

SIĞIRLARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONUNUN EPİDEMİYOLOJİSİNDE GEBELİĞİN ROLÜ*

Kezban CAN ŞAHNA¹

Feray ALKAN²

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Kayseri – TÜRKİYE

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Ankara – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.03.2003

Role of Pregnancy in Epidemiology of Rotavirus Infection in Cattle

Summary

This study had been performed at Karaköy Tarım İşletmesi which is known that rotavirus infection detected frequently in newborn calves. In this research, 479 feces samples from group I which were late pregnant cattle, from group II which were 15 non-pregnant cattle, and from newborns of cows in group I which were detected for rotavirus antigen by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and for nucleic acids by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). Data showed that adult cattle spread the virus at late phase of pregnancy, especially at the day of giving birth and their newborn probably became infected by the virus which adults spread and also this is the main source of infection for other newborns of the farm.

Key Words: BRV, epidemiology, ELISA, PAGE

Özet

Çalışma, yenidoğan ishali buzağılarda rotavirus enfeksiyonunun sık olarak saptandığı Karaköy Tarım İşletmesinde gerçekleştirildi. İşletmeden 14 hafta boyunca, 20 adet ileri gebe sığırın bulunduğu Grup I, 5 adet düve, 5 adet yeni doğum yapmış ve 5 adet suni tohumlanmış olmak üzere 15 adet sığırın bulunduğu Grup II ve Grup I'deki annelerden doğan buzağılara ait toplam 479 adet gaita örneği rotavirus antijeni yönünden Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), rotavirus nükleik asidi yönünden Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) testi ile kontrol edildi. Elde edilen veriler; erişkin sığırın 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.

Anahtar Kelimeler: BRV, epidemiyoloji, ELISA, PAGE

Giriş

Rotavirusların neden olduğu enteritler farklı hayvan türlerinin yeni doğanlarında yaygın olarak görülmekte olup, akut sarı renkli ishal, dehidratasyon, 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 ölümlerle sonuçlanabilen bir klinik seyire neden olabilmektedir (5,18).

Rotavirus enfeksiyonu yetişkin hayvanlarda genellikle subklinik olarak seyretmektedir. Birçok araştırmacı (3,8,9) 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. (4) tarafından ortaya konulmuştur. Goto ve ark. (13) da çiftlikte bovine rotavirus (BRV) enfeksiyonunun sürdürülmesinde asemptomatik erişkin saçıcıların önemli rol oynadığını, enfekte annelerin genellikle buzağılama sırasında yeni doğan buzağıları enfekte ettikleri ve enfekte buzağılarının da yüksek miktarda virus saçarak diğer yeni doğanlar için enfeksiyon kaynağı olduklarını bildirmişlerdir. Murakami ve ark. (19) 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 yeni doğanlarda yoğun

* Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 00-50-1 proje numarası ile desteklenmiştir.

rotavirus enfeksiyonunun ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Türkiye’de rotavirüslerle ilişkin enteritiserlerin varolduğu, sığırlarda rotavirus enfeksiyonunun prevalansının belirlenmesi, ishalleri buzağılarda rotavirüslerin rolü ve rotavirus enfeksiyonlarının teşhisinde duyarlı yöntemlerin belirlenmesi amaçlarına yönelik araştırmalar (1,2,7,8) ile ortaya konulmuştur. Erişkin sığırlarda BRV antijeninin araştırıldığı tek çalışma olan Alkan ve ark. (3) çalışmasında çoğunluğu 7-9 aylık gebe olan 585 sığıra ait gaita örneğinden hiçbirisinde BRV tespit edilememiştir. Ancak erişkin sığırlarda BRV enfeksiyonu oranlarının serolojik olarak belirlenmesine yönelik araştırmalarda (3,7,8) %28.3-43.8 oranında seropozitiflik saptanmıştır.

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. Ishizaki ve ark.(15) kapalı yetiştirme yapılan bir işletmede 3 yıl boyunca yaptıkları bir çalışmada, ishalleri ve sağlıklı buzağılardan identifiye ettikleri BRV’un çalışma süresi boyunca antijenik değişikliğe uğramaksızın persistent olarak kaldığını göstermişlerdir. Erişkin subklinik enfekte sığırlarda rotavirüslerin saçılımı gebeliğin geç dönemlerinde (özellikle doğum yaptıkları gün) muhtemelen hormonal değişiklikler ve hormonların immun sistemdeki immunsupresif etkilerine bağlı olarak artmaktadır. Bu hayvanlar da yeni doğanların etkeni edinmelerinde ve virusu çoğaltarak yaymalarında önemli rol oynamaktadırlar (19).

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 amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırma, sıklıkla yenidoğanlarda BRV enfeksiyonunun görüldüğü bir kamu işletmesinde (Karaköy Tarım İşletmesi, Bafra, Samsun) BRV spesifik antikor varlığı saptanan 35 sığır üzerinde yapıldı. Araştırmada iki farklı grup seçildi. 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 sığırdan oluşturuldu. Araştırmada ayrıca Grup I’deki sığırlardan doğan buzağılar değerlendirildi.

Grup I’i oluşturan sığırlardan doğum öncesi birer hafta aralıklarla 3 kez, doğum yaptıkları gün, doğum sonrası 3. ve 5.günlerde ve doğum sonrası birer hafta ara ile 7., 14. ve 21. günlerde olmak üzere 3 kez gaita örnekleri alındı. 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 gaita örnekleri temin edildi. Grup II’yi oluşturan seropozitif gebe olmayan hayvanlardan, örneklemlerin yapıldığı 14 hafta boyunca birer hafta ara ile 15 kez gaita ve kan örnekleri toplandı.

Gaita Örnekleri: Bu çalışmada materyal örnekleme takvimine göre Grup I’de bulunan sığırlardan 178, bunların buzağılarından 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.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Bu amaçla ticari ELISA kiti (Microgen Bio Products, Rotascreen II EIA, U.K.) kullanıldı. Test, üretici firmanın belirttiği yöntemle 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 50 µl, iki göze ise negatif kontrol amacıyla materyal sulandırma sıvısından 50 µl damlatıldı. Daha sonra tüm gözlerle 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 durdurma solüsyon ile durduruldu ve sonuçlar ELISA test okuyucusunda 450 nm dalga boyuna sahip filtre kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE): BRV nükleik asidinin ekstraksiyonu ve polyacrylamid gel kullanılarak elektroforez için Herring ve ark. (14), gümüş nitrat boyama amacıyla da Sammons ve ark.(21)’nin bildirildiği yöntemlerden yararlanıldı.

BRV nükleik asidinin ekstraksiyonu amacıyla; gaita örnekleri %1 Sodium dodecyl sülfate (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 çözülürülen süspansiyon (450 µl), SDS (50 µl) ve Fenol-Kloroform (500 µl) ile karıştırılarak, gaita örnekleri için yukarıda bildirilen basamaklara tabi tutuldu.

Hazırlanan materyaller viral nükleik asidin tespiti için, %7.5 olacak şekilde hazırlanan polyacrylamid gel'e (akrilamid:bisakrilamid, 37.5:1) özel enjektör yardımıyla 40 µl hacimde konuldu. Jel ve elektrot tamponu olarak 36 mM Tris-HCl, 30 mM Na₂HPO₄, 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. Bu amaçla jel, %10 etanol ve %0.5 asetik asit karışımında 30 dakika süreyle fikze edildikten sonra, 20 dakika 10 mM AgNO₃ içinde bekletildi. Jelin distile su ile yıkanmasını takiben bantların gözle görülebilir hale gelmesi için, jel 0.1 M formaldehit içeren 0.75 M NaOH ile muamele edildi. Kısa sürede şekillenen bantların netleşmesi için 10 dakika bekletildikten sonra karışıma 70 mM Na₂CO₃ ilave edilip reaksiyon tamamlandı. Jel fotoğraflanana kadar distile suda +4°C'de saklandı.

Bulgular

ELISA Testi

Grup I'yi 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 (Tablo 1).

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 (Tablo 2). Bunlardan iki adedi (olgu-I A, olgu-XVII A) doğum öncesi 7. günde, birisi doğum öncesi 7. günde de pozitif olmak üzere iki adedi (olgu-XII A, olgu-XVII A) doğum yaptıkları gün, bir adedi (olgu-IV A) doğum sonrası 7. günde, iki adedi de (olgu-VI A, olgu-XIV A) doğum sonrası 14. günde alınan gaita örneklerinde BRV antijeni yönünden pozitif bulundu (Tablo 1,2).

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.

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 B, olgu-XII B, olgu-XVII B) (Tablo 1).

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 olarak bulundu (Tablo 1).

Tablo 1 incelendiğinde, ELISA testi ile BRV antijeni tespit edilen buzağılardan 3 adedinde (olgu-III B, olgu-XII B ve olgu-XX B) tipik rotavirus buzağı ishali, 3 adet buzağıda ise (olgu-X B, olgu-XV B ve olgu XVI B) sulu, sarı renkli ishal olmayan anormal gaita varlığı belirlendi. Diğer 12 adet buzağı gaitalarında ise herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

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

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. (Tablo 1)

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 (Tablo1). 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 (Tablo 1).

Elde edilen PAGE kalıpları incelendiğinde, BRV pozitif numunelerin 11 RNA segmentine sahip A tipi rotavirus oldukları saptandı (Şekil 1).

Tablo 1. Grup 1'deki sığırlar ile bunların yavrularına ait ELISA ve PAGE sonuçları

Olgu No		Doğum öncesi dönem						Doğum						Doğum sonrası dönem					
		1.Örnek		2.Örnek		3.Örnek		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

P: PAGE testi sonucu

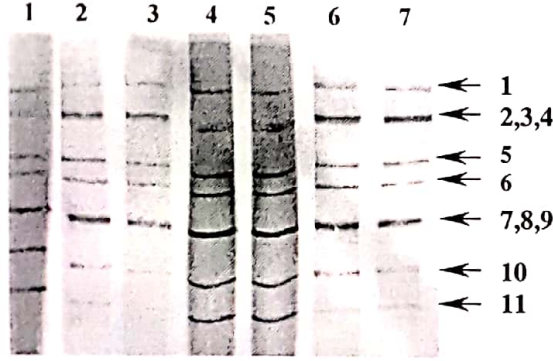
A: Anne

B: A'nın yavrusu

Tablo 2. Grup I'de BRV antijeni tespit edilen annelerin sayısı

Anne	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
	-	-	2	2*	-	-	1	2	-

*1 adedi doğum öncesi 7.günde de antijen pozitif



Şekil 1. PAGE testi pozitif materyaller.
Hat 1, Northern Ireland 447/75
Hat 2-7, Sürüde tespit edilen BRV-RNA pozitif gaitalar.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, PAGE ile pozitif bulunan materyallerin tümü ELISA pozitif bulunurken, ELISA pozitif 10 materyalde PAGE ile viral nükleik asit tespit edilemedi (Tablo 1).

Araştırma planına uygun olarak alınan erişkin sığırlara ait toplam 400 adet gaita örneğinden, Grup I'yi 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 numunelerin 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 B ve olgu-XIV B).

Sonuç olarak ELISA ve PAGE testleri karşılaştırılmalı 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 dönemlerdeki teşhisinde ELISA'nın daha yüksek duyarlılıkta olduğu görüldü.

Tartışma

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. (13,17,19,20). Kodituwakku ve Harbour (17) erişkin taşıyıcı sığırlarda rotavirus varlığını, gebelik boyunca aralıklı olarak virus saçan sığırlarda göstermişlerdir. Araştırmacılar 10 sığırdan birer hafta aralıklarla sağladıkları toplam 229 adet gaita örneğinden 50 adedinde (%21.8) latex aglütinasyon test ile BRV tespit etmişler ve bu hayvanların yeni doğanların klinik enfeksiyonu sonrasında uygulanan dezenfeksiyona rağmen barınakların kontaminasyonunda rol oynayabileceğini ve bir buzağılama sezonundan sonraki sezona kadar virusun devamlılığı için virusun canlılığına alternatif mekanizma sağladığını da belirtmişlerdir. Garcia-Sanchez ve ark. (12) 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 yapılan periyodik örnekleme, 6 erişkin gebe sığırdan çeşitli örnekleme dönemlerinde BRV antijeni tespit edilmiştir. Bu 6 erişkin sığırdan 2 adedinde doğum öncesi 7. günde yapılan örnekleme 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 örnekleme BRV saçılımının tespit edilmiş olması, erişkin subklinik enfekte sığırların doğum yaptıkları dönemde hormonal değişikliklere ilgili olarak BRV saçtıklarını bildiren çalışmaların verileri ile (4,19) paralel bulunmuştur. 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. 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 (4,17,19) bildirdiğine paralel olarak gebeliğin erişkin enfekte sığırlarda BRV saçılımını uyaran bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır.

Grup I de bulunan toplam 20 sığırdan doğan 18 buzağıda (%90) BRV enfeksiyonunun varlığı saptanmıştır. Bunlardan 3 adedi doğum öncesi ve doğumun 1.gününde antijen saçıcı annelere ait buzağılardır. Kodituwaku ve Harbour (17), yaptıkları periyodik örneklemelerde 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 bir arada değerlendirildiğinde görülmektedir ki; Goto ve ark.(13)'nın da bildirdiği gibi, BRV enfeksiyonunun devamlılığında sağlıklı görünümü erişkin saçıcılar önemli rol oynayabilmekte; enfekte anneler genellikle buzağılama sırasında yeni doğan yavrularını enfekte etmekte ve enfekte buzağılar da yüksek miktarda virus saçarak yeni doğanlar 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 virus saçılımında 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 (1,8,11,16) yenidoğan buzağılarda BRV enfeksiyonu oranları ve bu enfeksiyona bağlı ekonomik kayıpların boyutuna dikkati çekmiştir.

Bu çalışmada BRV enfeksiyonu saptanan toplam 18 buzağıdan 16'sı için ilk enfeksiyon yaşı 7. gün; 2 adedi için de 14. gün olarak belirlenmiştir. Bu bulgular gerek ilk enfeksiyon yaşının bildirildiği (1,8,12) ve gerekse ortalama enfeksiyon yaşının bildirildiği çalışmaların (1,8,12,22) verileri ile paralel bulunmuştur.

Bu çalışmada erişkin sığırlar ve buzağılardan sağlanan gaita örneklerinin, etken saçılımının tespitinde daha yüksek güvenilirlik ile tespit edilebilmesi amacıyla ELISA ve PAGE tekniklerinden yararlanılarak BRV antijeni/nükleik asidi yönünden kontrolü yapıldı. İki yöntemin duyarlılıkları karşılaştırıldığında ise, 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 iki buzağının (olgu-XII B ve olgu-XIV B) 14. gün alınan gaita örneğinde ELISA ile BRV antijeni tespit edilmesine karşın, PAGE ile BRV nükleik asidinin saptanamamıştır. Her ne kadar buzağılarda BRV enfeksiyonlarının tespitinde kullanılan yöntemler arasında duyarlılık farklılığı birçok çalışmada (8,12) 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. (23)'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.(10), 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. (6)'da düşük virulensli viruslar ile gelişen enfeksiyonlarda enterositlerdeki sitopatik etkinin de düşük düzeyde geliştiği ve bunun subklinik enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak elde edilen veriler,

yeni doğan buzağuların BRV nedenli ishal olgularında, erişkin sığırların bir epidemiyolojik kaynak olarak gözardı edilmemesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Kaynaklar

1. Alkan F. Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. AÜ Vet Fak Derg 1998; 45: 29-37.
2. Alkan F, Pulat H, Yazıcı Z, Burgu İ. Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon testi ile ishali buzağı gaitalarında rotavirusların tespiti. AÜ Vet Fak Derg 1992; 39: 238-246.
3. Alkan F, Bilge S, Oğuzoğlu TC, Yeşilbağ K. Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde erişkin sığırların rolü. AÜ Vet Fak Derg 1999; 46: 85-92.
4. Benfield DA, Stotz I, Nelson EA, Groon KS. 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 1984; 45: 1989-2002.
5. Blood DC, Radostits OM, Handerson JA. Veterinary Medicine, Sixth Edition, Baillere, Tindal, London, UK, 1983.
6. Bridger JC, Hall GA, Parsons KR. A study of basis of virulence variation of bovine rotavirus. Vet Microbiol 1992; 33: 169-174.
7. Burgu İ, Akça Y. Sığırlarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerine çalışmalar. AÜ Vet Fak Derg 1983; 30: 35-44.
8. Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu T. Yeni doğan ishali buzağularda rotavirusların EM, ELISA ve PAGE teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. AÜ Vet Fak Derg 1995; 42: 491-499.
9. Crouch CF, Acres SD. Prevalance of rotavirus and coronavirus antigens in faeces of normal cows. Can J Com Med 1984; 48: 340-342.
10. Dodet B, Heseltine E, Mary C, Saliou P. Rotavirus in human and veterinary medicine. Sante 1997; 7: 195-1999.
11. Fukai K, Sakai T, Kamata H. Distribution of G serotypes and P genotypes of bovine group A rotavirus isolated Japan. Aust Vet J 1998; 76: 418-422.
12. Garcia-sanchez J, Corral C, Halalhel NG, Simn MC, Alonso JL, Muzquiz JL, Ortega C, Girones O. Survey of rotavirus infection in a dairy herd: comparison between polyacrylamide gel electrophoresis and two commercial test. Vet Microbiol 1993; 34: 321-332.
13. Goto Y, Kurogi HI, Inaba Y, Matsuno M. Squential isolation of rotavirus from individual calves. Vet Microbiol 1986; 11: 177-184.
14. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. J Clin Microbiol 1982; 16: 473-477.
15. Ishizaki H, Ohta C, Shirahata T, Goto H, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. 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 1995; 56: 1019-1024.
16. Kaminjolo JS, Adesiyun AA. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. Br Vet J 1994; 150: 293-298.
17. Kodituwakku SN, Harbour DA. Persistent excretion of rotavirus by pregnant cows. Vet Rec 1990; 126: 547-549.
18. Mc NULTY MS. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. Vet Rec 1983; 113: 333-335.
19. Murakami T, Hirano N, Chitose K, Tsuchiya K, Ono K, Sato F, Suzuki Y, Murakami Y. A survey on bovine rotavirus type1-Associated neonatal calf diarrhea in a Beef Herd. Jpn J Vet Sci 1987; 49: 23-30.
20. Myers LL, Firehammer BD, Border MM, Shoop DS. Prevalence of enteric pathogens in the feces of healthy beef calves. Am J Vet Res 1984; 45: 1544-1548.
21. Sammons DV, Adams LD, Nishizawa EE. Ultrasensitive silver-based color staining polypeptides in polyacrylamide gels. Electrophoresis 1981; 2: 135-141.
22. Steiner L, Busato A, Burnens A, Gaillard C. Häufigkeiten und Ursachen von Kalberverlusten und Kalberkrankheiten in Mutterkuhbetrieben. II. Mikrobiologische und parasitologische Diagnosen bei Kalbern mit Durchfall. Dtsch Tierarztl Wschr 1997; 104: 169-173.
23. Tazi-lakhsassi L, Garbarg-chenon A, Nicolas JC, Soubhi H, Benbachir M, El mdaghri N, Tazi M, Bricout F, Huraux JM. 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 1988; 139: 205-215.