğunu; parenteral aşılamalarda VP7'ye karşı oluşan nötralizan antikor miktarının, oral aşılamalarda ise VP4'e karşı oluşan nötralizan antikor miktarının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

1.8. Araştırmanın Amacı

Bu araştırmada, yenidoğan ishalleri buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının sık olarak saptandığı bir sığır yetiştiriciliği işletmesinde bulunan erişkin gebe sığırlarda subklinik BRV enfeksiyonu oranı ve gebeliğin BRV'un saçılmasındaki rolünün ELISA ve PAGE yöntemleri kullanılarak araştırılması ve maternal antikorların yenidoğanların enfeksiyondan korunmasındaki etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1. Araştırma Planı ve Örneklenen Hayvanlar

Bu araştırma sıklıkla yenidoğanlarda BRV enfeksiyonunun görüldüğü bir kamu işletmesinde gerçekleştirildi.

Öncelikle, işletmede bulunan 385 adet sığırdan alınan kan serumu örneklerine BRV antikorü yönünden mikronötralizasyon testi yapılarak, BRV spesifik antikor varlığı saptanan 218 (%54.1) sığırdan 35 adedi araştırma için kullanılmak üzere seçildi. Araştırma iki farklı grup üzerinde sürdürüldü. Bunlardan Grup I ileri gebe 20 sığır ve Grup II ise gebe olmayan 5 adet düve, 5 adet yeni doğum yapmış sığır ve 5 adet suni tohumlanmış ancak gebe olmayan sığırdan oluşturuldu. Araştırmada ayrıca Grup I'deki 20 sığırdan doğan 20 adet buzağı değerlendirildi. Böylece araştırma süresince toplam 55 hayvanın periyodik örneklemeleri yapıldı (Tablo 2.1).

Grup I'i oluşturan sığırlardan, işletme yetkililerinden alınan bilgilere dayanılarak belirlenen doğum tarihleri dikkate alınarak, doğum öncesi birer hafta aralıklarla 3 kez kan ve gaita (2 sığırın doğum öncesi 21.gün örneklemeleri hariç), doğum yaptıkları gün gaita, kan ve kolostrum, doğum sonrası 3. ve 5.günlerde gaita ve kolostrum/süt ve doğum sonrası birer hafta ara ile (7., 14. ve 21. günlerde) 3 kez gaita, kan ve süt örneği olmak üzere toplam 138 adet kan serumu, 178 adet gaita ve 120 adet süt serumu temin edildi (Çizelge 2.2).

Grup I'de bulunan annelerden doğan buzağılardan BRV enfeksiyonuna ilgili klinik bulguların gelişip gelişmediği takip edildi ve tüm buzağılardan doğdukları gün

ve doğum sonrası birer hafta ara ile 3 kez kan ve gaita örnekleri alınarak toplam 79 adet kan serumu ve 79 adet gaita sağlandı (Çizelge 2.2).

Grup II'yi oluşturan seropozitif gebe olmayan hayvanlardan, örneklemelerin yapıldığı 14 hafta boyunca birer hafta ara ile (1 sığırın son 3 örnekleme hariç) 15 kez olmak üzere toplam 222 adet gaita ve 222 adet kan serumu toplandı.

Materyal toplama sırasında erişkin sığırlarda ishal gözlenmedi. Buna karşın 3 adet buzağıda örneklemelerin 7. gününde ishal bulguları, 3 adet buzağıda ise örneklemelerin 7. ve 14. günlerinde anormal görünümlü gaita izlendi. Diğer buzağılara ait gaita örneklerinde ise hiçbir anormal bulguya rastlanmadı.

Çizelge 2.1. : Araştırmada kullanılan hayvan sayısı

Örneklenen Hayvanlar			Hayvan Sayısı
Erişkin	Grup I		20
	Grup II	Düve	5
		Suni Tohumlanmış	5
		Yeni Doğum Yapmış	5
Buzağı ¹			20
TOPLAM			55

1: Grup I'deki sığırlardan doğan buzağılar

Çizelge 2.2 : Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularından sağlanan materyallerin örnekleme dönemlerine göre dağılımı

	DOĞUM ÖNCESİ			DOĞUM			DOĞUM SONRASI			Toplam
	21.Gün	14.Gün	7.Gün	1.Gün	3.Gün	5.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün	
ANNE	Kan Serumu	18	20	20	20		20	20	20	138
	Gaita	18	20	20	20	20	20	20	20	178
	Süt Serumu			20	20	20	20	20	20	120
YAVRU	Kan Serumu				20		20	20	19	79
	Gaita				20		20	20	19	79

2.1.2. Hücre Kültürü

Virusun üretilmesi, titresinin tespiti ve mikronötralizasyon testi aşamalarında Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültüründen yararlanıldı. Hücre üretme vasatı olarak %10 inaktif fotal serum içeren Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) vasatı kullanıldı.

2.1.3. Virus

Serolojik çalışmalarda Bovine Rotavirus'un Northern Irland 447/75 suşu kullanıldı.

2.1.4. Serum Örnekleri

Araştırma gruplarının oluşturulması için 385 sığırdan; araştırma planına uygun olarak Grup I (138 adet) ve Grup II'de (222 adet) bulunan sığırlar ve yenidoğan buzağlarından (79 adet) kaolinli tüplere alınan toplam 439 adet kan örneğinden ayrılan serumlar, 56 °C de 30 dakika süreyle inaktivasyona tabi tutuldu ve sterilite kontrolü yapıldıktan sonra test aşamasına kadar -20 °C derin dondurucuda saklandı.

2.1.5. Süt Örnekleri

Araştırma planına uygun olarak sığırlardan, steril kapaklı cam tüplere alınan toplam 120 adet süt örneği, 3000 devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra üstte toplanan yağ tabakası steril bir pastör pipetiyle alındı. Yağ tabakasının altındaki sıvı kısım stok tüplerine alınarak 56°C de 30 dakika inaktive edildi ve testte kullanılmaya kadar -20°C de saklandı.

2.1.6. Gaita Örnekleri

Bu çalışmada materyal örnekleme takvimine göre Grup I'de bulunan sığırlardan 178, bunların buzağlarından alınan 79 ve Grup II'de bulunan sığırlardan alınan 222 adet olmak üzere toplam 479 adet gaita örneği steril materyal toplama kaplarına alınarak kısa süre içerisinde laboratuvara nakledildi ve -20 °C'de stoklandı. Bu materyaller etken saçılımının daha yüksek güvenilirlik ile tespit edilebilmesi amacıyla hem ELISA hem de PAGE testi kullanılarak BRV antijeni/nükleik asidi yönünden kontrol edildi.

2.2.Yöntem

2.2.1. Virusun Üretilmesi

Bovine Rotavirus Northern Ireland 75/447 suşu Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültüründe üretildi. Bu amaçla 250 ml'lik şişelerdeki hücre kültürüne 1 ml virus inokule edildi ve 37 °C'lik etüvde 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyondan sonra virus üretme vasatı ilave edilerek, 37 °C'lik etüve kaldırıldı. Her gün doku kültürü mikroskobu ile kontrol edilen hücre kültüründe %90 oranında sitopatik değişiklikler saptanmasını takiben (3. günün sonunda), hücre üretme şişesi -20 °C'lik derin dondurucuya konuldu. Daha sonra 37 °C'lik su banyosunda bekletilen hücre üretme şişesi içindeki materyal santrifüj tüpüne aktararak 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan virus içeren süspansiyon alındı ve 1 ml'lik porsiyonlar şeklinde tüplere paylaştırıldı. Stok virus, kullanılıncaya kadar -80 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

2.2.2. Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Enfeksiyözite Gücünün Belirlenmesi

Virusun enfeksiyözite gücünün belirlenmesi amacıyla Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntem uygulandı.

Virus Eagle's MEM içinde logaritma 10 tabanına göre sulandırıldı. Her sulandırma basamağından mikrotitrasyon tabletinin aynı sırada bulunan dört gözüne 0,1 ml konuldu. Virus kontrol amacıyla dört göze serumsuz Eagle's MEM vasatından 0,05 ml ve saf virustan 0,05 ml; hücre kontrol amacıyla ayrılan dört göze ise %10 oranında fetal serum içeren Eagle's MEM vasatından 0,1 ml konuldu. Daha sonra gözlere 0,05 ml MDBK hücre süspansiyonundan (300.000 hücre/ml) damlatılarak, mikrotitrasyon tabletleri 37 °C'lik CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Tabletler doku kültürü mikroskobu ile 7 gün süresince kontrol edildi. Bu süre sonunda virus titresi Kaerber'in (1964) bildirdiği metotla hesaplandı.

2.2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bu amaçla ticari ELISA kiti (Microgen Bio Products, Rotascreen II EIA, U.K.) kullanıldı.

Test, üretici firmanın belirttiği yönetime göre yapıldı. Araştırma planına uygun olarak alınan gaita örnekleri ELISA testinde numune hazırlamakta kullanılan materyal sulandırma sıvısı ile 1/10 oranında sulandırılarak 3 dakika vortex'te çevrilip homojen hale getirildi. Daha sonra 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek, üstte kalan kısımdan her örnek için bir göz olacak şekilde kit tabletinin gözlerine konuldu. İki göze ticari kit içinde bulunan pozitif kontrol solüsyonundan 0,05 ml, iki göze ise negatif kontrol amacıyla materyal sulandırma sıvısından 0,05 ml damlatıldı. Daha sonra tüm gözlere birer damla konjugat konuldu. 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra yıkanan tablet gözlerine ikişer damla substrat ilave edildi ve tabletler oda ısısında 20 dakika bekletildi. Süre sonunda reaksiyon stopping solüsyon ile durduruldu

ve sonuçlar ELISA test okuyucusunda 450 nm dalga boyuna sahip filtre kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

2.2.4. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Testi

Test başlıca 3 aşamada gerçekleştirildi. BRV nükleik asidinin ekstraksiyonu ve polyacrylamid gel kullanılarak elektroforez için Herring ve ark. (1982), gümüş nitrat boyama amacıyla da Sammons ve ark.(1981)'nın bildirildiği yöntemlerden yararlanıldı.

2.2.4.1. BRV Nükleik Asidinin Ekstraksiyonu

BRV nükleik asidinin ekstraksiyonu amacıyla; gaita örnekleri %1 Sodium dodesil sülfat (SDS) içeren 0,1 M Na-asetat tamponu (pH 5,0) içinde 1:4 oranında sulandırıldı. Bu karışıma eşit hacimde 8-hidroksikinolin içeren Fenol-Kloroform karışımı (3:2,v/v) ilave edilerek, 1 dakika süreyle karıştırıldı. Daha sonra emülsiyon halindeki karışım 10 dakika 2000 devirde santrifüj edildi ve üst kısım alınarak %0,2 Bromfenol mavisi içeren %25'lik sukroz ile karıştırılarak PAGE için hazır hale getirildi.

PAGE' de pozitif kontrol olarak MDBK hücre hattında üretilen BRV Northern Irland 75/447 suşu kullanıldı. Virusa ait sitopatik etki %80 düzeyine ulaşınca, 3 kez dondurulup çözödürölen süspansiyon (0,45ml), SDS (0,05ml) ve fenol-kloroform (0,5ml) ile karıştırılarak, gaita örnekleri için yukarıda bildirilen basamaklara tabi tutuldu.

2.2.4.2. PAGE

Hazırlanan materyaller viral nükleik asidin tespiti için, %7,5 olacak şekilde hazırlanan poliakrilamid jele (akrilamid:bisakrilamid, 37,5:1) özel enjektör yardımıyla 0,04 ml

hacimde konuldu. Numunelerin yerleştirilmesi sırasında komşu kuyucuklara karışma olmamasına özen gösterildi. Jel ve elektrot tamponu olarak 36 mM Tris-HCl 30 mM Na_2HPO_4 -1 mM EDTA (pH 7,8) kullanıldı. Elektroforez işlemi +4 °C'de 20 miliAmper' de 16 saat süreyle gerçekleştirildi. Süre sonunda özenle küvet içine alınan jel gümüş boyamaya tabi tutuldu.

2.2.4.3. Gümüş Nitrat Boyama

Bu amaçla jel, %10 etanol ve %0,5 asetik asit karışımında 30 dakika süreyle fikze edildikten sonra, 20 dakika 10 mM AgNO_3 içinde bekletildi. Jelin distile su ile yıkanmasını takiben bantların gözle görülebilir hale gelmesi için 0,1 M formaldehit içeren 0,75 M NaOH jele muamele edildi. Kısa sürede şekillenen bantların netleşmesi için 10 dakika bekletildikten sonra karışıma 70 mM Na_2CO_3 ilave edilip reaksiyon tamamlandı. Jel fotoğrafı çekilene kadar distile suda +4 °C'de saklandı.

2.2.5. Serum Nötralizasyon Testi

Örneklenen kan ve süt serumlarında rotavirus spesifik nötralizan antikorların araştırılması amacıyla Frey ve Liess (1971)'in bildirdiği yöntemle göre mikronötralizasyon testi uygulandı.

Rotavirus antikor varlığı araştırılacak olan kan ve süt serumları 1/5 oranında sulandırıldı. Her bir serum için mikronötralizasyon tabletinde iki göz ayrıldı. Bu gözlere 0,05 ml serum sulandırması konulduktan sonra üzerlerine titresi bilinen virus 100DKID₅₀ ($10^{-3.70}/0.05\text{ml}$) oranında sulandırılarak, 0,05 ml ilave edildi. Virus kontrol için ayrılan gözlere 0,05 ml serumlu Eagle's MEM, 0,05 ml 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış virus, hücre kontrol için ayrılan gözlere 0,1 ml serumlu Eagle's MEM konuldu. Tabletler 37 °C'lik CO_2 'li etüve kaldırılarak, bir saat inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tablet gözlerine MDBK hücre süspansiyonundan (300.000

hücre/ml) 0,05 ml konuldu. Tabletler 37°C'lik CO₂'li etüve kaldırıldı. 3 gün süresince hücrelerde oluşan sitopatik değişiklikler doku kültürü mikroskobu ile incelenerek serumlar antikor varlığı yönünden değerlendirildi.

2.2.6 Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN₅₀) Değerinin Mikronötralizasyon Yöntemi ile Saptanması

Rotavirus antikorlarının varlığı saptanan kan serumlarının antikor titresinin saptanması amacıyla, kan/süt serum örneklerinin iki basamaklı sulandırılmalarına uygulanan mikronötralizasyon testinden yararlanıldı.

Seropozitif oldukları tespit edilen serum örnekleri 1/5 oranındaki sulandırmadan başlamak üzere iki katlı olarak sulandırıldı. Bu amaçla, mikronötralizasyon tabletlerinin birinci sırasında her serum için iki göz ayrılarak, 1/5 sulandırılmış serumlardan bu gözlere 0,1 ml konuldu. İlk sıranın altında kalan gözlere 0,05 ml Eagle's MEM vasatı konulduktan sonra birinci sıradan alt gözlere 0,05 ml serum sulandırmaları aktararak serumların 1/640 a kadar (1/5,1/10,.....,1/640) sulandırmaları hazırlandı. Bu işlemden sonra tüm gözlere titresi bilinen virustan (100DKID₅₀= 10^{-3.70} /0,05ml) 0,05 ml ilave edildi. Virus kontrol için ayrılan gözlere 0.05 ml serumsuz Eagle's MEM, 0,05 ml 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış virus, hücre kontrol için ayrılan gözlere 0,1 ml serumlu Eagle's MEM konuldu. Tabletler 37 °C'lik CO₂'li etüvde bir saat süreyle nötralizasyon için inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tablet gözlerine MDBK (300.000 hücre/ml) hücre süspansiyonundan 0,05 ml konuldu. Tabletler 37 °C'lik CO₂'li etüve kaldırılarak, tabletlerin gözlerindeki hücrelerde oluşan sitopatik değişiklikler 3.günde doku kültürü mikroskobu ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Virusun Üretilmesi

BRV Northern Irland 75/447 suşunun, MDBK hücre kültürüne yapılan inokulasyonunu izleyen 72 saat içinde karakteristik sitopatik değişiklikler gözlemlendi.

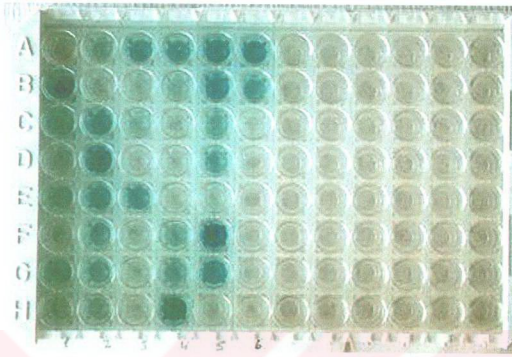
3.2. Virusun Enfeksiyözite Gücü

Bu çalışmada kullanılan bovine rotavirus Northern Irland 75/447 suşunun enfeksiyözite gücü $10^{-6.00}/0,1$ ml olarak hesaplandı.

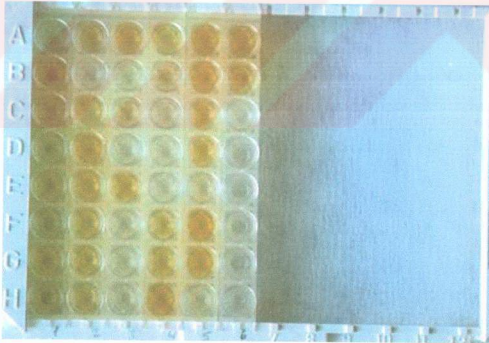
3.3. ELISA

Saha çalışması sırasında alınan, Grup I'i oluşturan annelere ait 178, bu annelerden doğan buzağılara ait 79 ve Grup II'yi oluşturan gebe olmayan hayvanlara ait 222 olmak üzere, toplam 479 adet gaita örneğinin ELISA ile kontrolü sonucunda, 28 adet gaita örneğinde rotavirus antijeni saptandı (Resim 3.1 ve 3.2).

Materyal sağlanan erişkin sığırlar (Grup I ve Grup II) ile buzağılar için ELISA test sonuçları 3.3.1 ve 3.3.2'de ayrı ayrı bildirildi.



Resim 3.1 : ELISA sonuçları (Reaksiyon durdurulmadan önce)



Resim 3.2 : ELISA sonuçları (Reaksiyon durdurulduktan sonra)

3.3.1. Erişkin Sığırlara Ait ELISA Sonuçları

ELISA testi sonuçlarına göre; ileri gebe sığırların bulunduğu Grup I'deki 20 anneden 6 (%30) adedinde, değişik örnekleme zamanlarında alınan gaita örneklerinde BRV antijeni varlığı saptandı (Çizelge 3.1). Bunlardan iki adedi (olgu-I ve olgu-XVII) doğum öncesi 7. günde, birisi doğum öncesi 7. günde de pozitif olmak üzere 2 adedi (olgu-XII ve olgu-XVII) doğum yaptıkları gün, bir adedi (olgu-IV) doğum sonrası 7. günde, iki adedi de (olgu-VI ve olgu-XIV) doğum sonrası 14. günde alınan gaita örneklerinde BRV antijeni yönünden pozitif bulundu (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1: Grup I'de BRV antijeni tespit edilen annelerin sayısı

	Doğum Öncesi Dönem			DOĞUM			Doğum Sonrası Dönem		
	21.Gün	14.Gün	7.Gün	1.Gün	3.Gün	5.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün
Anne	-	-	2	2*	-	-	1	2	-

* 1 adedi doğum öncesi 7. günde de antijen pozitif

Gebe olmayan hayvanlardan oluşturulan Grup II'deki 15 adet sığırdan 1 düvenin gaitasında, örneklemelerin yapıldığı 4.haftada BRV antijeni tespit edildi. Bu grubu oluşturan diğer sığırların hiçbirinin gaitasında BRV antijeni saptanmadı.

3.3.2. Buzağılara Ait ELISA Sonuçları

Grup I'deki sığırlardan doğan 20 adet buzağının 18 adedinde (%90) ve bu buzağılardan periyodik örneklemelerle sağlanan toplam 79 gaita örneğinin 20 adedinde (%25.3) BRV antijeni tespit edildi. BRV saptanan buzağılardan 3 adedi, doğum öncesi 7.günde ve doğum yaptıkları gün alınan gaita örneklerinde BRV antijeni tespit edilen annelerden doğan buzağılardı (olgu-I, olgu-XII ve olgu-XVII) (Çizelge 3.2).

BRV antijeni tespit edilen 18 buzağıdan 16'sı 7.gün örneklemelerinde, 2'si ise 14.gün örneklemelerinde pozitif bulunmuş olup, buzağılar için ilk enfeksiyon yaşı 7.gün (Çizelge 3.2), ortalama enfeksiyon yaşı ise 7,9.gün olarak bulundu.

Çizelge 3.2: Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularına ait ELISA sonuçları

Olgu No		DOĞUM	ÖNCESİ	DÖNEM	DOĞUM			DOĞUM	SONRASI	DÖNEM
		21.Gün	14.Gün	7.Gün	1.Gün	3.Gün	5.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün
I	A		-	+	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
II	A		-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
III	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+ ¹	-	-
IV	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	B				-			-	+	-
V	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
VI	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	B				-			-	-	-
VII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
VIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			-	-	-
IX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
X	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			-	+ ²	-
XI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XII	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	B				-			+ ¹	+	-
XIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XIV	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	B				-			+	+	-
XV	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+ ²	-	-
XVI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+ ²	-	-
XVII	A	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XVIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XIX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+ ¹	-	-

A : Anne

B : A'nın yavrusu

1 : İşhalli gaita

2 : Anormal görünümülü gaita

Çizelge 3.2 incelendiğinde, ELISA testi ile BRV antijeni tespit edilen buzağılardan 3 adedinde (olgu-III, olgu-XII ve olgu-XX) tipik rotavirus buzağı ishali, 3 adet buzağıda ise (olgu-X, olgu-XV ve olgu-XVI) sulu, sarı renkli ishal olmayan anormal gaita varlığı belirlendi.

Anne ve yavrulara ait veriler (Çizelge 3.2) bir arada değerlendirildiğinde ise; doğum öncesi ve doğumun 1.gününde antijen saçıcı annelere (olgu-I, olgu-XII ve olgu-XVII) ait yavruların tümünün BRV ile enfekte olduğu saptandı.

3.4. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Testi

Erişkin sığırlar (Grup I ve Grup II) ile buzağılardan sağlanan toplam 479 adet gaita örneğine yapılan PAGE testi sonucunda 18 gaita örneğinde BRV nükleik asidi tespit edildi.

3.4.1. Erişkin Sığırlara Ait PAGE Testi Sonuçları

İleri gebe 20 sığır (Grup I) ile kontrol grubu olarak değerlendirilen 15 sığırdan (Grup II) örnekleme dönemleri boyunca sağlanan toplam 400 adet gaita örneğinin tümü PAGE ile yapılan kontrolde BRV nükleik asidi yönünden negatif bulundu (Çizelge 3.3).

3.4.2. Buzağılara Ait PAGE Testi Sonuçları

Grup I'de bulunan sığırlardan doğan 20 adet buzağının 18 adedinde (%90); bu buzağılardan örnekleme dönemleri süresince sağlanan toplam 79 adet gaita örneğinin 18 (%22,7) adedinde PAGE ile BRV nükleik asidi tespit edildi (Çizelge 3.3).

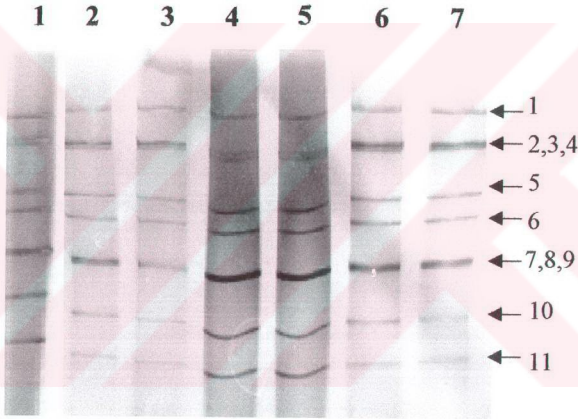
Çizelge 3.3: Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularına ait PAGE testi sonuçları

Olgu No		DOĞUM ÖNCESİ DÖNEM			DOĞUM			DOĞUM SONRASI DÖNEM		
		21.Gün	14.Gün	7.Gün	1.Gün	3.Gün	5.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün
I	A		-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
II	A		-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
III	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
IV	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			-	+	-
V	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
VI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			-	-	-
VII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
VIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			-	-	-
IX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
X	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			-	+	-
XI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XIV	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XV	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XVI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XVII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XVIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XIX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-
XX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B				-			+	-	-

A : Anne

B : A'nın yavrusu

Elde edilen PAGE kalıpları incelendiğinde, BRV pozitif numunelerin 11 RNA segmentine sahip A tipi rotavirus oldukları saptandı (Resim 3.3).



Resim 3.3: PAGE testi pozitif materyaller.

Hat 1, BRV Northern Ireland 75/447

Hat 2-7, Sürüde tespit edilen BRV-RNA pozitif gaitalar.

3.5. ELISA ve PAGE Testi Sonuçlarının Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, PAGE ile pozitif bulunan materyallerin tümü ELISA pozitif bulunurken, ELISA pozitif 10 materyalde PAGE ile viral nükleik asit tespit edilemedi (Çizelge 3.4).

Araştırma planına uygun olarak alınan erişkin sığırlara ait toplam 400 adet gaita örneğinden , Grup I'i oluşturan annelerden 6'sına ait 7 örnekte ve Grup II'yi oluşturan gebe olmayan hayvanlardan 1 adet düveye ait 1 örnekte olmak üzere, toplam 8 numunede ELISA ile BRV antijeni tespit edilirken, bu materyallerin tümü PAGE ile yapılan kontrolleri sonucu BRV nükleik asidi yönünden negatif bulundu.

Grup I'deki annelerden doğan 20 adet buzağıya ait toplam 79 adet gaita örneğinden, 7. günde BRV enfekte 16 adet buzağı ve 14. günde BRV enfekte 2 adet buzağıya ait gaita numunelerinin hepsi BRV antijeni ve nükleik asidi yönünden pozitif bulundu. Hem 7. günde hem de 14. günde bir hafta aralıklarla iki kez BRV enfekte olduğu saptanan 2 buzağıya ait gaita örnekleri 7. günde ELISA ve PAGE ile pozitif sonuç verirken, bu hayvanlara ait 14.gün örnekleri sadece ELISA ile pozitif olarak saptandı (olgu-XII ve olgu-XIV).

Sonuç olarak ELISA ve PAGE testleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; enfeksiyonun erken dönemlerindeki buzağılarda BRV enfeksiyonunun saptanmasında ELISA ve PAGE'in benzer olduğu ancak erişkin sığırların subklinik enfeksiyonunun saptanmasında ve buzağılarda enfeksiyonun ileri dönemlerindeki teşhisinde ELISA'nın daha yüksek duyarlılıkta olduğu görüldü.

Çizelge 3.4: Grup I'deki sığırlar ile bunların yavrularına ait ELISA ve PAGE Testi sonuçları

Olgu No		DOĞUM ÖNCESİ DÖNEM						DOĞUM						DOĞUM SONRASI DÖNEM					
		21.Gün		14.Gün		7.Gün		1.Gün		3.Gün		5.Gün		7.Gün		14.Gün		21.Gün	
		E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P
I	A			-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
II	A			-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
III	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
IV	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	B							-	-					-	-	+	+	-	-
V	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
VI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	B							-	-					-	-	-	-	-	-
VII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
VIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					-	-	-	-	-	-
IX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
X	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					-	-	+	+	-	-
XI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
XII	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	+	-	-	-
XIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
XIV	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	B							-	-					+	+	+	-	-	-
XV	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
XVI	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
XVII	A	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
XVIII	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
XIX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-
XX	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B							-	-					+	+	-	-	-	-

E : ELISA testi sonucu

A : Anne

P : PAGE testi sonucu

B : A'nın yavrusu

3.6. Serum Nötralizasyon Testi :

Araştırma gruplarının oluşturulması için örneklenen toplam 385 sığırdan 218 adedinde (%54,1) BRV spesifik antikor varlığı saptandı. Araştırma planına göre örneklenen Grup I'yi oluşturan annelere ait 138 adet, Grup II'yi oluşturan gebe olmayan sığırlara ait 222 adet ve I. gruptaki annelerden doğan buzağılara ait 79 adet olmak üzere toplam 439 adet kan serumu ile Grup I'de bulunan sığırlardan alınan 120 adet kolostrum/süt örneğinin BRV spesifik antikorlar yönünden kontrolü sonuçları, örneklenen hayvanlar ve materyallere göre 3.6.1 ve 3.6.2'de sunuldu.

3.6.1. Erişkin Sığırlara (Grup I ve Grup II) Ait Kan Serumu Sonuçları

Grup I'de yer alan sığırlara ait kan serumlarında BRV spesifik antikor titreleri örnekleme zamanlarına göre değerlendirildiğinde, 2 sığırdan (olgu-I ve olgu-IV) kan serumu antikor titrelerinde değişiklik tespit edildi (Çizelge 3.5). Bunlardan olgu-I doğum öncesi 7. günde, olgu-IV ise doğum sonrası 7. günde antijen tespit edilen sığırlardı (Çizelge 3.2). BRV antijeni tespit edilen diğer 4 annenin kan serumu antikor titrelerinde örnekleme dönemi boyunca bir değişiklik belirlenemedi (Çizelge 3.5).

Grup I'deki sığırların örnekleme dönemlerine göre bireysel BRV spesifik antikorları ve örnekleme dönemlerine göre geometrik ortalamaları da Çizelge 3.5'te sunuldu.

Çizelge 3.5: Grup I'deki sığırların kan serumu antikor titreleri ve örnekleme dönemlerine göre geometrik ortalamaları

	Doğum	Öncesi	Dönem	DOĞUM	Doğum	Sonrası	Dönem
Olgu No	21.Gün	14.Gün	7.Gün	1.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün
I		1/14.2	1/20	1/5.6	1/10	1/56.2	1/56.2
II		1/14.2	1/10	1/14.2	1/20	1/20	1/28.2
III	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/20	1/20	1/20
IV	1/20	1/14.2	1/14.2	1/10	1/14.2	1/80	1/640
V	1/40	1/56.2	1/56.2	1/80	1/80	1/80	1/112
VI	1/14.2	1/14.2	1/10	1/10	1/5.6	1/5.6	1/5.6
VII	1/20	1/20	1/14.2	1/28.2	1/14.2	1/20	1/20
VIII	1/10	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/10
IX	1/28.2	1/14.2	1/20	1/40	1/28.2	1/40	1/56.2
X	1/14.2	1/14.2	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/20	1/20
XI	1/112	1/160	1/160	1/112	1/320	1/160	1/80
XII	1/5.6	1/5.6	1/14.2	1/14.2	1/5.6	1/5.6	1/14.2
XIII	1/20	1/20	1/20	1/20	1/14.2	1/14.2	1/20
XIV	1/160	1/80	1/40	1/40	1/40	1/40	1/28.2
XV	1/80	1/80	1/80	1/56.2	1/160	1/160	1/160
XVI	1/5.6	-	-	-	-	-	-
XVII	1/10	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/10	1/5.6
XVIII	1/40	1/28.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/10
XIX	1/56.2	1/112	1/112	1/112	1/160	1/112	1/112
XX	1/40	1/40	1/40	1/28.2	1/40	1/40	1/40
GEOMETRİK ORTALAMA	1/24.5	1/23.8	1/21.7	1/21.1	1/22.8	1/29.6	1/33.0

Grup II'yi oluşturan düvelerden 14 hafta boyunca 15 kez alınan kan serumlarındaki BRV antikor düzeyinde önemli bir değişiklik tespit edilemedi. Ancak doğum yapmış ve suni tohumlanmış grupta yer alan birer sığırdı (Sıra no 9 ve 11) örnekleme dönemleri itibariyle antikor seviyesinde değişiklikler belirlendi (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6: Grup II'deki sığırların kan serumu antikor dağılımı

Sıra No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
* 1	1/14.2	1/20	1/14.2	1/14.2	1/5.6	1/10	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/14.2	1/14.2	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/14.2
* 2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/28.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/20	1/28.2	1/20	1/20	1/14.2	1/20	1/14.2
* 3	1/10	1/10	1/14.2	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/10	1/5.6	1/5.6	1/5.6	1/14.2	1/5.6	1/5.6
* 4	1/10	1/20	1/20	1/20	1/28.2	1/40	1/40	1/20	1/20	1/20	1/40	1/40	1/28.2	1/160	1/160
* 5	1/5	-	-	-	-	-	1/14.2	1/28.2	1/14.2	1/10	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2
** 6	1/5.6	1/10	1/10	1/5.6	1/14.2	1/14.2	1/10	1/14.2	1/10	1/14.2	1/28.2	1/14.2	1/20	1/14.2	1/14.2
** 7	1/5.6	1/10	1/5.6	1/5.6	1/14.2	1/14.2	1/5.6	1/10	1/10	1/5.6	1/10	1/14.2	1/20	1/14.2	1/14.2
** 8	1/5.6	1/10	1/5.6	1/10	1/5.6	1/20	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/20	1/14.2	1/20	1/20	1/28.2
** 9	1/5.6	1/14.2	1/14.2	1/28.2	1/160	1/160	1/160	1/160	1/160	1/160	1/160	1/160	1/80	1/80	1/80
** 10	1/20	1/20	1/10	1/14.2	1/20	1/20	1/10	1/20	1/20	1/28.2	1/14.2	1/20	1/28.2	1/20	1/20
*** 11	1/20	1/20	1/14.2	1/5.6	1/160	1/160	1/160	1/160	1/224	1/160	1/160	1/224	1/160	1/160	1/160
*** 12	1/20	1/20	1/28.2	1/80	1/80	1/112	1/80	1/224	1/224	1/80	1/80	1/160	1/160	1/160	1/160
*** 13	1/14.2	1/10	1/20	1/28.2	1/28.2	1/28.2	1/28.2	1/40	1/40	1/28.2	1/28.2	1/28.2	1/28.2	1/40	1/40
*** 14	1/40	1/14.2	1/28.2	1/28.2	1/14.2	1/28.2	1/20	1/20	1/28.2	1/20	1/40	1/20	1/40	1/20	1/28.2
*** 15	1/14.2	1/10	1/14.2	1/20	1/28.2	1/20	1/20	1/20	1/28.2	1/14.2	1/14.2	1/20	1/28.2	1/14.2	1/20

* : Dİve

** : Yeni doğum yapmış sığır

*** : Suni tohumlanmış sığır

Grup II'de bulunan sığırların 1 hafta aralıklar ile periyodik örneklemelerine ilgili antikor titrerinin geometrik ortalamaları ise Çizelge 3.7'de sunuldu. Grup II'yi oluşturan, gebe olmayan, sığırlara ait kan serumlarının test sonuçları (Çizelge 3.7) değerlendirildiğinde, her bir örnekleme dönemi için düve, yeni doğum yapmış ve suni tohumlanmış sığırlarda antikor titrerinin benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 3.7: Grup II'deki sığırların kan serumu antikor titrerinin geometrik ortalama değerleri

	HAFTALAR														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
*	1/10	1/8.9	1/8.9	1/9.1	1/6.6	1/7.9	1/12	1/12	1/12	1/13	1/15	1/12	1/13	1/17	1/19
**	1/7.2	1/12	1/8.5	1/10	1/20	1/26	1/16	1/22	1/21	1/22	1/26	1/21	1/30	1/26	1/28
***	1/20	1/14	1/20	1/37	1/43	1/49	1/43	1/56	1/69	1/40	1/46	1/52	1/65	1/49	1/56

* : Düve

** : Yeni doğum yapmış sığır

*** : Suni tohumlanmış sığır

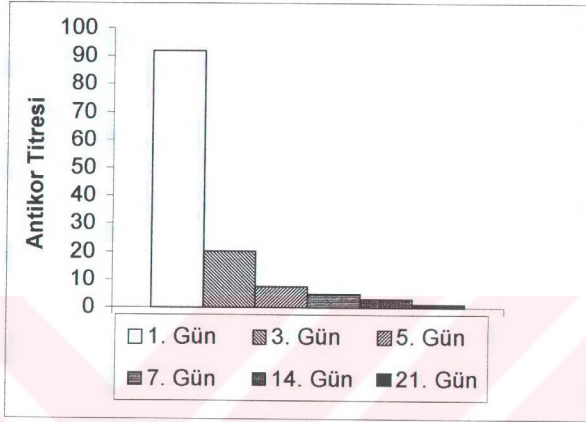
3.6.2. Kolostrum/ Süt Serumı Sonuçları

Grup I'i oluşturan annelerden elde edilen toplam 120 adet kolostrum/süt örneğindeki BRV spesifik antikorların SN_{50} değerleri ve örnekleme dönemleri itibariyle geometrik ortalamaları Çizelge 3.8 ve Grafik 3.1'de sunuldu.

Çizelge 3.8 : Kolostrum/süt örneklerinde BRV spesifik antikor titreleri ve örnekleme dönemlerine göre geometrik ortalamaları

Olgu No	DOĞUM SONRASI					
	1.Gün	3.Gün	5.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün
I	1/40	1/5.6	1/5	1/5	-	-
II	1/40	1/14.2	1/5	1/5	1/5	-
III	1/40	1/28.2	-	-	-	-
IV	1/640	1/80	1/56.2	1/20	1/14.2	-
V	1/320	1/160	1/80	1/28.2	1/14.2	1/10
VI	1/14.2	1/14.2	1/5.6	-	-	-
VII	1/28.2	1/14.2	-	-	-	-
VIII	1/224	1/40	1/56.2	1/28.2	1/5.6	-
IX	1/40	1/14.2	1/5	1/5	1/5	-
X	1/40	1/5.6	1/5.6	1/5	-	-
XI	1/80	1/14.2	1/14.2	1/5.6	-	-
XII	1/20	-	-	-	1/5	-
XIII	1/112	1/40	-	-	1/5	-
XIV	1/640	1/28.2	1/14.2	1/10	1/10	1/5
XV	1/640	1/160	1/80	1/40	1/20	-
XVI	1/40	1/14.2	1/20	1/5.6	1/5.6	-
XVII	1/28.2	1/14.2	-	-	-	-
XVIII	1/56.2	1/14.2	1/14.2	1/5.6	-	-
XIX	1/320	1/80	1/14.2	1/20	1/14.2	-
XX	1/640	1/10	1/5.6	1/5.6	-	-
GEOMETRİK ORTALAMA	1/91.7	1/20.0	1/7.5	1/4.9	1/3.2	1/2.1

Grafik 3.1 : Annelerin doğum sonrası kolostrum/süt örneklerindeki antikor titreleri



Grafik 3.1 incelendiğinde, kolostrumdaki antikor seviyesinin doğumun 1.gününe oldukça yüksek olduğu (1/91,7) ve sonrasında belirgin bir azalma (3,5,7,14 ve 21.günlerde sırayla 1/20,0, 1/7,5, 1/4,9, 1/3,2 ve 1/1,2) gösterdiği saptandı.

3.6.3. Buzağılara Ait Kan Serumı Sonuçları

Buzağılara ait serolojik veriler değerlendirildiğinde ise, doğumun 1.gününe alınan 20 adet buzağı kan serumunun 16 adedinde antikor varlığı saptandı. BRV spesifik antikor varlığı saptanamayan 2 buzağının (olgu-XIX ve olgu-XX) örnekleri doğum sonrası 2 saat içinde alınmıştı. BRV için ilk enfeksiyon yaşı olarak belirlenen 7.günde, iki buzağı dışındaki buzağıkların kan serumlarında 1:5-1:640 arasında değişen antikor titreleri saptandı (Çizelge 3.9).

Buzağuların bireysel kan serumu BRV spesifik antikor titreleri ile BRV spesifik antikorların örnekleme zamanına göre geometrik ortalamaları Çizelge 3.9'da sunuldu. Çizelge 3.9 incelendiğinde; 1. ve 7. günlerde sağlanan kan serumu örneklerindeki antikor titrelerinin daha sonraki örnekleme zamanlarında azalma gösterdiği tespit edildi.

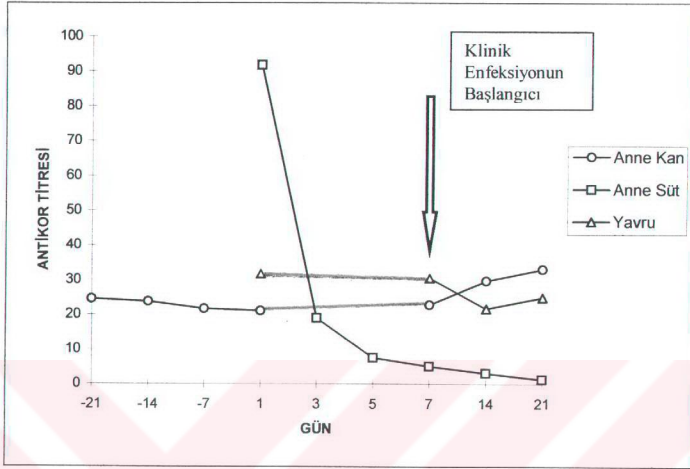
Çizelge 3.9: Buzağuların kan serumu antikor titreleri ve örnekleme dönemlerine göre geometrik ortalamaları

Olgu No	1.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün
I	1/20	1/14.2	1/14.2	1/14.2
II	1/28.2	1/28.2	1/20	1/20
III	1/14.2	1/14.2	1/14.2	1/14.2
IV	1/224	1/224	1/160	1/224
V	1/14.2	1/14.2	1/5.6	1/5.6
VI	1/10	1/5.6	-	-
VII	1/28.2	1/5	1/5	-
VIII	1/160	1/80	1/28.2	1/40
IX	1/56.2	1/40	1/40	1/40
X	1/5.6	1/20	1/14.2	1/14.2
XI	1/28.2	1/20	1/20	1/14.2
XII	1/10	-	1/5.6	-
XIII	-	1/5.6	1/5.6	1/5.6
XIV	1/160	1/80	1/28.2	1/40
XV	1/160	1/640	1/640	1/160
XVI	-	-	-	-
XVII	1/10	1/5.6	1/5.6	1/5.6
XVIII	1/40	1/14.2	1/14.2	1/14.2
XIX	- ¹	1/160	1/112	1/112
XX	- ¹	1/224	1/40	1/40
GEOMETRİK ORTALAMA	1/31.7	1/30.5	1/21.7	1/24.8

1: Kan örnekleri yaşamın 2. saati içinde alındı

Grup I'deki sığırların kolostrum/süt, kan serumu örnekleri ile bunlardan doğan buzağuların kan serumu örneklerinin antikor titrelerinin geometrik ortalamalarının örnekleme günlerine göre dağılımı ve buzağularda ilk enfeksiyon yaşına ilgili veriler Grafik 3.2'de sunuldu.

Grafik 3.2: Annelerin kan-süt ve yavruların kan serumu antikor titreleri dağılımı



Grafik 3.2 incelendiğinde; annelerin ve buzağuların kan serumu antikor titrelerinin düşük olduğu görüldü.

Annelerin kan ve süt serumu antikorlarının geometrik ortalamaları karşılaştırıldığında; 1.günde kolostrumdaki antikor seviyesinin (geometrik ortalama değeri 1/91,7) kan serumundaki antikor seviyesinden (geometrik ortalama 1/21,1) yaklaşık 4 kat fazla olduğu, ilerleyen günlerde ise kolostrum/süt örneklerinde antikor seviyesinin hızla azaldığı belirlendi.

Grafik 3.2'de görüldüğü üzere, kolostrum/sütteki antikor titrelerinin doğum sonrası 3. gün ve sonrasında önemli düzeyde azalması ile buzağılarda enfeksiyon tespiti zamanı arasında korelasyon tespit edildi.

4.TARTIŞMA

Yenidoğan buzağılarda ishal ile karakterize enfeksiyonlar içinde en sık rastlanılan rotavirus enfeksiyonudur. Yenidoğan buzağılarda rotavirusların neden olduğu salgınlar gaitada rotavirusun uzun süre varlığını sürdürmesi ile sürüye yeni hayvan girmesi gibi nedenlere bağlı olarak bildirilmiştir (Garcia-Sanchez ve ark.,1993; Kodituwakku ve Harbour,1990; Murakami ve ark.,1987; Woode ve Bridger,1975).

Rotavirus enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde, klinik enfekte yada sağlıklı görünen enfekte yenidoğanların yanısıra özellikle gebeliğin geç dönemlerindeki yada yeni doğum yapmış subklinik enfekte erişkin hayvanların da önemli rol oynayabildiği bildirilmektedir. (Goto ve ark.,1986, Koditiwakku ve Harbour, 1990; Myers ve ark., 1984, Murakami ve ark., 1987).

Kodituwakku ve Harbour (1990) erişkin taşıyıcı sığırlarda rotavirus varlığını, gebelik boyunca aralıklı olarak virus saçıan sığırlarda göstermişlerdir. Araştırmacılar 10 sığırdan 7 ay boyunca birer hafta aralıklarla sağladıkları toplam 229 adet gaita örneğinden 50 adedinde (%21.8) latex aglütinasyon test ile BRV tespit etmişler ve bu hayvanların yenidoğanların klinik enfeksiyonu sonrasında uygulanan dezenfeksiyona rağmen barınakların kontaminasyonunda rol oynayabileceğini ve bir buzağılama sezonundan sonraki sezona kadar virusun devamlılığında önemli rol oynadıklarını belirtmişlerdir.

Garcia-Sanchez ve ark.(1993) ise, doğum döneminde örnekledikleri 15 erişkin sığır gaitasında rotavirus tespitini gerçekleştirememişler, ancak bu hayvanların buzağılarının tamamında BRV antijeni tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada, erişkin gebe sığırlardan rotavirus saçılımının araştırılması amacıyla, ileri gebe (8-9 aylık) 20 erişkin sığırdan doğumun 3 hafta öncesinden başlanılarak 1 hafta aralıklar ile yapılan periyodik örneklemelerde, 6 erişkin gebe sığırdaki çeşitli örnekleme dönemlerinde BRV antijeni tespit edilmiştir. Bu 6 erişkin

sığırdan 2 adedinde doğum öncesi 7. günde yapılan örneklemelerde ve birisi doğum öncesi 7. günde antijen saptanan sığır olmak üzere 2 sığırdan da doğum yaptığı gün ve 3 sığırdan doğum sonrası 7 ve 14. günlerde yapılan örneklemelerde BRV saçılımının tespit edilmiş olması, erişkin subklinik enfekte sığırların doğum yaptıkları dönemde hormonal değişikliklere ilgili olarak BRV saçıklarını bildiren çalışmaların verileri ile (Benfield ve ark.,1982; Murakami ve ark.,1987) paralel bulunmuştur. Doğum sonrası 7.günde yapılan örneklemesinde BRV antijeni saptanan olgu-IV A'ya ait serolojik veriler değerlendirildiğinde (Çizelge 3.5); takibeden örneklemelerde antikor seviyesinin (14.gün yapılan örneklemede 1/80, 21.gün yapılan örneklemede 1/640) önemli ölçüde artış gösterdiği görülmektedir. Bu durum buzağılama döneminde oluşan hormonal değişikliklere bağlı olarak virus saçılımının artması sonucunda oluşan tekrarlayan enfeksiyona işaret etmektedir. Bundan başka, sözkonusu sığırlarda sürüde sirküle olan virus ile oluşan yeni bir enfeksiyonun oluşumu da bir diğer alternatiftir. Ancak bu veriler her iki durumda da erişkin enfekte sığırların sağlıklı görünümüne karşın virus saçıcısı olabildiklerini ortaya koymaktadır.

Benzer olarak Grup II.'de bulunan yeni doğum yapmış ve suni tohumlanmış grupta yer alan birer sığırdan (Sıra no 9 ve 11) örnekleme dönemleri itibariyle antikor seviyelerinde oluşan artışlar da (Çizelge 3.6) söz konusu sığırlarda örneklemelerin yapıldığı zamandan kısa bir süre önce gelişen enfeksiyona işaret etmektedir.

Gebeliğin erişkin sığırlarda BRV saçılımı üzerindeki rolünün karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan Grup II de bulunan toplam 15 sığırlardan sadece 1 düvede (%6,6) örneklemelerin yapıldığı 4. haftada BRV antijeni tespit edilmiştir. Bu oran Grup I'de bulunan 20 gebe sığırlardan 6 adedinde buzağılama döneminde enfeksiyonun tespiti oranı (% 30) ile karşılaştırdığında da birçok araştırmacının (Benfield ve ark.1982; Kodituwakku ve Harbour 1990; Murakami ve ark.1987) bildirdiğine paralel olarak gebeliğin erişkin enfekte sığırlarda BRV saçılımını uyaran bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır.

Grup I'de bulunan toplam 20 sığırdan doğan buzağılardan 18 adedinde (%90) BRV enfeksiyonunun varlığı saptanmıştır. Bunlardan 3 adedi doğum öncesi ve doğumun 1.gününde antijen saçıcı annelere ait buzağılardır.

Kodituwakku ve Harbour (1990), yaptıkları periyodik örneklemelelerde aralıklarla BRV saçılımı tespit ettikleri 10 anneden doğan buzağılardan sağladıkları 78 adet gaita örneğinin 10'nda BRV tespit ederek, BRV insidensini %12,8 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise toplam 20 adet buzağıdan sağlanan 79 adet gaita örneğinin 20 (%25,3) adedi BRV antijeni/nükleik asidi yönünden pozitif bulunmuştur.

Erişkin sığırlar ve bunların yavrularına ait veriler (Çizelge 3.2) bir arada değerlendirildiğinde görülmektedir ki; Goto ve ark.(1986)'nın da bildirdiği gibi, BRV enfeksiyonunun devamlılığında sağlıklı görünümlü erişkin saçıcılar önemli rol oynayabilmekte; enfekte anneler genellikle buzağılama sırasında yenidoğan yavrularını enfekte etmekte ve enfekte buzağılar da yüksek miktarda virus saçarak yenidoğanlar ve hatta erişkinler için enfeksiyon kaynağı olmaktadır.

Bulaşma mekanının erişkin sığırlar ile yenidoğan buzağılar arasındaki virus naklinde muhtemelen doğum ünitesi (buzağı ve anne bu üniteye doğum sonrası birkaç gün birarada barındırılıyor); buzağılar arasındaki bulaşmada ise aynı gün doğan buzağıların doğum sonrası 5. güne kadar birarada tutulduğu mekanlar olduğu düşünülmektedir. Materyal temin edilen işletmede buzağıların ayrı ayrı barındırıldığı (5-30 gün) buzağılıkların, her buzağı değişimi sonrasında yetersiz dezenfeksiyonun da bir diğer faktör olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada örneklenen buzağılarda belirlenen BRV oranı (%90) hem erişkin bir tek saçıcı sığırın bile epidemiyolojik açıdan ne kadar önemli olduğunu ve hem de yenidoğan buzağılarda BRV enfeksiyonu riskini ortaya koymasından önemlidir. Nitekim birçok araştırmacı (Fukai ve ark.,1998; Hause,1978; Kaminjolo ve Adesiyun.,1994; Burgu ve ark.,1995; Alkan,1998) yenidoğan buzağılarda BRV

enfeksiyonu oranları ve bu enfeksiyona bağlı ekonomik kayıpların boyutuna dikkati çekmiştir.

Bu araştırmada BRV enfeksiyonu saptanan toplam 18 buzağıdan 16'sı için ilk enfeksiyon yaşı 7. gün; 2 adedi için de 14. gün olarak; BRV tespit edilen tüm olgular için ortalama yaş ise 7,9 gün olarak belirlenmiştir. Bu bulgular gerek ilk enfeksiyon yaşının bildirildiği (Garcia-Sanchez ve ark.,1993; Burgu ve ark.,1995;Alkan,1998) ve gerekse ortalama enfeksiyon yaşının bildirildiği çalışmaların (Garcia-Sanchez ve ark.,1993; Steiner ve ark.,1997; Burgu ve ark.,1995; Alkan,1998) verileri ile paralel bulunmuştur.

Bu çalışmada erişkin sığırlar ve buzağılardan sağlanan gaita örneklerinin, etken saçılımının daha yüksek güvenilirlik ile tespit edilebilmesi amacıyla ELISA ve PAGE tekniklerinden yararlanılarak BRV antijeni/nükleik asidi yönünden kontrolü yapılmıştır. İki yöntemin duyarlılıklarının karşılaştırılması hedeflenmemiş ise de, iki test ile erişkin sığırlarda ve enfeksiyonun farklı dönemlerindeki buzağılarda belirlenen enfeksiyon oranlarında benzerlikler/farklılıkların tespiti üzerinde durulması gereken bir konu olarak değerlendirilmiştir.

Şöyleki; ELISA pozitif bulunan Grup I'deki 6 adet anneye ait 7 örnek ile Grup II'deki 1 adet düveye ait 1 örnek olmak üzere toplam 8 örnekte PAGE ile BRV nükleik asidi tespit edilememiştir. Buzağılarda ise BRV enfeksiyonu varlığı saptanan 18 buzağının tümünde enfeksiyonun tespit edildiği ilk örnekleme döneminde her iki test için duyarlılığın aynı olduğu (%100) saptanmıştır. Buna karşın 7. günde her iki test içinde pozitif sonuç veren 2 buzağının (olgu-XII ve olgu-XIV) 14. gün alınan gaita örneğinde ELISA ile BRV antijeni tespit edilmesine karşın, PAGE ile BRV nükleik asidi saptanamamıştır.

Her ne kadar buzağılarda BRV enfeksiyonlarının tespitinde kullanılan yöntemler arasında duyarlılık farklılığı birçok çalışmada (Garcia-Sanchez ve ark.,1993; Burgu ve ark.,1995) bildirilmiş ise de; bu yöntemlerin erişkin sığırlarda ve buzağılarda

enfeksiyonun farklı zamanlarında yapılan örnekleme dönemleri itibarıyla karşılaştırmalı olarak kullanıldığı çalışmalar sınırlıdır. Bununla birlikte bu çalışmada elde edilen verilere benzer olarak Tazi-Lakhsassi ve ark. (1988)'da , ELISA ve LA ile BRV pozitif örneklerin yalnızca %59'unun PAGE ile pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu durum muhtemelen subklinik BRV enfeksiyonlarının patomekanizması ve bunun sonucu olarak gaita ile saçılan viral nükleik asit miktarının PAGE ile saptanamayacak düzeyde düşük olmasının bir sonucu olarak düşünülmüştür. Nitekim Dodet ve ark.(1997), villus enterositlerinin cryptlerden gelen hücrelerle yer değiştirme hızının yenidoğanlarda yavaş olduğunu bu yüzden virulensi düşük olan rotavirus suşlarının bile hastalığa neden olabileceğini, ancak 8 haftalıktan büyük buzağılar ve erişkinlerde enterosit göçünün daha hızlı olması sebebiyle virus replikasyon oranının daha yavaş şekillendiği ve bu nedenle de ancak virulensi yüksek virus suşlarının enfeksiyon meydana getirebileceğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Bridger ve ark.(1992) da düşük virulensli viruslar ile gelişen enfeksiyonlarda enterositlerdeki sitopatik etkinin de düşük düzeyde geliştiği ve bunun subklinik enfeksiyonlara neden olduğunu belirtmişlerdir.

Erişkin sığırların rotavirus enfeksiyonlarının genellikle sublinik bir seyir izlemesi nedeniyle erişkin sığırlardan virus/viral antijen/nükleik asit tespiti tesadüfi örneklemler sırasında yapılabilmektedir. Ancak serolojik çalışmalara dayanılarak rotavirus enfeksiyonları tüm dünyada erişkin sığırlarda yaygın olarak bildirilmiştir (Chauhan ve Singh,1996; Ciarlet ve ark.,1997; Crouch ve Acres,1984; Steiner ve ark.,1997). Türkiye'de yapılan çalışmalarda da erişkin sığırlarda BRV seroprevalansı %28,3-31,0 olarak tespit edilmiştir (Burgu ve Akça, 1983; Burgu ve ark.,1995). Bu araştırmada çalışma gruplarının oluşturulması için BRV spesifik antikor varlığı araştırılan sığırlarda belirlenen BRV seropozitiflik oranı da (%54,1) daha önceki çalışmalara benzer şekilde, erişkin sığırlarda BRV ile enfeksiyonun yaygınlığını ortaya koymuştur.

Bu araştırmada gebeliğin erişkin enfekte sığırlarda BRV saçılımı üzerindeki etkisi yanısıra maternal bağışıklığın yenidoğan buzağuların enfeksiyondan korunmasındaki rolünün incelenmesi ana amaçlardan birisidir.

Bilindiği üzere subklinik enfekte sığırlar enfeksiyon kaynağı olabildiği gibi, özellikle kolostrum ve süt ile salgıladıkları antikorlar ile de yenidoğanların enfeksiyondan korunmasında önem taşımaktadırlar (Ellens ve ark.,1978; Snodgras ve Wells,1978; Snodgras ve ark.,1980).

Bu çalışmada Grup I de bulunan sığırların doğum zamanındaki ve sonrasındaki örneklem dönemlerinde alınan kan serumumlarında antikor titrelerinin (Çizelge 3.5) oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Buna karşın annelerin kan ve kolostrum/süt serumu antikorlarının geometrik ortalamaları incelendiğinde; 1.gün kolostrumdaki antikor seviyesinin (geometrik ortalama değeri 1/91,7) kan serumundaki antikor seviyesinden (geometrik ortalama 1/21,1) yaklaşık 4 kat fazla olduğu, ilerleyen günlerde ise süt örneklerinde antikor seviyesinin hızla azaldığı görülmüştür. Buzağuların doğdukları gün kan serumu antikor titrelerinin geometrik ortalamaları (1/31,7) ise, annelerinkinden (1/21,1) daha yüksek bulunmuştur. Bu da kolostrum ile alınan ve doğum zamanında yüksek olan (1/91,7) kolostral antikorlardan kaynaklanmaktadır. Nitekim, Kohara ve ark. (1997) da doğum yaptıkları gün antikor titrelerinin geometrik ortalamasını kolostrum için 1/1114, kan serumu için 1/184 olarak buldukları annelerden doğan buzağılarda kan serumu antikor titrelerinin geometrik ortalamasını ise 1/557 olarak bildirmişlerdir.

Buzağılara ait serolojik veriler değerlendirildiğinde, bu çalışmada BRV için ilk enfeksiyon yaşı olarak belirlenen 7. günde, iki buzağı dışındaki buzağuların kan serumlarında 1:5-1:640 arasında değişen antikor titreleri saptanmıştır (Çizelge 3.9). Kan serumunda yüksek düzeyde (1:224-1:640) antikor saptanan bazı buzağılarda (olgu-IV, olgu-XV ve olgu-XX) BRV antijeni ve nükleik asidinin de saptanmış olması, kan serumundaki antikorlar ile enfeksiyondan korunma arasında bir ilişkiyi ortaya koymamış ve bu veri kan serumunda antikor titresi çok yüksek düzeyde

olmadığı sürece yenidoğanların enfeksiyondan korunmasında etkin olmadığını bildiren çalışmalara (Besser ve ark., 1988; Kohara ve Tsunemitsu,2000) paralel bulunmuştur.

Yenidoğanların BRV enfeksiyonundan korunmasında immun annelerden kolostrum/süt ile aktarılan antikorların önemi ise birçok araştırmacı (Bachmann,1984; Snodgrass ve ark.,1980; Van Opdenbosch ve ark.,1983) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada Grup I'de bulunan annelerin kolostrumdaki antikor seviyesinin doğumun 1.gününde yüksek olduğu (1/91,7), 3.gününde (1/20,0) ve sonraki örnekleme dönemlerinde belirgin bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer olarak Woode ve ark.(1975)'da doğum sonrası 2. günden itibaren kolostrumdaki antikor seviyesinin hızla düştüğünü ve kolostral antikor titresinin 1/320'den aşağı olması durumunda, bu kolostrumun buzağuları BRV enfeksiyonuna karşı koruyucu olamayacağını belirtmişlerdir. Lecce ve King (1982) ise, doğum sonrasında sığırların %72'sinde rotavirus spesifik kolostral antikor tespit etmişler, ancak bunların sadece % 38'nde 1:10 titrede antikor saptamışlar, diğerlerinde ise bu değerin altında antikor varlığını bildirmişlerdir.

Bu araştırmada da kolostrumdaki antikor titreleri, doğal enfekte erişkin sığırların kolostrumlarındaki antikor seviyelerinin araştırıldığı birçok çalışmaya (Archambault ve ark.,1988; Fernandez ve ark.,1998; Lecce ve King,1982; Snodgrass ve ark.,1982) benzer şekilde, çok yüksek olarak saptanmamış olmakla birlikte, ilk enfeksiyon yaşının 7. gün olarak saptanmış olması ve BRV antijeni/nükleik asidi saptanan hayvanların da sadece % 15,9'unda (3/18) klinik enfeksiyonun saptanmış olması , muhtemelen düşük düzeyde antikor içeren kolostrum alımının bile en azından klinik enfeksiyondan korunmadaki rolünü ortaya koymaktadır. Bu nedenle maternal aşılama ve buna bağlı olarak artırılmış maternal bağışıklığın enfeksiyondan korunmadaki etkinliğinin belirlenmesi son yıllarda araştırmacıların önemli konuları arasında yer almaktadır (Fernandez ve ark.,1998; Kim ve ark.,2002; Kohara ve ark.,1997). Nitekim Snodgrass (1982), aşı sığırların kolostrumu ile beslenen buzağularda BRV enfeksiyonu insidensinin ve diyarenin şiddetinin aşısız sığırların kolostrumu ile beslenen buzağılara oranla daha az olduğunu bildirmiştir.

Kohara ve ark. (1997) ise aşıllı ve aşısız olmak üzere iki grup gebe sığır ile yaptıkları çalışmada, aşıllı gruptaki sığırların doğum yaptıkları gün kolostrumundaki antikor titresinin geometrik ortalamasını 1/5881, doğum sonrası 2. gün 1/320, 7.gün 1/53 ve 28.gün 1/26 olarak bulmuşlardır. Aşısız grupta ise kolostrum/süt'teki antikor titrelerinin geometrik ortalamalarını ise örnekleme günlerine göre sırayla 1/1114, 1/80, 1/40 ve 1/15 olarak bildirmişlerdir. Aşıllı gruptaki annelerden doğan buzağılardaki BRV oranının %7,8 olduğunu aşısız gruptaki annelerden doğan buzağılarda ise bu oranın %17,4 olduğunu tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak elde edilen veriler, yenidoğan buzağuların BRV nedenli ishal olgularında, erişkin sığırların da bir epidemiyolojik kaynak olarak gözardı edilmemesi gerektiğini ortaya koymuştur. Ayrıca her ne kadar bu çalışmada değerlendirilen doğal enfekte sığırlardan sağlanan kolostrum/süt örneklerindeki antikor titreleri çok yüksek olarak bulunmamış ise de, enfekte buzağılarda klinik enfeksiyon oranının oldukça düşük olduğu dikkate alınarak, doğumu izleyen en kısa sürede yenidoğanların kolostrum almalarının önemini hatırlatmakta yarar görülmüştür. Bundan başka yenidoğanlarda BRV enfeksiyonların yüksek oranda varlığı ve bu hastalığa bağlı ekonomik kayıpların boyutu gözönünde bulundurularak, özellikle entansif sığır yetiştiriciliğinin yapıldığı işletmelerde doğum sonrası hijyenik şartların düzenlenmesi ve yenidoğanlara kolostrum/süt ile aktarılacak antikor miktarının enfeksiyondan koruyacak düzeyde olabilmesi için, gebe sığırların aşılmasının önerilmesi de gerekli görülmektedir. Bu noktada halen Türkiye'de ticari olarak bulunan aşıların saha enfeksiyonlarından korunmadaki etkinliği üzerine yapılacak çalışmaların, Türkiye'de BRV enfeksiyonlarının kontrolü konusunda önemli verileri ortaya koyacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Bu araştırmada, yenidoğan ishalleri buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının sık olarak saptandığı bir kapalı yetiştirmede bulunan erişkin gebe sığırlarda subklinik BRV enfeksiyonu oranı ve gebeliğin BRV'un saçılmasındaki rolü ile maternal antikorların yenidoğanların enfeksiyondan korunmasındaki etkinliği araştırılmıştır.

Bu çalışma ile ulaşılan sonuçlara göre;

- 1) Grup II'de bulunan toplam 15 sığırdan sadece 1 düvede (%6.6) örneklemelerin yapıldığı 4. haftada, Grup I'de ise 20 adet gebe sığırlardan 6 adedinde (%30) buzağılama döneminde enfeksiyonun tespit edilmesi gebeliğin erişkin enfekte sığırlarda BRV saçılımını uyaran bir faktör olduğunu göstermiştir.
- 2) Doğum öncesi dönemde BRV antijeni tespit edilen 3 adet gebe sığırdan doğan buzağılarda da BRV antijen/nükleik asidinin tespit edilmesi yenidoğanların enfeksiyonu muhtemelen doğum sırasında saçıcı annelerden aldıklarını ortaya koymuştur.
- 3) Grup I'deki sığırlardan doğan ve annelerinde BRV saçılımı saptanmamış olan BRV ile enfekte diğer buzağıların, enfeksiyonu erişkin saçıcı sığırlar ya da birlikte barındırıldıkları enfekte buzağılardan aldıkları sonucuna varılmıştır.
- 4) Serolojik veriler değerlendirildiğinde ise, erişkin sığırlarda doğal enfeksiyona bağlı antikor titresinin düşük olduğu ve her ne kadar kolostral antikor düzeyi kan serumu antikor düzeyinden fazla (yaklaşık 4 kat) olsa da, bu titrenin yenidoğanları enfeksiyondan koruyacak düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Bununla beraber düşük antikor seviyesine sahip kolostrum/süt alımının bile klinik enfeksiyonun oluşumunun engellenmesinde önemli olduğu saptanmıştır.

ÖZET

Sığırlarda Rotavirus Enfeksiyonunun Epidemiyolojisinde Gebeliğin ve Maternal Antikorların Rolü

Yenidoğanlarda önemli bir gastroenteritis etkeni olan rotaviruslar, erişkin sığırlarda çoğunlukla subklinik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Dışkıları ile virus saçan erişkin hayvanlar sürülerde enfeksiyonun devamlılığını sağlamakta ve yeni doğanlar için bir risk oluşturmaktadırlar.

Çalışma, yenidoğan ishali buzağılarda rotavirus enfeksiyonunun sık olarak saptandığı Karaköy Tarım İşletmesinde gerçekleştirildi. Araştırmada, 20 adet ileri gebe sığırın bulunduğu Grup I, 15 adet gebe olmayan sığırın bulunduğu Grup II ve Grup I'deki annelerden doğan buzağılara ait toplam 479 adet gaita örneği rotavirus antijeni yönünden ELISA, rotavirus nükleik asidi yönünden PAGE ile, 439 adet kan serumu ve 120 adet süt serumu örneği ise rotavirus spesifik antikorlar yönünden mikronötralizasyon testi ile kontrol edildi.

Elde edilen veriler; erişkin sığırların gebeliğin geç dönemleri ve özellikle doğum yaptıkları gün virus saçtıklarını, bunların buzağılarının muhtemelen annelerinden saçılan virus ile enfekte olduklarını ve işletmedeki diğer yeni doğanlar için enfeksiyon kaynağı olduklarını ortaya koymuştur. Ayrıca kan ve süt serumu örneklerinin BRV spesifik antikorlar yönünden kontrolü sonuçlarına dayanılarak, doğal enfekte sığırların kolostrum/süt ile aktardıkları maternal antikorların postnatal yaşamın ilk 1 haftalık döneminde enfeksiyon oluşumunu, daha sonraki günlerde ise en azından klinik enfeksiyonun gelişimini önlediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BRV, ELISA, Epidemiyoloji, Maternal antikor, PAGE

SUMMARY

The Role of Pregnancy and Maternal Antibody in Epidemiology of Bovine Rotavirus Infections

As an important agent in neonatal gastroenteritis, the rotaviruses may cause subclinical infection in adult cattle. Such animals which are shedding the virulent virus via their feces play an important role in circulation the virus among the susceptible infants.

This study had been performed at Karaköy Tarım İşletmesi which is known that the infection detected frequently. In this research, 479 feces samples that belongs to Group I which has late pregnant cattles and Group II which has 15 non-pregnant cattles and newborn which belongs to the Group I had been tested for rotavirus antigen with ELISA and for nücleic acids with PAGE. Also 439 blood sera samples and 120 milk sera samples had been detected for rotavirus spesific antibodies with microneutralization test.

Data showed that adult cattle spreads the virus at late pregnancy, especially at the day of giving birth and their newborn probably became infected by the virus which they spread and also this is the main source of the infections for other newborns of the farm. According to the datas gained by the results of the BRV specific antibodies of blood and milk sera, maternal antibodies that transferred by colostrum/milk of natural infected cattle prevent the infection in first week of the postnatal life, and developing of the clinical infection at the days after the week of the postnatal life.

Key words: BRV, Epidemiology, ELISA, Maternal antibody, PAGE

KAYNAKLAR

- ABRAHAM, G., ROEDER, P. L., ZEWDU, R. (1992). Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, **24**: 74-80.
- ALBERT, M. J., UNICOMB, L. E., TZIPORI, S. R., BISHOP, R. F. (1987). Isolation and serotyping of animal rotaviruses and antigenic comparison with human rotaviruses. *Arch. Virol.*, **93**: 123-130.
- ALKAN, F., PULAT, H., YAZICI, Z., BURGU, İ. (1992). Ters (reverse) pasif hemagglütinasyon testi ile ishalleri buzağı gaitalarında rotavirüslerin tespiti. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **39**: 238-246.
- ALKAN, F. (1998). Buzağı ishallerinde rotavirüs ve coronavirüslerin rolü. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **45**(1): 29-37.
- ALKAN, F., BİLGE, S., OĞUZOĞLU, T. Ç., YEŞİLBAĞ, K. (1999). Rotavirüs enfeksiyonunun epidemiyolojisinde erişkin sığırların rolü. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **46** (1): 85-92.
- ARCHAMBAULT, D., MORIN, G., ELAZHARY, Y., ROY, R. S., JONCAS, J. H. (1988). Immune response of pregnant heifers and cows to bovine rotavirus inoculation and passive protection to rotavirus infection in newborn calves fed colostral antibodies or colostral lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **49** (7): 1084-1091.
- ARIAS, C. F., ROMERO, P., ALVAREZ, V., LOPEZ, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. of Virol.*, **70**: 5832-5839.
- BACHMANN, A. P., HESS, R. G. (1981). Routine isolation and cultivation of bovine rotaviruses in cell culture. *Am. J. Vet. Res.*, **42**: 2149-2150.
- BACHMANN, A. P., HESS, R. G. (1983). Local immunity in rotaviral infections. *Ann. Rech. Vet.*, **14**: 502-506.
- BACHMANN, A. P. (1984). Pathogenic and immunologic features of viral gastroenteritis in calves. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **3** (4): 819-842.
- BENFIELD, D. A., STOTZ, I., MOORE, R., Mc ADARAGH, J. P. (1982). Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing. *J. Clin. Microbiol.*, **16**: 186-190.
- BENFIELD, D. A., STOTZ, I., NELSON, E. A., 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.
- BESSER, T. E., GAY, C. C., McGUIRE, T. C., EVERMANN, J. F. (1988). Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. *J. of Virol.*, **62**: 2238-2242.

- BISHOP, R. F., DAVIDSON, G. P., HOLMES, I. H., RUCK, B. J.(1973). Virus particles on epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, **2**: 1281-1283.
- BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M., HANDERSON, J. A. (1983). *Veterinary Medicine*, Sixth Edition, Bailliere, Tindal, London, UK.
- BOYLE, J. F., HOLMES, K. V. (1986). RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. of Virol.*, **58**: 561-568.
- BRIDGER, J. C., HALL, G. A., PARSONS, K. R. (1992). A study of basis of virulence variation of bovine rotavirus. *Vet. Microbiol.*, **33**: 169-174.
- BRUCE, M. G., CAMPBELL, I. C., VAN PINXTEREN, L., SNODGRASS, D. R. (1995). Intestinal cellular immunity after primary rotavirus infection. *J. Comp. Path.*, **113**: 155-164.
- BRUSSOW, H., BRUTTIN, A., MARC-MARTIN, S. (1990). Polypeptide composition of rotavirus empty capsids and their possible use as a unit vaccine. *J. of Virol.*, **64**: 3635-3642.
- BRUSSOW, H., EICHORN, W., ROHWEDDER, A., SNODGRASS, D., SIDOTI, J. (1991). Cattle develop neutralizing antibodies to rotavirus serotypes which could not be isolated from faeces of symptomatic calves. *J. of Gen. Virol.*, **72**: 1559-1567.
- BUESA, J., COLOMINA, J., RAGA, J., VILLANUEVA, A., PRAT, J.(1996). Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for detection of rotaviruses: application assay. *Res. Virol.*, **147**: 353-361.
- BURGU, İ., AKÇA, Y.(1983). Sığırlarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerine çalışmalar. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, **30** (1) : 35-44.
- BURGU, İ., AKÇA, Y., ALKAN, F., ÖZKUL, A., KARAOĞLU, T.(1995). Yeni doğan ishali buzağılarda rotavirüslerin EM, ELISA ve PAGE teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **42** : 4, 491-499.
- CASTRUCCI, G., FRIGERI, F., FERRARI, M., CILLI, V., CALEFI, F., ALDROVANDI, V., NIGRELLI, A. (1984). The efficacy of colostrum from cows vaccinated with rotavirus in protecting calves to experimentally induced rotavirus infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **7** (1): 11-18.
- CHAUHAN, R. S., SINGH, N. P. (1996). Epidemiology of rotavirus infection in calves in India. *Int. J. Anim. Sci.*, **11**: 221-223.
- CIARLET, M., PINA, C. I., GARCIA, O., LÍPRANDI, F. (1997). Identification of bovine rotaviruses in Venezuela: antigenic and molecular characterization of a bovine rotavirus strain. *Res. Virol.*, **148**: 289-297.
- CILLA, G., PEREZ-TRALLERO, E., LOPEZ-LOPATEGUI, M. C., GILSETAS, A., GOMARIZ, M. (2000). Incidence, seasonality and serotypes of rotavirus in Gipuzkoa (Bask Country), Spain. A 14-year study. *Epidemiol. Infect.*, **125**: 677-683.
- COHEN, J., LAPORTE, J., CHARPILLENNE, A., SCHERRER, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by Calcium Chelation. *Arch. Virol.*, **60**: 177-186.
- CLARK, B., DESSELBERGER, U. (1988). Myristylation of rotavirus proteins. *J.Gen. Virol.*, **69**: 2681-2686.

- CROUCH, C. F., ACRES, S. D. (1984). Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in faeces of normal cows. *Can. J. of Com. Med.*, **48**: 340-342.
- De La FUENTE, R., GARCIA, A., QUITERIA, J. A., LUZON, M., CID, D., GARCIA, S., ORDEN, J. A., GOMEZ, M. (1998). Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev. Vet. Med.*, **36** (2): 145-152.
- De VERDIER, L., NILSSON, M., SVENSSON, L. (1999). Rotavirus G-Type Restriction, persistence and herd type specificity in Swedish cattle herds. *Clin. and Diagn. Lab. Immunol.*, **6**(2): 181-185.
- DODET, B., HESELTINE, E., MARY, C., SALIOU, P. (1997). Rotaviruses in human and veterinary medicine. *Sante*, **7** (3), 195-199.
- DYALL-SMITH, M. L., HOLMES, I. (1984). Sequence homology between human and animal rotavirus serotype-specific glykoproteins. *Nucleic Acids Research*, **12**: 3973-3982.
- ELLENS, D. J., DELEEUW, P. W. (1977). Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *J. Clin. Microbiol.*, **6**: 530-532.
- ELLENS, D. J., DE LEEUW, P. N., STRAVER, P. J. (1978). The detection of rotavirus specific antibody in colostrum and milk by ELISA. *Ann. Rech. Vet.*, **9**: 337-342.
- FENNER, F., BACHMANN, A. P., GIBBS, J. P. B., MURPHY, A. F., STUDDERT, J. M.: *Veterinary Virology*. Academic Press, Orlando Florida, USA, 1987.
- FERNANDEZ, F. M., CONNER, M. E., HODGINS, D. C., PARWANI, A. V., NIELSEN, P. R., CRAWFORD, S. E., ESTES, M. K., SAIF, L. J. (1998). Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine*, **16**: 507-515.
- FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. *Fundamental Virology*, Third Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, USA, 1996.
- FLORES, J., HOSHINO, Y., BOEGGEMAN, E., PURCELL, R., CHANOCK, R. M., KAPIKIAN, A. Z. (1986). Genetic relatedness among animal rotaviruses. *Arch. Virol.*, **87**: 273-285.
- FREY, H. R., 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.
- FUKAI, K., SAKAI, T., KAMATA, H. (1998). Distribution of G serotypes and P genotypes of bovine group A rotavirus isolated Japan. *Aust. Vet. J.*, **76** (6): 418-422.
- GALLEGOS, C. O., PATTON, J. T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*, **172**: 616-627.
- GARCIA-SANCHEZ, J., CORRAL, C., HALAIHEL, N. G., SIMN, M. C., ALONSO, J. L., MUZQUIZ, J. L., ORTEGA, C., GIRONES, O. (1993). Survey of rotavirus infection in a dairy herd: comparison between polyacrylamide gel electrophoresis and two commercial test. *Vet. Microbiol.*, **34**: 321-332.
- GLASS, R. I., KEITH, J., NAKAGOMI, O., NAKAGOMI, T., ASKAA, J., KAPIKIAN, A. Z., CHANOCK, R. M., FLORES, J. (1985). Nucleotide sequence of the structural glykoprotein

- VP7 gene of Nebraska Calf Diarrhea virus: comparison with homologous genes from four strain of human and animal rotaviruses. *Virology*, **141**: 292-298.
- GOTO, Y., KUROI, H. L., INABA, Y., MATSUNO, M. (1986). Sequential isolation of rotavirus from individual calves. *Vet. Microbiol.*, **11**: 177-184.
- GUEGUEN, C., MAGA, A., McCRAE, M. A., BATAILLON, G. (1996). Caprine and bovine B rotaviruses in western France: group identification by Northern hybridization. *Vet. Res.*, **27**(2): 171-176.
- GULATI, B. R., MAHERCHANDANI, S., PANDEY, R. (1995). Electrophoretic typing of the genomic RNA of rotaviruses from diarrhoeic calves. *Indian. J. Virol.*, **11**: 7-12.
- HERRING, A. J., INGLIS, N. F., OJEH, C. K., SNODGRASS, D. R., 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.
- HOUSE, J. A. (1978). Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *JAVMA*, **173**: 573-576.
- HUANG, J., NAGESHA, H. S., SNODGRASS, D. R., HOLMES, I. H. (1992). Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses causing calf scours in Australia. *J. of Clin. Mikrobiol.*, **30**: 85-92.
- HUSSEIN, A. H., CORNAGLIA, E., SABER, M. S., EL-AZHARY, Y. (1995). Prevalence of serotypes G6 and G10 Group A rotavirus in dairy calves in Quebec. *Can. J. Vet. Res.*, **59**: 235-237.
- IHARA, T., SAMEJIMA, T., KUWAHARA, H., TAJIMA, M. (1983). Isolation of new serotypes of bovine rotavirus. *Arch of Virol*, **78**, 145-150.
- ISHIZAKI, H., OHTA, C., SHIRAHATA, T., GOTO, H., TANIGUCHI, K., URASAWA, T., URASAWA, S. (1995). Persistence of a single electropherotype and serotype (G6P5) of bovine rotavirus in calves on a closed dairy farm from 1990 to 1993. *Am. J. Vet. Res.*, **56**: 1019-1024.
- IWAGAWA, H., HIRASAWA, K., AKIYAMA, Y., OMARI, R. (1982). Seroepizootological survey on rotavirus infection in foals. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **44**: 819-821.
- JOKLIK, K. W.: *Virology*. Second edition. Appleton Century Crofts, Norwalk, Connecticut, USA, 1985.
- KAERBER, G. (1964). In diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases. *Public Health Ass.*, (New York) **3**: 48-50.
- KAMINJOLO, J. S., ADESIYUN, A. A. (1994). Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. *Br. Vet. J.*, **150**: 293-298.
- KAPIKIAN, Z. A., CHANOCK, M. R. (1990). Rotaviruses pp: 1353-1404. In Fields, N.B., Knipe, M.D. *Virology, Second Edition*, Raven Press, New York, ABD.

- KIM, A., NIELSEN, P. R., HODGINS, D., CHANG, K. O., SAIF, L. J. (2002). Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. *Vaccine*, **20**: 1248-1258.
- KODITUWAKKU, S. N., HARBOUR, D. A. (1990). Persistent excretion of rotavirus by pregnant cows. *Vet. Rec.*, **126**: 547-549.
- KOHARA, J., HIRAI, T., MORI, K., ISHIZAKI, H., TSUNEMITSU, H. (1997). Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.*, **59** (11): 1023-1025.
- KOHARA, J., TSUNEMITSU, H. (2000). Correlation between maternal serum antibodies and protection against bovine rotavirus diarrhea in calves. *J. Vet. Med Sci.*, **62** (2): 219-221.
- KOK, T. W., BURRELL, C. J. (1989). Comparison of five enzyme immunoassays, electron microscopy and latex agglutination for detection of rotavirus in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **27** (2): 364-366.
- LA BONNARDIERE, C., COHEN, J., CONTREPOIS, M. (1981). Interferon activity in rotavirus infected newborn calves. *Ann. Rech. Vet.*, **12**, 85-91.
- LE ROUSIC, S., KLEIN, N., HOUGHTON, S., CHARLESTON, B. (2000). Use of colostrum from rotavirus immunised cows as a single feed to prevent rotavirus-induced diarrhoea in calves. *Vet. Rec.*, **147** (6): 160-161.
- LECCE, J. G., KING, M. W. (1982). Rotaviral antibodies in cow's milk. *Can. J. Comp. Med.*, **46**: 434-436.
- LEE, J., BABIUK, L. A., HARLAND, R., GIBBONS, E., ELAZHARY, Y., YOO, D. (1995). Immunological response to recombinant VP8* subunit protein of bovine rotavirus in pregnant cattle. *J. of Gen. Virol.*, **76**: 2477-2483.
- LU, W., DUHAMEL, E. D., BENFIELD, A. B., GROTELUESCHEN, D. M. (1994). Serological and genotypic characterization of group A rotavirus reassortants from diarrheic calves born to dams vaccinated against rotavirus. *Vet. Microbiol.*, **42**: 159-170.
- LUCHELLI, A., LANCE, S. E., BARLETT, P. B., MILLER, G. Y., SAIF, L. J. (1992). Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. *Am. J. Vet. Res.*, **53** (2): 169-174.
- MARKOWSKA-DANIEL, I., WINIARCZYK, S., GRADZKI, Z., PEJSKAK, Z. (1996). Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for diagnosis of rotavirus infection in piglets. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, **19** (3): 219-232.
- MATSUDA, Y., NAGAKAMI, O. (1989). Antigenic and molecular characterization of bovine rotaviruses isolated in Japan. *Res. Virol.*, **10**: 337-350.
- MATSUNO, S., INOUE, S. (1983). Purification of an outer capsid glykoprotein of Neonatal Calf Diarrhea Virus and preparation of its antisera. *Infect. and Immun.*, **39** (1): 155-158.
- Mc NULTY, M. S. (1978). The rotaviruses. *J. of Gen. Virol.*, **40** : 1-18.
- Mc NULTY, M. S. (1983). Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. *Vet. Rec.*, **113**: 333-335.

- Mc NULTY, M. S., ALLAN, M. G., Mc FERAN, B. J. (1977). Cell culture studies with cytopathic bovine rotavirus. *Arch. Virol.*, **54**: 201-209.
- Mc NULTY, M. S., LOGAN, E. F. (1983). Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. *Vet. Rec.*, **113**: 333-335.
- Mc NULTY, M. S., LOGAN, E. F. (1987). Effect of vaccination of the dam on rotavirus infection in young calves. *Vet. Record.*, **120**: 250-252.
- MEBUS, C. A., STAIR, E. L., UNDERHAL, N. R., TWIEHAUS, M. J. (1971). Pathology of neonatal calf diarrhea induced by reolike virus. *Vet. Pathol.*, **8**: 490-505.
- MURAKAMI, T., HIRANO, N., CHITOSE, K., TSUCHIYA, K., ONO, K., SATO, F., SUZUKI, Y., MURAKAMI, Y. (1987). A survey on bovine rotavirus type1-Associated neonatal calf diarrhea in a Beef Herd. *Jpn.J. Vet. Sci.*, **49** (1): 23-30.
- MURPHY, F. A., GIBBS, J. E. P., HORZINECK, C. M., STUDDENT, M. J. (1999). Veterinary Virology, 3. Edition.
- MUSALEM, C., ESPEJO, R. T. (1985). Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J. Gen. Virol.*, **66**: 2715-2724.
- MYERS, L. L., FIREHAMMER, B. D., BORDER, M. M., SHOOP, D. S. (1984). Prevalence of enteric pathogens in the feces of healthy beef calves. *Am. J. Vet. Res.*, **45** (8): 1544-1548.
- NAGESHA, H. S., HOLMES, I. H. (1991). VP4 relationships between porcine and other rotavirus serotypes. *Arch. Virol.*, **116**: 107-118.
- O'NEAL, C. M., HARRIMAN, G. R., CORNER, M. E. (2000). Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require Immunoglobulin A. *J. of Virol.*, **74**: 4102-4109.
- PARWANĪ, A. V., MUNOZ, M., TSUNEMITSU, H., LUCCHELLI, A., SAIF, L. J. (1995). Molecular and serologic characterization of a group A bovine rotavirus with a short genome pattern. *J. Vet. Diag. Invest.*, **7**: 255-261.
- RADOSTITS, O. M. (1991). The role of management and the use of vaccines in the control of acute undifferentiated diarrhea of newborn calves. *Can. Vet. J.*, **32**: 155-159.
- RAHMANN, A. S., AL-SADIQ, A., AL-SHARI, A., ALIM, A. R. (1987). Rotaviruses as an important cause of diarrhea in hospital for children in Dammam in Saudi Arabia. *Arabia Ann. Trop. Pediatr.*, **7**(3): 173-176.
- RODGERS, S. J., BALDWIN, C. A. (1991). Comparison of a visible reaction disc enzyme immunoassay to a commercial spectrophotometric bead enzyme immunoassay and electron microscopy for the diagnosis of rotavirus in bovines. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**: 342-343.
- RUIZ, M. C., COHEN, J., MICHELANGELI, F. (2000). Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*, **28**(3): 137-149.
- SABARA, M., BARRINGTON, A., BABIUK, A. L. (1985). Immunogenicity of a bovine rotavirus glykoprotein fragment. *J. of Virol.*, **56** (3): 1037-1040.
- SAIF, L. J., THEIL, K. W. Viral Diarrheas of Man and Animals, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, 1990.

- SAMMONS, D. W., ADAMS, L. D., NISHIZAWA, E. E. (1981). Ultrasensitive silver-based color staining polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **2**: 135-141.
- SCHLAFAER, D. H., SCOTT, F. W. (1979). Prevalence of neutralizing antibody to the calf rotavirus in New York Cattle. *Cornell. Vet.*, **69**: 262-271.
- SNODGRASS, D. R., FAHEY, K. J., WELLS, P. W., CAMPBELL, I., WHITELOW, A. (1980). Passive immunity in calf rotavirus infection: Vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk. *Infect. and Immun.*, **28**: 344-349.
- SNODGRASS, D. R., STEWART, J., TAYLOR, J., KRAUTIL, F. L., SMITH, M. L. (1982). Diarrhoea in dairy calves reduced by feeding colostrum from cows vaccinated with rotavirus. *Res. in Vet. Sci.*, **12**: 70-73.
- SNODGRASS, D. R., WELLS, P. W. (1978). Passive immunity in rotaviral infections. *JAVMA*, **173**: 565-568.
- STEINER, L., BUSATO, A., BURNENS, A., GAILLARD, C. (1997). Häufigkeiten und Ursachen von Kalberverlusten und Kalberkrankheiten in Mutterkuhhäufen. II. Mikrobiologische und parasitologische Diagnosen bei Kalbern mit Durchfall. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **104**: 169-173.
- TAZI-LAKHSASSI, L., GARBARG-CHENON, A., NICOLAS, J. C., SOUBHI, H., BENBACHIR, M., el MDAGHRI, N., TAZI, M., BRICOUT, F., HURAUX, J. M. (1988). Epidemiological and clinical study and electrophoretotyping survey of rotavirus acute diarrhoea in a children's infectious disease unit in Casablanca, Morocco. *Ann. Inst. Pasteur Virol.*, **139** (2): 205-215.
- THEIL, K. W., McCLOSKEY, C. M. (1995). Rotavirus shedding in feces of gnotobiotic calves orally inoculated with a commercial rotavirus-coronavirus vaccine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**: 427-432.
- TSUNEMITSU, H., MORITA, D., TAKAKU, H., NISHIMORI, T., IMAI, K., SAIF, L. J. (1999). First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene. *Arch. Virol.*, **144**: 805-815.
- VAN OPDENBOSCH, E., De CUENINCK, B. J., WELLEMANS, G. (1983). Study of the influence of parenteral adjuvant administration in parturient cattle on immunoglobulin secretion in colostrum and milk. *CEC Symposium 27-28 April 1983*, 191-202.
- VAN OPDENBOSCH, E., WELLEMANS, G. (1981). Rotavirus detection in cat feces: A comparison between rotazyme test, immuno diffusion test and neutralization of indirect immunofluorescence test. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **51**: 11-17.
- VAN OPDENBOSCH, E., WELLEMANS, G., DEKEGEL, D., STROBBE, R. (1979). Neonatal calf diarrhoea: A complex etiology. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **48**: 512-526.
- VAN ZAANE, D., IJZERMAN, J., DE LEEUW, P. W. (1986). Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody. *Vet. Immun. Immunopathol.*, **11**: 45-63.
- VAUGHN, J. M., CHEN, Y. S., LINDBURG, K., MORALES, D. (1987). Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(9): 2218-2221.

- WARD, R. L., KAPIKIAN, A. Z., GOLDBERG, K. M., KNOWLTON, D. R., WATSON, M. W., RAPPAPORT, R. (1996). Serum rotavirus neutralizing antibody titers compared by plaque reduction and ELISA based neutralization Assay. *J. Clin. Microbiol.*, **34**: 983-985.
- WARD, R. L., KNOWLTON, D. R., GREENBERG, H. B., SCHFF, G. M., BERNSTEIN, D. I. (1990). Serum-nötralizating antibody to VP4 and VP7 proteins in infants following vaccination with WC3 bovine rotavirus. *J. of Virol.*, **64**: 2687-2691.
- WARD, L. A., RICH, E. D., BESSER, T. E. (1996). Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine Group A rotavirus. *The J. of Infect. Diseases.*, **174**: 276-282.
- WELLEMANS, G., VAN-OPDENBOSCH, E. (1981). Postpartum antibody levels for rota, corona and BVD virus in cows milk. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **50**: 46-52.
- WOODE, G. N., BRIDGER, J. C. (1975). Viral enteritis of calves. *Vet. Rec.*, **96**: 85-88.
- WOODE, G. N., JONES, J., BRIDGER, J. (1975). Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **23**: 148-149.
- XU, L., HARBOUR, D., McCRAE, M. A. (1990). The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. *J. of Virol. Methods*, **27**(1): 29-37.
- YASON, C. V., SUMMERS, B. A., SCHAT, K. A. (1987). Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys. *Am.J. Vet. Res.*, **48**, 927-938.
- YAZICI, Z. (1992). Buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu. *A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.*
- ZENG, C. Q., LABBE, M., COHEN, J., PRASAD, B. V., CHEN, D., RAMUG, R. F., ESTES, M. K. (1994). Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology*, **201**:55-65.