T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSHALLİ BUZAĞILARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONLARININ ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE SAPTANMASI

Ahmet Emre AYCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Konya, 2006

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSHALLİ BUZAĞILARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONLARININ ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE SAPTANMASI

Ahmet Emre AYCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 12/05/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf DURAK	Prof. Dr. Sibel YAVRU	Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN
(Üye)	(Üye)	(Danışman)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İSHALLİ BUZAĞILARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYONLARININ ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE SAPTANMASI

Ahmet Emre AYCAN

Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN

2006, 42 sayfa

Jüri: Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Sibel YAVRU

Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Rotaviruslar tüm dünyada hayvanlar ve küçük çocuklarda akut viral gastroenteritislerin en önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilir.

Bu çalışmada, buzağılarda ishale neden olan viral ajanların en önemlilerinden biri olarak kabul edilen rotaviruslar ele alınarak, ishal semptomları gösteren 0-6 aylık buzağılardan toplanan 106 adet gaita örneğinden rotavirus antijen varlığının, 106 adet kan örneğinden rotavirus antikor varlığının Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile belirlenmesi ve rotavirus enfeksiyonlarının Konya bölgesindeki yaygınlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

ELISA ile kontrol edilen 106 adet gaita örneğinden 9 (%8.50)'u rotavirus antijenleri yönünden pozitif olarak belirlenirken, 106 adet kan serumu örneğinden 90 (%84.90)'ı rotavirus antikorları yönünden pozitif olarak belirlendi.

Bu çalışmada ishal semptomu gösteren buzağılarda %8.50 (9/106) oranında rotavirus antijenlerinin bulunması ve aynı buzağıların %84.90 (90/106) oranında rotavirus antikorlarını taşımaları, enfeksiyonun Konya bölgesinde yaygın olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Rotavirus, İshal, Antijen, Antikor, ELISA.

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF ROTAVIRUS INFECTIONS IN CALVES WITH DIARRHEA BY THE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Ahmet Emre AYCAN

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

2006, 42 pages

Jury: Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Sibel YAVRU

Asist. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

Rotavirus infections are regarded as one of the most common causes of acute viral neonatal gastroenteritis among animals and young children.

In this study, by examining the Rotaviruses which have been accepted as one of the most important causes of viral agents causing calves diarrhea it is aimed to investigate existence of Rotavirus antigens in 106 gaita samples collected from 0-6 month old calves showing diarrhea semptoms and specific antibodies from the 106 blood samples by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and whether how cammon Rotavirus infections in Konya are.

Of 106 feces samples examined by ELISA 9 samples (%8.50) were identified as positive regarding Rotavirus antigens. Of 106 feces samples checked by ELISA 90 samples (%84.90) were identified as positive regarding Rotaviruses antibodies.

This study, that Rotaviruses antigens have been identified at the ratio of %8.50 (9/106) in the calves showing diarrhoea symptom, and that the same calves have been identified as to carry Rotavirus antibodies at the ratio of %84.90 (90/106) proves that infections are common in the region.

Key Words : Rotavirus, Diarrhea, Antigen, Antibody, ELISA.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Konya merkez ve ilçelerinde ishalli buzağılardan toplanan ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na getirilen kan ve gaita örneklerinde ELISA ile antijen ve antikorların saptanması amaçlandı.

Tez konumun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi ve tamamlanması aşamalarında çok büyük yardımını gördüğüm değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN'a,

Laboratuvar çalışmalarında ve diğer aşamalarda çalışmamın başından beri bilgileriyle ve her türlü destekleriyle yardımcı olan "Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi" Dekan Yrd. Sayın Prof. Dr. Sibel YAVRU'ya, Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e, Yrd. Doç. Dr. Orhan YAPKIÇ'a, Dr. Oya BULUT'a, Arş. Gör. Oğuzhan AVCI'ya, Vet. Hek. Oktay DAL'a, Vet. Hek. Mehmet AYDIN'a, Arş. Gör. Serdal KAYA'ya ve bu çalışmada emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Konya, 2006 Ahmet Emre AYCAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET……iii

ABSTRACT……..……iv

ÖNSÖZ……...…...……v

İÇİNDEKİLER…….…….vi

ÇİZELGE VE ŞEKİL LİSTESİ……...……viii

KISALTMALAR……..ix

1. GİRİŞ……..1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI…….……..2

3. MATERYAL VE METOT…….……...12

3.1. İshalli Buzağıların Gaita Örnekleri……..…12

3.2. İshalli Buzağıların Serum Örnekleri……...12

3.3. ELISA Testleri……14

3.3.1. Rotavirus antijeninin belirlenmesi için ELISA'nın yapılışı……...14

3.3.1.1. ELISA sonucu…….…….14

.

3.3.2. Rotavirus antikorlarının belirlenmesi için ELISA'nın yapılışı……..…….……15

3.3.2.1. ELISA sonucu…….…….15

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI……...……16

4.1. ELISA Sonuçları……...……16

4.1.1. Gaita örneklerinin ELISA sonuçları……..…..…16

4.1.2. Serum örneklerinin ELISA sonuçları…….16

4.1.3. Değerlendirme……16

5. TARTIŞMA…….……...……..29

6. SONUÇ VE ÖNERİLER…….37

7. KAYNAKLAR……...…….38

ÇİZELGE VE ŞEKİL LİSTESİ

ÇİZELGELER **Sayfa No**

Çizelge 3.1. Gaita ve Serumlarında rotavirus antijen ve antikor varlığı araştırılan ishalli buzağıların bulundukları bölgelere göre dağılımı……12

Çizelge 3.2. Gaita ve Serum örnekleri alınan ishalli buzağıların yaş gruplarına göre dağılımı……..……13

Çizelge 4.1.a. Serum örneklerinin pleytlere dizilişi…….....17

Çizelge 4.1.b. Serum örneklerinin ELISA okuyucusunda elde edilen optik dansite sonuçları…….18

Çizelge 4.2.a. Gaita örneklerinin pleytlere dizilişi…….…….19

Çizelge 4.2.b. Gaita örneklerinin ELISA okuyucusunda elde edilen optik dansite sonuçları…….20

Çizelge 4.3. Serum ve Gaita örneklerinin ELISA (antijen, antikor) sonuçları....21

Çizelge 4.4. Serum ve Gaita örneklerinin alındığı bölgeler ve ELISA sonuçları……..…….26

Çizelge 4.5. ELISA uygulanan ishalli buzağıların yaşlarının dağılımı……...26

Çizelge 4.6. ELISA ile antijen pozitif örneklerin yaşlarına göre dağılımı……..27

ŞEKİLLER

Şekil 1. ELISA uygulanan serum örneklerinde rotavirus antikor pozitif sonuçların pleyt üzerinde görünümü…….27

Şekil 2. ELISA uygulanan gaita örneklerinde rotavirus antijen pozitif sonuçların pleyt üzerinde görünümü…….28

KISALTMALAR

AGPT	: Agar Gel Presipitasyon Testi
BSC-1	: African Green Monkey Kidney Cell
°C	: Santigrat Derece
CaCo-2	: Colon Adenocarcinoma Cell Line-2
$CaCI_2$	: Kalsiyum Klorit
CFT	: Komplement Fikzasyon Testi
CPE	: Cytophatic Effect
CsCI	: Sesium Clorid
dk	: Dakika
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	: Elektron Mikroskopi
FAT	: Floresan Antikor Tekniği
HAI	: Hemaglütinasyon İnhibisyon Testi
HepG-2	: Human Hepatoma Cells
IEM	: İmmuno Elektron Mikroskopi
LA	: Lateks Aglütinasyon Testi
LLC-MK-2	: Rhesus Monkey Kidney
MA-104	: Monkey African-104 Hücre Kültürü
MDBK	: Madin Darby Bovine Kidney
MK-2	: Monkey Kidney-2 Hücresi
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PAGE	: Polyacrylamid Gel Electrophoresis Test
PK-15	: Pig Kidney
RPHA	: Reverse Pasif Hemaglütinasyon
SN	: Serum Nötralizasyon Testi
Vero	: African Green Monkey Kidney

1.GİRİŞ

Yeni doğan buzağıların akut gastroenteritis olayları, kapalı besi programları uygulanan büyük ve küçük işletmelerde sık rastlanan problemler arasında yer almaktadır. Yeni doğan buzağıların akut gastroenteritis tablosu ile seyreden enfeksiyonlarında rotaviruslar gerek morbidite gerekse mortalite yönünden önemli rol oynamaktadır (Yazıcı ve Akça 1993).

Yeni doğanlardaki ishal olaylarında enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan çok sayıda etken rol oynamaktadır. Enfeksiyöz karakterli ishal olgularından sorumlu olarak bildirilen rotavirus, coronavirus, astrovirus, calicivirus gibi enfeksiyonlar özellikle yoğun besicilik yapılan kapalı işletmelerde yeni doğanları tehdit eden faktörlerin başında gelmektedir (Garcia-Sanchez ve ark. 1993). Söz konusu viruslar arasında yer alan rotaviruslar, ishal etkeni olarak birçok türün yeni doğanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Goto ve ark. 1986).

Rotavirus enfeksiyonundan etkilenen hayvanlarda büyümenin gecikmesi, güçsüz buzağıların doğumu ve sürü içindeki mortalitenin yüksek düzeylere ulaşması ekonomik kayıpların temel nedenlerini oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda bazı sürülerde yeni doğan buzağılarda %50 kayıplara varan oranda ishalden etkilenme gözlenmiştir (Garcia-Sanchez ve ark. 1993).

Enfeksiyonu serolojik olarak Türkiye'de ilk kez Burgu ve Akça (1983) tespit etmişlerdir. Ayrıca yeni doğan ishalli buzağılarda virolojik olarak enfeksiyon varlığı Yazıcı (1992), Alkan ve ark. (1992), Burgu ve ark. (1995) ve Ekik (2002) tarafından tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, buzağılarda ishale neden olan viral ajanların en önemlilerinden biri kabul edilen rotaviruslar ele alınarak, ishal semptomları gösteren buzağılardan (0-6 ay) toplanan gaita örneklerinden rotavirus antijen varlığının, kan örneklerinden ise antikor varlığının ELISA ile belirlenmesi ve rotavirus enfeksiyonlarının Konya bölgesindeki yaygınlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Rotaviruslar ilk kez 1943 yılında Light ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, çocuklarda görülen bir ishal epidemisinde tespit edilmiştir (Joklik 1985). Daha sonra Mebus ve ark. (1971), yapmış oldukları bir çalışmada ishalli buzağılardan alınan gaitalar ile kolostrum almamış buzağılarda deneysel olarak enfeksiyonu oluşturmuşlar ve hastalık etkeninin filtre sisteminden geçebildiğini saptamışlardır.

Elektron mikroskopta tam bir rotavirus partikül görünüşünün kısa çubukları ile merkezi geniş bir araba tekerleğine benzemesinden dolayı, bu virus grubu Latince terminolojide tekerlek anlamına gelen *rota* kelimesi ile isimlendirilmiştir (Doneli ve Superti 1994).

Ojeh (1984), ishalli buzağılardan topladığı gaita örneklerinden hazırladığı süspansiyonu Monkey Kidney (MA-104) hücrelerine inokule ederek virusu üretmeyi başarmıştır. Araştırmacı fekal inokulumu hazırlamadan önce tripsin ile muamele etmiş ve idame vasatı içine de ilave olarak tripsin eklemiştir. Bovine rotavirus saha suşlarının sürekli olarak hazırlanması için MA-104 hücrelerini önermiştir.

Yurdumuzda rotavirus üzerinde ilk çalışmalar Burgu ve Akça (1983) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada rotavirus enfeksiyonlarının Ankara bölgesindeki dağılımını belirlemek amacıyla kan numunelerinden serum nötralizasyon testi ve hemaglutinasyon inhibisyon testleri karşılaştırılarak antikor tespitine gidilmiştir.

Alkan ve ark. (1992), ishalli buzağıların gaita örneklerinde Reverse Pasif Hemaglütinasyon (RPHA) testi ile rotavirus antijen varlığını tespit etmişlerdir.

Alkan (1998), ishalli buzağıların gaita örneklerinde ELISA ile rotavirus ve coronavirusları tespit etmiştir.

Ekik (2002), ishal semptomu gösteren buzağılardan topladığı gaita örneklerinde rotavirus antijen varlığını ELISA ile belirlemiş, bu buzağıların annelerinden alınan serum örneklerinde ise rotavirus antikorlarını serum nötralizasyon testi ile tespit etmiş ve rotavirus enfeksiyonlarının Konya bölgesindeki yaygınlığı konusunda fikir sahibi olunmasını sağlamıştır.

Rotaviruslar " Reoviridae" familyası içinde yer alır ve aynı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Rotaviruslar morfolojik olarak Reoviridae familyasındaki diğer viruslara benzemektedir fakat dış kenarlarının daha belirgin

olması ile onlardan ayrılmaktadır. Elektron mikroskopta tam bir rotavirus partikül görünüşünün kısa çubukları ile merkezi geniş bir araba tekerleğine benzemesinden dolayı, bu virus grubu Latince terminolojide tekerlek anlamına gelen *rota* kelimesi ile isimlendirilmiştir (Doneli ve Superti 1994).

Rotaviruslar 60-80 nm boyutlarında, çift katlı ikozahedral protein kapsit (iç ve dış tabaka) ve öz (core) kısmından oluşmaktadır (White ve Fenner 1986). Protein yapısındaki kapsit 32 adet kapsomerden meydana gelmiştir. Virus RNA'ya bağlı polimeraz bulundurur. Virusun genomu 11 segmentli çift zincirli RNA (ds RNA)' dır. Virus enfekte ettiği hücrelerin sitoplazmasında replike olur. Virusun invitro kültivasyonu için dış kapsit polipeptidinin yarılıp infektivitenin artması amacıyla proteolitik enzimlere (tripsin, elastin) ihtiyaç duyulur (Makabe ve ark 1985). Virionlar zarsızdırlar. Bu virionlar hücre lizisi ile enfekte hücrelerden serbest bırakılırlar (Estes ve ark. 1989).

Rotaviruslar A, B, C, D, E, F, ve G olmak üzere 7 farklı gruptan oluşmaktadır. Grup A, B ve C rotaviruslar hem insan hem de hayvanlarda sürekli olarak bulunurlar, buna karşılık grup D, E ve F sadece hayvanlarda bulunmaktadır (Paul ve Lyoo 1993).

Grup A rotaviruslar VP4 (P tipi) ve VP7 (G tipi) olarak iki yüzey proteinine sahiptir. Her ikisi de serotip determinasyonu, nötralizan antikorların oluşumu ve koruyucu immunite için önemlidir (Lu ve ark. 1995). Bugüne kadar, farklı VP7 antijenlerine bakılarak 14 serotip (G1-G14) tanımlanmıştır. Buna karşın, farklı VP4 antijenlerine göre ise 8 serotip (P1-P8) tespit edilmiştir (White ve Fenner 1986, Lee ve ark. 1998).

Rotaviruslar çift iplikçikli RNA içermekte olup, RNA çift sarmallı 11 segmentten oluşmaktadır. Bu segmentlerin molekül ağırlığı $11x\ 10^6$-$14x10^6$ dalton arasında değişmektedir. RNA segmentlerinin dış ölçüleri Elektron Mikroskopi (EM) tekniği ile ölçülmüş ve buna bağlı olarak 11 adet segmentin dört adet sınıflandırılması yapılmıştır. Daha sonra Poliakrilamid Gel Elektroforez (PAGE) tekniğinden yararlanılarak bu 11 segmentin migrasyon kabiliyetlerine göre 4 adet geniş, 2 adet orta, 3 adet küçük ve 2 adet daha küçük segment olarak sınıflandırması yapılmıştır. Tüm bu araştırmalara rağmen RNA migrasyon numuneleri bazı rotavirus gruplarından tanımlanabilecek kadar karakteristik değildir. Örnek olarak buzağı

rotaviruslarında 11. segment farklıdır ve 6. ile 7. segment arasına yerleşmiştir (Kapikian ve Chonock 1990).

Rotavirus enfektivitesi florokarbon ekstraksiyonu, eter ve deoxycholate muamelesi gibi yöntemlerden etkilenmez. Bundan başka viral partiküller tekrarlayan dondurma çözülme, sonikasyon veya 37°C'de 1 saat, oda ısısında (25°C) 24 saat muameleye nispeten dayanıklıdır. Kloroform muamelesi belirgin olmamakla beraber enfektiviteyi düşürür ve hemaglutinasyon aktivitesini yok eder (Donelli ve Superti 1994). Viral enfektivite etanol, fenol, formalin (%3), klorin, iodoform (%4) ve lizol (%5) gibi dezenfektanlar tarafından inaktive edilebilir. Sodyum dodesil sülfat (%0.1) enfektiviteyi inaktive eder, fakat noniyonik deterjanlar enfektiviteyi arttırırlar (Donelli ve Superti 1994).

Etkenin üretilmesinde en duyarlı hücre kültürleri primer hücre kültürleridir. Ayrıca MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), MK-2 (Monkey Kidney), Vero (African Green Monkey Kidney), MA-104 (Monkey Kidney), LLC-MK-2 (Rhesus Monkey Kidney), BSC-1 (African Green Monkey Kidney), PK-15 (Pig Kidney), CaCO-2 (İnsan Kolon Adenokorsinom Hücresi), HepG2 (Human Hepadoma Hücresi) ve Sekonder Sığır Böbrek Hücreleri diğer duyarlı hücre kültürleri arasında yer almaktadır (Ojeh 1984, Makabe ve ark. 1985, Goto ve ark. 1986). Günümüzde ise bu hücre kültürleri arasında en çok kullanılanları MA-104 ve MDBK devamlı hücre kültürleridir (Kapikian ve Chanock 1990).

Rotaviruslar yeni doğan hayvanlarda depresyon, zayıflık, sulu kıvamda ve sarı renkte akut ishal ile karakterize enfeksiyona neden olur (Bezek 1994). Rotaviruslar tüm dünyada yaygın olarak görünmekte olup, geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir. Enfeksiyon spektrumu içinde yeni doğan buzağılar, taylar, kuzular, domuzlar, maymunlar, geyikler, kanatlı hayvanlar, bebekler, yetişkinler ve çeşitli deney hayvanları yer almaktadır (Bezek 1994).

Hastalığın prognozu hafif ve komplike olmayan olaylarda iyi seyirlidir ve 24-48 saat içinde iyileşme görülebilir. Rotavirus enfeksiyonlarının seyrini etkileyen faktörler arasında enfeksiyonun diğer etkenlerle komplike olması, yeni doğanların sütten kesilme zamanları, iklim şartları, buzağıların hemen doğumdan sonra kolostrum alıp almamaları ve hayvanların immünite durumları sayılabilir (McNulty 1978, Blood ve ark. 1983).

Rotavirus enfeksiyonlarında virus izole etmek amacıyla toplanan gaita örneklerinde bu virusla birlikte sekonder olarak birçok enteropatojenik ajan da izole edilmektedir. Bu ajanlar arasında *Escherichia coli,* Coronaviruslar önemli bir yer işgal etmektedir. Ayrıca *Salmonella*, Clostridia, Criptosporidium gibi etkenler de önemli ajanlardandır. Bu şekilde kombine bir enfeksiyon hastalığın prognozunu oldukça kötü hale getirmektedir (Walker ve ark. 1998).

İntestinal sistem rotavirusların çoğalma bölgesidir ve virus sadece gaitada bulunur. Enfekte hayvanların gaitalarında %60-80 oranında virus izole edilmektedir. Enfekte bir gaita ile 10^{16} partikül/g virus saçıldığı tespit edilmiştir. İnsan ve hayvanların enfeksiyonu bireysel olarak enfekte bireylerle ve kontamine malzemelerle temas sonucu oluşur. Rotaviruslar dışkıda uzun süre dayanıklı olarak kalırlar (McNulty 1978).

Enfeksiyonun yayılışı ve hastalığın şiddetinde, çevresel kontaminasyon, virus suşu, dozu, temizlik, dezenfeksiyon işlemleri ve diğer sekonder patojenlerin etkileri önemlidir. Öte yandan yetişkin sığırlar, sürülerde enfeksiyonun yayılışında önemli role sahiptir (Garcia-Sanchez ve ark. 1993).

İnsan ve hayvanlarda rotavirus ishalleri için sezona bağlı bir insidans söz konusudur. Her iki yarı kürede de mevsime bağlı insidansın en yüksek olduğu aylar sonbahar ve ilkbahar aylarıdır (McNulty 1978).

Rotavirus ile enfekte olan hayvanlarda enfeksiyon genellikle subklinik seyretmektedir (Kapikian ve Chanock 1990). Enfeksiyonda mortalite düşüktür. Ancak gerekli tedbirler alınmazsa bu oran %50'ye ulaşabilmektedir (Garcia-Sanchez ve ark. 1993).

Rotaviruslar ince bağırsaktaki epitel hücrelerine girerek çoğalmaya başlar ve bunun sonucu olarak hücrelerin taşıma mekanizması bozulur (Blood va ark. 1983). Birçok hayvan türünün deneysel olarak enfekte edildiği çalışmalarda, virusun özellikle ince bağırsağın olgun, fonksiyonel, absorbsiyon yeteneğine sahip, villöz epitel hücrelerini etkilediği görülmüştür (Bridger ve ark.1992).

Rotaviruslar olgun enterositleri etkileyerek villilerin yüzeyine lokalize olurlar. Partiküller sitoplazmada görülür, genellikle endoplazmik retikulum boşluğunu genişletirler. Virus burada granular yığınlar veya ince fibriler virus prekürsörleri olarak (Viroplasm) bu boşlukların dışında bulunur ve partüküler boşluklardan geçerek

serbest kalır. Bazen de endoplazmik retikulumdan tomurcuklanarak zar kazanırlar. Viral çoğalma, villilerin gelişmesine engel olan ve hücrelerin büyük miktarlarının füzyonuna neden olan dejeneratif değişikliklerin başlaması ile oluşur. Düz ve yassı epitel kübik ve jelsi olan enterositler ile yer değiştirirler ve bu epitelde kriptleri gelişmemiş hücreler oldukça fazla bulunmaktadır. Birçok şiddetli olayda villuslar aşınabilir. Patolojik seyir jejinum üzerinden başlayabilir ve ileum boyunca ilerler, bunun olmadığını belirten diğer araştırmacılara rağmen Mebus ve ark. (1971) tarafından kıvrımlarda harabiyet olduğu belirlenmiştir. Suşlar arasında patojenik varyasyonlar vardır. Bazı suşlar sadece üst jejinum boyunca sınırlı kalırken, diğer suşlar ince bağırsak boyunca ilerleyerek harabiyete neden olurlar (Hall ve ark. 1993).

Enfeksiyon sırasında görülen ishalin en büyük nedeninin, tahrip olan bağırsak hücrelerinin yerini alan olgunlaşmamış hücrelerdeki yetersiz sodyum ve glikoz absorbsiyonundan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu değişikliğe bağlı olarak hayvanlarda ishal, dehidrasyon ve çeşitli metabolik bozukluklar oluşmaktadır (Kapikian ve Chonock 1990).

İnce bağırsak villilerinin etkilenmesi sonucu bağırsak lümeninde laktoz gibi disakkaritlerin enzimlerinin azalması ve glikoza bağlı Na taşınımının durması meydana gelir (Hall ve ark. 1993). İnce bağırsakta enfeksiyon sırasında tahribat şekillenen bölgelerde laktaz enziminin seviyesindeki düşüşe bağlı olarak yeni doğan hayvanlarda ve bebeklerde laktoz intolerans şekillenmez ve bu durumda ishalin şiddetini arttırır. İntestinal kanal epitel hücrelerinde bulunan laktaz enziminin bir kombine reseptör ve rotavirus için dıştaki proteini parçalayan bir enzim olarak görev yapması sonucu ince bağırsakta bulunan epitel hücrelerindeki azalmaya bağlı olarak rotavirusların çoğalma yeteneğinde artma meydana gelmektedir (McNulty 1978).

İnce bağırsaktaki değişimler bağırsağın fonksiyonlarını etkiler. Özellikle jejinumda laktoz sindiren mukozanın kapasitesinde azalma ile sonuçlanan, laktazı daha az bulunduran ve olgun olmayan eritrositlerle yer değiştirerek, diğer laktaz bulunduran enterositlerin kaybına neden olur. İnce bağırsağın yüzey alanı azalır, laktozun sindiriminde rol oynayan glikoz ve galaktozun absorbe edilme yeteneğinde azalma olur. Böylece laktoz gaitadan suyun emilimine engel olan hipertonisite nedeniyle kalın bağırsaklarda birikir ve su kaybının artmasına, bunun sonucu olarak da dehidrasyona katkıda bulunur (Hall ve ark. 1993).

Rotavirus enfeksiyonları, buzağıların yaygın olarak görülen sarı renkli sulu ishal, dehidrasyon, kilo kaybı, iştahsızlık, depresyon, metabolizma bozuklukları ile karakterize, ince bağırsak epitellerinde hasar meydana getirerek, çeşitli komplikasyonlara ve gerekli tedbirler alınmazsa ölüme yol açan viral bir enfeksiyondur (Blood ve ark. 1983, Bezek 1994).

Rotavirus enfeksiyonları çoğunlukla 1-8 haftalık buzağılarda sulu, sarı renkli ishalle karakterizedir. İnkubasyon periyodu nispeten kısa ve 15 saatten 3-4 güne kadar değişmektedir. İnsan ve hayvanlarda ishal, depresyon, anoreksi görülür. Kusma, insan ve domuz yavrularında bildirilmiştir. Bazen 39°C'lik bir ateş görülebilir (Rodger ve ark. 1982, Walker ve ark. 1998).

Tüylerde düzensizlik ve keçeleme dikkati çeker, hastalık sırasında oluşan diareye bağlı olarak dehidrasyon ve sıvı elektrolit dengesinde bozulma, gerekli tedbirler alınmazsa hipovolemik şok ve metabolik asidoz sonucu ölüm şekillenir (Blood ve ark. 1983).

Klinik belirtilerin başlamasından itibaren 48 saat sonra kardiyak verim, vuruş hacmi, sentral venöz basınç, plazma hacmi, kan pH'sı bikarbonat konsantrasyonu ve serumklorit konsantrasyonu azalır. Plazma laktat konsantrasyonu, hematokrit değer ve serum potasyum, kreatin, fosfor, totalprotein ve albumin konsantrasyonları artar (Walker ve ark. 1998).

Hastalığın prognozu hafif ve komplike olmayan olaylarda iyi seyirlidir ve 24-48 saat içinde iyileşme görülebilir. Ancak sekonder enfeksiyonlar devreye girerse komplikasyonlara bağlı olarak ölüm olabilir (Blood ve ark. 1983).

Rotaviral gastroenteritiste doğal rezistans, yaşla ilgili olabilmektedir. Yeni doğanlar, hayatın ilk haftaları boyunca enfeksiyona daha duyarlıdırlar. Yaşlı hayvanlar genç hayvanlardan daha immun durumdadırlar (Paul ve Lyoo 1993).

Hayvanlarda doğal bir enfeksiyonu takiben aktif immunite gelişir. İmmunite genellikle serotip spesifiktir. Ayrıca düşük düzeyde heterotipik immunite de gelişmektedir. Humoral, mukozal ve hücresel immunite doğal ve deneysel enfeksiyonu takiben belirlenmiştir. Mukozal immunite, sekresyonda antikorların oluşumu ile ilgili olarak rotavirus enfeksiyonlarına karşı korunmada primer öneme sahiptir. Nötralizan antikorlar, intestinal sistemde rotavirus enfeksiyonlarından korunma ile ilgilidir. Sekrotorik IgA, IgG ve IgM'den daha etkilidir. Çünkü IgA

intestinal kanalda proteolitik yıkımlanmaya daha dirençlidir ve birçok hayvan türünde süt sekresyonunda predominant immunoglobulindir. Mukozal immunite genel olarak oral immunizasyon ile en iyi şekilde sağlanır. Sirkülasyondaki antikorlar çoğunlukla koruyucu değildir (Paul ve Lyoo 1993).

Rotaviral enfeksiyonlardan etkilenen hayvanları korumak amacıyla sütteki antikorların laktojenik immunitenin stimule edilmesiyle artırılması başarılı bir yaklaşım olmaktadır. Aktif immunite, özellikle mukozal immunite, homolog bir serotiple rotavirus enfeksiyonun tekrarlaması durmunda yaşlı hayvanları korumaktadır (Paul ve Lyoo 1993).

Hastalık semptomlarının başlamasından itibaren 2 gün içinde insan serumunda immunofloresan testi ile belirlenebilen antikorlar tespit edilmiştir. Ayrıca re-enfeksiyondan korunmada, antikor dolaşımından daha önemli olanın virusa karşı ince bağırsak epitelinden salgılanan sekretorik lokal IgA yapısındaki antikorlar ile lokal immunitenin artışının önemli olduğu bildirilmiştir (McNulty 1978).

Rotavirus enfeksiyonları hayvanlarda viremi dönemi oluşturmadan lokal olarak seyreden bir enfeksiyondur. Enfeksiyonun önlenmesi, ince bağırsaklarda lokal bağışıklığın oluşmasına bağlıdır. Rotavirusun neden olduğu diyare için risk süresi 14 gün kadardır ve 7-8 günde pik düzeye ulaşır. Bu süre içinde ince bağırsaklarda anti-rotavirus antikorlarının gün olarak sağlanması gerekmektedir. Anti-rotavirus antikorları günlük olarak alındığında kritik periyot süresince gastro-intestinal sistemde antiviral korunma gerçekleşir. Ayrıca yüksek titrede antiviral antikorlar içeren zenginleştirilmiş kolostrum vererek IgG rezervi oluşturulup buradan bağırsak lümenine gerekli miktarın günlük olarak transferi sonucu antikor oluşumu sağlanır. Böylece laktojenik antikorlara bağımlı kalınmaması sağlanır (Besser ve ark. 1988).

Rotavirusa karşı aşılanmış annelerden elde edilen kolostrumla beslenmiş olan buzağılarda pasif bir immunite gelişir (Kuroki ve ark. 1997). Kolostrum yolu ile enfeksiyona karşı bir korunma sağlanabilmesi için kolostral antikorların belirli bir titre düzeyine ulaşması gerekmektedir (McNulty 1978, Blood ve ark. 1983). Ayrıca serumda yer alan antikorlar da korunmada o kadar etkili bir role sahip değildir. Yalnızca çok yüksek antikor titresine ulaştığı zaman bağırsak lümenine geçebilmektedir (Besser ve ark. 1988).

Perk ve ark. (2000), diyarenin buzağıların yaşamlarının ilk günlerinde ortaya çıkışını önlemede, buzağı aşılarının kullanımının pratik olmadığını, bu dönemde aktif immunitenin yeterince gelişmediğini tespit ederek, korunmada en önemli kriterin canlı aşılama ve kolostrumla sağlanabilecek pasif immunite olduğunu ifade etmişlerdir.

Rotaviruslar tarafından oluşturulan enfeksiyonların teşhisi amacıyla kullanılan metodlar arasında Immuno Elektron Mikroskobi (IEM) (Cheung ve ark. 1982, Benfield ve ark. 1984, Athanassious ve ark. 1994, Burgu ve ark. 1995, Greig ve ark. 2006), Floresan Antikor Tekniği (FAT) (Benfield ve ark. 1984, Dea ve ark. 1984), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Hammond ve ark. 1982, Rubenstein ve Miller 1982, Reynolds ve ark. 1984, Moosai ve ark. 1985, Edwards ve ark. 1987, Garcia-Sanchez ve ark. 1993, Ekik 2002, Roman ve Martinez 2005), Agar Gel Presipitasyon Testi (AGPT) (Shah ve Jhala 1990), Hemaglutinasyon Inhibisyon Testi (HAI) (Burgu ve Akça 1983, Murakami ve ark. 1987, Piednoir ve ark. 2003), Poliakrilamid Jel Elektroforez Testi (PAGE) (Edwards ve ark. 1987, Singh ve Pandey 1988, Garcia-Sanchez ve ark. 1993, Kebaabetswe ve ark. 2005), Lateks Aglutinasyon Testi (LA) (Jensen 1985, Moosai ve ark. 1985, Sukura ve Neuvonen 1990, Jyothirlatha ve ark. 1992, Pazdiora ve ark. 2002), Reverse Pasif Hemaglutinasyon Testi (RPHA) (Sanekata ve ark. 1982, Edwards ve ark. 1987, Alkan ve ark. 1992, Fujii ve ark. 2000), Immuno Peroksidaz Testi (IPS) (Weber ve ark. 1992), Polimeraz Chain Reaksiyonu (PCR) (Hussein ve ark. 1995), Komplement Fikzasyon Testi (CFT) (Nagano ve ark. 1984) önemli yer tutmaktadır. Serum Nötralizasyon (SN) Testi de serolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Schlafer ve Scott 1979, Burgu ve Akça 1983, Yazıcı ve Akça 1993).

Benfield ve ark. (1984) ELISA, FAT ile IEM tekniklerini karşılaştırmak amacıyla sığır ve domuz rotavirusları üzerinde yaptıkları bir çalışmada 73 sığır ve 116 domuz örneğini incelemişlerdir. Bunun sonucunda ise sığır örneklerinin ELISA ile 66'sında (%90) IEM ile 69'unda (%96) ve FAT ile 11'inde (%34) pozitif sonuç; domuz örneklerinin ELISA ile 62'sinde (%53), IEM ile 109'unda (%94) ve FAT ile de 54'ünde (%57) pozitif sonuç bulmuşlardır. IEM tekniğinin rotavirusun belirlenmesinde ELISA ve FAT'ne göre daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir.

Alkan ve ark. (1992), ishalli buzağılardan topladıkları 97 adet gaita örneğinde RPHA testi yardımıyla rotavirus varlığını araştırmışlar ve bunlardan 26 (%26.8) adedinde pozitif sonuç elde etmişlerdir.

Garcia-Sanchez ve ark. (1993), 15 anneden buzağılamadan önce ve sonra, bunların buzağılarından da doğumdan iki haftalık olana kadar, günlük olarak dışkı örnekleri toplamışlar ve bu örnekleri PAGE, ELISA ve LA testleri yardımı ile rotavirus yönünden incelemişler ve testleri karşılaştırmışlardır. Bu testlerin hiçbirinde annelerden rotavirus tespit edemediklerini ancak buzağılardan toplanan 240 örneğin 80 tanesinde (%33) rotavirus varlığı belirlediklerini ve bu teslerin arasında sonuçlar bakımından benzerlik olduğunu ifade etmişlerdir.

Burgu ve ark. (1995), yoğun besicilik yapılan kapalı işletmelerden ve halk elindeki yeni doğmuş ishalli buzağılardan rotavirus varlığını IEM, ELISA ve PAGE teknikleri ile araştırmışlardır. Bu çalışmada kapalı işletmelerden alınan 78 ishalli buzağı örneğinin 31 (%41)'inde ve halk elinde bulunan 29 buzağının 5 (%17)'inde her üç testten en az biri ile pozitif sonuç elde etmişlerdir. Yaptıkları serolojik kontrollerde ise serum alınan 80 buzağının 36 (%45)'sında ve bu hayvanların annelerinin ise 19 (%28.3)'unda rotavirusa karşı nötrolizan antikorlar belirlemişlerdir.

Ekik (2002), yaptığı çalışmada, ishal semptomu gösteren 186 buzağıdan sağlanan gaita örneklerinin ELISA ile kontrolü sonucu 30 (%16.12)'unu rotavirus antijenleri yönünden pozitif bulmuş, buzağıların annelerinden alınan 186 adet kan serumu örneğinde ise mikronötralizasyon yöntemi ile %100 oranında rotavirus antikorları yönünden pozitiflik tespit etmiştir. ELISA uygulamalarının kolay, güvenilir ve hızlı bir teşhis metodu olduğunu ifade etmiştir.

Günümüzde büyük önem kazanan rotavirus enfeksiyonlarında, hızlı teşhis metodları sık olarak kullanılmaktadır. Bu metodlar arasında en çok tercih edilenler ELISA, PAGE ve IEM'dir (Edwards ve ark. 1987, Sukura ve Neuvonen 1990).

Rotavirus enfeksiyonlarının kontrolünde hijyen ölçüleri tek başına özellikle çiftlik hayvanları ile ilgili olarak oldukça yetersiz kalır. Buna enfekte dışkılarda virus partiküllerinin büyük miktarları, virusun stabilitesi ve yaş rezistansının olmayışı neden olabilir. Kolostral antikor miktarının yeterli miktarda olmaması da önemli bir faktördür (McNulty 1978).

Canlı attenüe edilmiş buzağı rotavirus aşısı ticari olarak kullanılmaktadır. Bu aşı doğumdan hemen sonra buzağılara oral olarak verilir. Aşı deneysel olarak virulent saha virusu ile etkilenen kolostrum almış gnotobiotik buzağıları korumuştur. İnsan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan rotavirus suşları arasında kros nötralizasyon oldukça zayıftır. Her bir tür için farklı aşıların hazırlanması gerekmektedir (McNulty 1978, Paul ve Lyoo 1993).

Aşılamaya alternatif bir yaklaşım olarak da ayrıca inaktive aşılarla aşılanmış anneler incelenmiştir. Aşılama belirtisi olarak rotavirusa karşı serum nötralizan antikor titreleri artmıştır. Korunma buzağıların intestinal boşluklarında kolostral antikor seviyelerinin artması ile mümkün olmuştur (McNulty 1978).

Rotavirus antikor tedavisinde ilk etapta oluşan ishal ve kusma sonucu şekillenen sıvı elektrolit dengesi ve metabolizma bozukluklarının önüne geçmek amacıyla oral ve parenteral sıvı tedavisi yapılmalıdır. Enfeksiyonun sekonder bir bakteriyel ajanla mix olarak oluşabileceği dikkate alınmalıdır. Çünkü ölüm olaylarının en büyük nedeni budur. Bu nedenle sıvı tedavisi parenteral olarak antibiyotik tedavisi ile de desteklenmelidir (Blood ve ark. 1983).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. İshalli Buzağıların Gaita Örnekleri

Çalışmada Konya Merkez, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik ve Çiftliği, Akşehir ve Sarayönü ilçelerinden tamamı kolostrum almış ishal semptomu gösteren 0-6 ay arasındaki yaşlarda olan 106 adet ishalli buzağıdan alınan gaita örneği kullanıldı (**Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.**). Araştırmada kullanılan buzağıların genelinde hastalığın ilk günlerinde örnekleme yapıldı. Gaita örnekleri alınan buzağıların sahiplerinden bu hayvanların hepsinin ishal, halsizlik ve bitkinlik belirtileri gösterdiği bilgisi alındı. Tek kullanımlık gaita kaplarına toplanan örnekler kayıtları tutulduktan sonra -20^{o}C'de derin dondurucuda depolandı.

3.2. İshalli Buzağıların Serum Örnekleri

Gaita örneklemesi yapılan tüm buzağılardan aynı zamanda antikor-ELISA yapmak amacıyla kan örnekleri de alındı. Kan örnekleri laboratuvara getirildikten sonra etrafları çizilerek bir saat etüvde 37^{o}C'de bekletildi. Sonra 5-10 dk süre ile 2000-3000 devir/dk santrifüj edildi. Alınan serumlar, sterilite kontrolleri yapıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -20^{o}C'de derin dondurucuda depolandı.

Çizelge 3.1. Gaita ve Serumlarında rotavirus antijen ve antikor varlığı araştırılan ishalli buzağıların bulundukları bölgelere göre dağılımları.

Alındığı Yer	**Sayısı**
Konya Merkez	86
Akşehir İlçesi	14
Sarayönü İlçesi	6

Çizelge 3.2. Gaita ve Serum örnekleri alınan ishalli buzağıların yaş gruplarına göre dağılımları.

Örnekleme yapılan buzağıların yaşları (gün)	**Örnek sayısı**	**Toplam buzağılara göre yüzde (%)**
0-15	30	28.30
15-30	25	23.58
30-45	21	19.81
45-60	13	12.26
60-120	10	9.43
120-180	7	6.60
Toplam	106	100

3.3. ELISA Testleri

3.3.1. Rotavirus antijeninin belirlenmesi için ELISA'nın yapılışı

Bu amaçla hazır ticari ELISA Test kiti Rotavirus ELISA Kit (BioX Diagnostic-Site du Complexe des Postes-22. rue. Wastes-5580 Jernelle-Belgique) kullanıldı ve çalışma test prosedüründe belirtilen şekilde yapıldı.

Çalışmaya başlamadan 1 saat önce solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi. Tampon solüsyon 1/5 oranında hazırlandı. Gaita örnekleri mikropleytin gözlerine koyuldu ve üzerine 1/5 oranında hazırlanmış tampon solüsyondan 100µL ilave edildi. 10 dk doğal süzme yapıldıktan sonra üstte bulunan sıvı kısımdan 100µL alındı. ELISA uygulanan mikropleytin A1 gözünde rotavirusa özgü antikorlar, B1 gözünde rotavirusa özgü olmayan antikorlar bulunmaktaydı. Alınan sıvı kısım 1. örnek A1 ve B1, 2. örnek C1 ve D1 olmak şartı ile her örnekten ikişer göze 100µL koyuldu. Kitte hazır bulunan pozitif kontrolden ikişer göze 100µL koyuldu. Hazırlanan pleyt 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Birinci inkübasyon tamamlandıktan sonra pleyt hızlıca lavaboya döküldü ve gözler tamamen boşaltıldı. 1/20 oranında hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan her göze 100µL eklendi yıkama yapıldı ve lavaboya boşaltıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Konjugat, tampon solüsyonu ile 1/50 oranında karıştırıldı ve her göze 100µL ilave edildi. Pleyt 1 saat oda sıcaklığında bekletildi ve ikinci inkübasyon tamamlandı. Pleyt daha önce tarif edildiği gibi 1 kez daha yıkama solüsyonu ile yıkandı. Kromojen, substrat solüsyonu ile 1/20 oranında karıştırılarak indikatör solüsyonu hazırlandı ve her göze 100µL ilave edildi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi ve her göze 50µL durdurucu (stop solüsyon) ilave edildi. ELISA okuyucusu ile 450 nm dalga boyu üzerinden sonuçlar okundu.

3.3.1.1. ELISA sonucu

Testin sonucu: Rotavirusa özgü antikorların bulunduğu gözlerden çıkan optik dansite değeri rotavirusa özgü olmayan antikorların bulunduğu gözlerden çıkan optik dansite değerlerinden çıkarıldığında sonuçlar 0.150'den büyük ve eşitse pozitif olarak, 0.150'den küçük ise negatif olarak alındı.

R(+) – R(-) > 0.150 veya R(+) – R(-) = 0.150 ise pozitiflik
R(+) – R(-) < 0.150 ise negatiflik dikkate alındı.

3.3.2. Rotavirus antikorlarının belirlenmesi için ELISA'nın yapılışı

Bu amaçla hazır ticari ELISA Test kiti bio-x Rotavirus ELISA kit (BioX Diagnostic-Site du Complexe des Postes-22. rue. Wastes-5580 Jernelle-Belgique) kullanıldı ve çalışma test prosedüründe belirtilen şekilde yapıldı.

Çalışmaya başlamadan önce solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi. Kan serumları 1/20 oranında tampon solüsyonu ile seyreltildi. Serumdan 0.5µL tampon solüsyonundan 0.95µL her göze ilave edildi. Pozitif kontrol ve negatif kontrollere 0.5ml (500µL) distile su ilave edip yapılandırıldı ve belirlenen gözlere 100µL ilave edildi. Konjugat, tampon solüsyonu ile 1/20 oranında karıştırıldı ve her göze 100µL ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra pleyt hızlıca lavaboya döküldü ve gözler tamamen boşaltıldı. 1/20 oranında hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan her göze 100µL eklendi yıkama yapıldı ve lavaboya boşaltıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Kromojen, substrat solüsyonu ile 1/20 oranında karıştırılarak indikatör solüsyonu hazırlandı ve her göze 100µL ilave edildi. 10dk oda sıcaklığında bekletildi ve her göze 50µL durdurucu (stop solüsyon) ilave edildi. ELISA okuyucusu ile 450 nm dalga boyu üzerinden sonuçlar okundu.

3.3.2.1. ELISA sonucu

Testimizde sonuçlar için aşağıdaki formül kullanıldı:
% örnek: (OD negatif – OD örnek/OD negatif) x 100 formülüne göre değerlendirildi.

Hesaplanan Değer	Pozitif Sonuç
% inh < 20	0
20<=% inh<40	+
40<=% inh<60	++
60<=% inh<80	+++
80<=% inh	++++

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. ELISA Sonuçları

4.1.1. Gaita örneklerinin ELISA sonuçları

Rotavirüs antijenleri yönünden ELISA ile kontrol edilen ishal semptomlu buzağılara ait 106 adet gaita örneğinden 9 adedi (%8.50) rotavirus antijeni yönünden pozitif olarak bulundu.

4.1.2.Serum örneklerinin ELISA sonuçları

Rotavirüs antikoru yönünden ELISA ile kontrol edilen ishal semptomlu buzağılara ait 106 adet serum örneğinden 90 adedi (%84.90) rotavirus antikoru yönünden pozitif olarak bulundu.

4.1.3. Değerlendirme

ELISA okuyucusundan elde edilen optik dansite değerleri, gaita ve serum örneklerinin pleytlere dizilişi Çizelge 4.1, 4.2'de, Gaita ve Serum örneklerinin ELISA sonuçları Çizelge 4.3'de, Gaita ve Serum örneklerinin alındığı bölgeler ve ELISA ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de, ELISA uygulanan ishalli buzağıların yaşlarının dağılımı Çizelge 4.5'de, ELISA ile antijen pozitif olan örneklerin yaşlarının dağılımı Çizelge 4.6'de ve Gaita ve Serum örneklerinin ELISA sonucu playtlerdeki görünümü Şekil 1 ve 2'de gösterildi.

Gaita ve serum örneklerinin ELISA sonuçları Çizelge 4.3 incelendiğinde, serum örneklerinden 90 adet seropozitif, 16 adet seronegatif gaita örneklerinden 9 adet antijen pozitif 97 adet antijen negatif sonuç bulundu. Araştırmamızda kullanılan örneklerden 86 adet kapalı işletmelerden 20 adet küçük işletmelerden alındı.

Çizelge 4.1.a. Serum örneklerinin playtlere dizilişi

PLEYT 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	PK	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
B	NK	NK	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
C	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
D	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
E	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
F	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
G	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45
H	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38	46	46

PLEYT 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	PK	53	53	61	61	69	69	77	77	85	85
B	NK	NK	54	54	62	62	70	70	78	78	86	86
C	47	47	55	55	63	63	71	71	79	79	87	87
D	48	48	56	56	64	64	72	72	80	80	88	88
E	49	49	57	57	65	65	73	73	81	81	89	89
F	50	50	58	58	66	66	74	74	82	82	90	90
G	51	51	59	59	67	67	75	75	83	83	91	91
H	52	52	60	60	68	68	76	76	84	84	92	92

PLEYT 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	PK	99	99								
B	NK	NK	100	100								
C	93	93	101	101								
D	94	94	102	102								
E	95	95	103	103								
F	96	96	104	104								
G	97	97	105	105								
H	98	98	106	106								

Çizelge 4.1.b. Serum örneklerinin ELISA okuyucusunda elde edilen optik dansite sonuçları

PLEYT 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.056	0.052	.963	.899	1.021	1.156	.086	.124	.478	.368	.348	.444
B	1.212	1.163	1.001	1.123	1.003	.969	.654	.589	.578	.514	.205	.297
C	.546	.452	.878	.966	1.321	1.075	.369	.498	.344	.259	.377	.408
D	.213	.247	.456	.502	.300	.364	.099	.129	.374	311	.318	.389
E	.123	.096	.321	.345	.125	.238	.235	.298	.549	.602	.222	.296
F	.998	1.012	.137	.128	.837	.907	.458	.399	.765	.638	.099	.168
G	.796	.856	.965	.989	.999	1.067	.366	.347	.477	.502	.589	.612
H	1.238	1201	.999	1.063	.1.036	1.145	.215	.301	.147	.159	.455	.423

PLEYT 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.050	0.053	.163	.232	.631	.546	1.065	.947	.742	.734	.657	.547
B	1.178	1.145	.351	.298	.715	.699	.902	.936	.566	.518	.471	.503
C	.234	.357	.472	.359	.847	.797	.764	.698	.488	.413	.471	.420
D	.248	.299	.263	.307	.342	.396	.544	.600	.357	.289	.517	.550
E	.103	.185	.356	.311	.467	.527	.941	.899	.385	.329	.975	.726
F	.063	.097	.214	.289	.914	1.002	1.134	.1.189	.431	.383	.145	.144
G	.168	.189	.161	.216	.652	.587	.554	.495	.587	.645	1.100	1.005
H	.203	.156	.466	.431	.328	.304	.321	.279	.766	.682	.292	.223

PLEYT 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	.051	.050	1.079	.910								
B	1.184	1.156	.188	.273								
C	.323	.276	.533	.458								
D	.173	.216	.346	.346								
E	.661	.649	.955	.889								
F	.299	.318	.557	.519								
G	.975	1.282	.106	.146								
H	.497	.545	.313	.253								

Çizelge 4.2.a. Gaita örneklerinin pleytlere dizilişi

PLEYT 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44
B	NK	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44
C	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41	45
D	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41	45
E	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46
F	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46
G	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43	47
H	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43	47

PLEYT 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	51	55	59	63	67	71	75	79	83	87	91
B	NK	51	55	59	63	67	71	75	79	83	87	91
C	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92
D	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92
E	49	53	57	61	65	69	73	77	81	85	89	93
F	49	53	57	61	65	69	73	77	81	85	89	93
G	50	54	58	62	66	70	74	78	82	86	90	94
H	50	54	58	62	66	70	74	78	82	86	90	94

PLEYT 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	98	102	106								
B	NK	98	102	106								
C	95	99	103									
D	95	99	103									
E	96	100	104									
F	96	100	104									
G	97	101	105									
H	97	101	105									

Çizelge 4.2.b. Gaita örneklerinin ELISA okuyucusunda elde edilen optik dansite sonuçları

PLEYT 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.175	.101	.075	.275	.076	.096	.083	.071	.095	.106	.074	.073
B	.064	.105	.065	.240	.084	.084	.079	.068	.083	.116	.071	.074
C	.116	.092	.108	.091	1.850	.072	.086	.078	.064	.181	.093	.081
D	.085	.099	.113	.087	.088	.065	.088	.085	.066	.185	.083	.083
E	.088	1.928	.081	1.683	.088	1.731	.094	.081	.068	.096	.088	.085
F	.071	.078	.088	.080	.099	.095	.093	.083	.077	.104	.087	.088
G	.075	.102	.094	1.938	.101	.088	.081	.077	.098	.073	.065	.085
H	.064	.107	.071	.069	.091	.085	.088	.081	.093	.075	.075	.071

PLEYT 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.120	.095	.088	.068	.114	.081	.075	.080	.078	.086	.136	1.990
B	.062	.064	.084	.064	.120	.078	.065	.069	.080	.086	.132	.070
C	.094	.088	.081	.093	.085	.082	.077	.078	.088	.088	.068	.066
D	.095	.065	.078	.077	.081	.088	.068	.074	.073	.081	.074	.064
E	.088	.082	.098	.077	.074	.088	.076	.090	.070	.097	.073	.090
F	.091	.071	.104	.071	.072	.085	.078	.064	.068	.088	.071	.075
G	.086	.066	.093	.086	.085	.084	2.080	.064	.085	.076	.112	.079
H	.078	.070	.075	.088	.082	.075	.082	.073	.078	.071	.082	.070

PLEYT 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.150	.082	.092	.075								
B	.066	.071	.073	.069								
C	.080	2.124	.088									
D	.073	.068	.090									
E	.094	.088	.084									
F	.081	.068	.071									
G	1.462	.140	.068									
H	.068	.075	.072									

Çizelge 4.3. Serum ve Gaita Örneklerinin ELISA (antijen, antikor) Sonuçları

*** K:** Kapalı İşletme
*** Kİ:** Küçük İşletme

Örnek Numarası	**Yetiştirme Durumu**	**Serum Sonuçları**	**Gaita Sonuçları**
1	K	++	-
2	K	++++	-
3	K	++++	-
4	**K**	**0**	-
5	K	+	-
6	**K**	**0**	**+**
7	K	+	-
8	**K**	**0**	-
9	K	+	-
10	K	++	-
11	K	+++	-
12	K	++++	-
13	**K**	**0**	-
14	**K**	**0**	**+**
15	**K**	**0**	**+**
16	**K**	**0**	-
17	**K**	**0**	**+**
18	K	+++	-
19	K	++++	-

20	K	+	-
21	**K**	**0**	-
22	**K**	**0**	**+**
23	K	++++	-
24	K	++	-
25	K	+++	-
26	K	++++	-
27	K	+++	-
28	K	+++	-
29	K	+++	-
30	K	+++	-
31	K	+++	-
32	K	++	-
33	K	+++	-
34	K	+++	-
35	K	++	-
36	K	++	-
37	K	++	-
38	K	++++	-
39	K	+++	-
40	K	+++	-
41	K	+++	-
42	K	+++	-

43	K	+++	-
44	K	++++	-
45	K	++	-
46	K	+++	-
47	K	+++	-
48	K	+++	-
49	K	++++	-
50	K	++++	-
51	K	++++	-
52	K	++++	-
53	K	++++	-
54	K	+++	-
55	K	+++	-
56	K	+++	-
57	K	+++	-
58	K	+++	-
59	K	++++	-
60	K	+++	-
61	K	++	-
62	K	+	-
63	K	+	-
64	K	+++	-
65	K	++	-

66	**K**	**0**	-
67	K	++	-
68	K	+++	-
69	**K**	**0**	-
70	K	+	-
71	K	+	-
72	K	++	-
73	K	+	-
74	**K**	**0**	**+**
75	K	++	-
76	K	+++	-
77	K	+	-
78	K	++	-
79	K	+++	-
80	K	+++	-
81	K	+++	-
82	K	+++	-
83	K	++	-
84	K	+	-
85	K	++	-
86	K	++	-
87	Kİ	+++	-
88	Kİ	+++	-

89	Kİ	+	-
90	Kİ	++++	-
91	**Kİ**	**0**	**+**
92	Kİ	+++	-
93	Kİ	+++	-
94	Kİ	++	-
95	Kİ	+++	-
96	Kİ	++++	-
97	**Kİ**	**0**	**+**
98	Kİ	++	-
99	**Kİ**	**0**	**+**
100	Kİ	++++	-
101	Kİ	++++	-
102	Kİ	++	-
103	Kİ	++	-
104	Kİ	+	-
105	Kİ	+++	-
106	Kİ	++	-

*** K:** Kapalı İşletme
*** Kİ:** Küçük İşletme

Çizelge 4.4. Serum ve Gaita örneklerinin alındığı bölgeler ve ELISA sonuçları

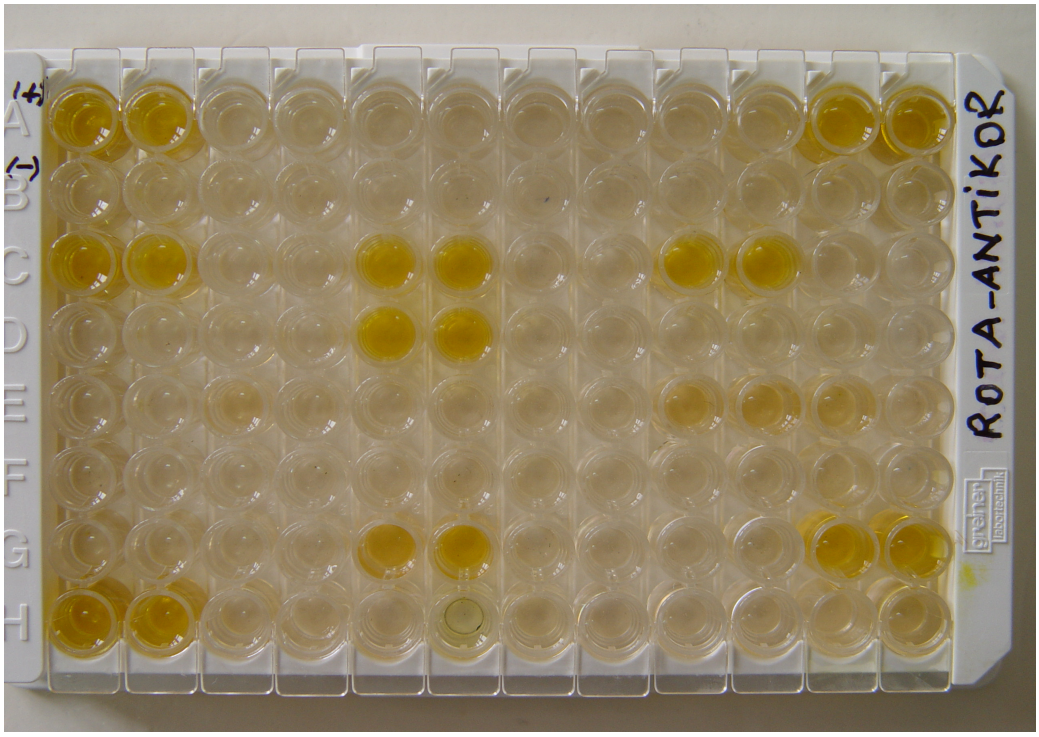
Alındığı Yer	**Adet**	**Serum Pozitif**	**Serum Negatif**	**Gaita Pozitif**	**Gaita Negatif**
Konya Merkez	86	73	13	6	80
Akşehir	14	12	2	2	12
Sarayönü	6	5	1	1	5
Toplam	106	90	16	9	97

Çizelge 4.5. ELISA uygulanan ishalli buzağıların yaşlarının dağılımı

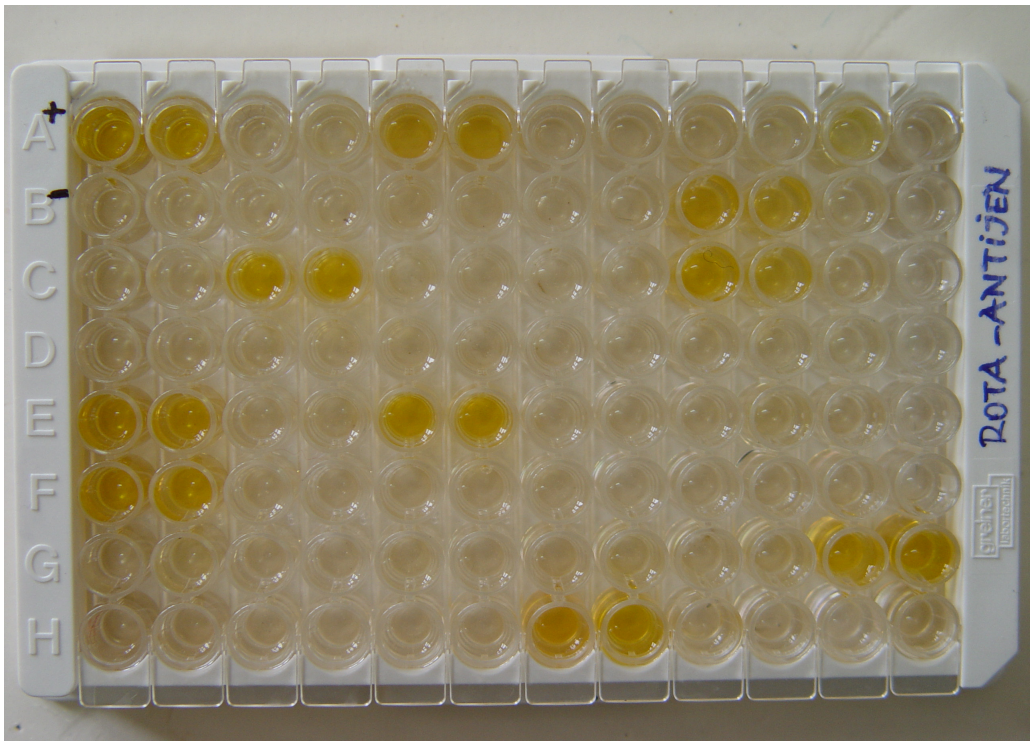
Örneklerin alındığı buzağıların yaşları (gün)	**Örnek sayısı**	**Tespit edilen pozitif gaita sayısı**	**Tespit edilen pozitif serum sayısı**
0-15	30	9	14
15-30	25	0	25
30-45	21	0	21
45-60	13	0	13
60-120	10	0	10
120-180	7	0	7
Toplam	106	9	90

Çizelge 4.6. ELISA ile antijen pozitif olan örneklerin yaşlarına göre dağılımı

Pozitiflerin yaş dağılımı (gün)	**0-15 günlük ishalli buzağı sayısı**	**Pozitiflerin sayısı**	**Pozitiflerin % değeri**
0-5	12	4	% 33
5-10	8	3	% 37
10-15	10	2	% 20



Şekil 1. ELISA uygulanan serum örneklerinde rotavirus antikor pozitif sonuçların pleyt üzerinde görünümü.



Şekil 2. ELISA uygulanan gaita örneklerinde rotavirus antijen pozitif sonuçların pleyt üzerinde görünümü.

5. TARTIŞMA

Yeni doğanlarda ishallerin nedenleri çok çeşitli olup, bunda bir çok enfeksiyöz ajan, çevre, beslenme ve hijyenik faktörler rol oynar.

Yeni doğan buzağıların akut ishal olayları besi programları uygulanan büyük ve küçük işletmelerde sık olarak rastlanan problemler arasında yer alır (Yazıcı ve ark. 1989). Enfeksiyondan etkilenen hayvanlarda büyümenin gecikmesi ve sürü içindeki mortalitenin yüksek düzeylere varabilmesi ekonomik kayıpların temel nedenlerini oluşturmaktadır (Yazıcı ve ark. 1989).

Rotaviruslar ilk kez 1943 yılında Light ve ark. tarafından belirlenmiştir (Joklik 1985). Daha sonra Mebus ve ark. da (1971) deneysel olarak enfeksiyonu oluşturmuşlar, hastalık etkeninin filtre sisteminden geçebildiğini ve bir virus olduğu saptamışlardır.

Rotaviruslar tüm dünyada (Atii ve ark. 1989, Bezek 1994, Athanassious ve ark. 1994) ve Türkiye'de (Burgu ve Akça 1983, Yazıcı 1992, Alkan ve ark. 1992, Alkan 1998, Ekik 2002, Altındiş 2002) özellikle yenidoğan hayvanlar ve bebekler arasında görülen viral enteritislerin önemli bir bölümünün nedeni olarak kabul edilmektedir. Yenidoğanlarda rotavirusların yanında özellikle Coronavirus, Astrovirus, Calicivirus, *E.coli, Salmonella*, Clostridia, Criptosporidium gibi etkenler de enteritise neden olurlar. Bu etkenler tek başlarına sindirim sisteminde bir enfeksiyona neden olabildikleri gibi birlikte de hastalık sebebi olabilirler. Miks bir enfeksiyon hastalığın prognozunu oldukça kötü hale getirmektedir (Caple 1989, Walker ve ark. 1998).

Rotaviruslar, yenidoğan hayvan yavruları ve çocuklarda ishalle seyreden hastalıklara yol açmakla birlikte ileri yaşlardaki hayvanlarda ve yetişkinlerde de genellikle subklinik enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (Estes ve ark. 1989). Yeni doğanlarda özellikle ilk 10-15 günde enfeksiyon sık görülürken, 1 yaşın üzerindekilerde nadir karşılanır (McNulty 1978).

Rotavirusların neden olduğu ishal olayları tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir (Bezek 1994). Enfeksiyon spektrumu içinde yenidoğan buzağılar, kuzular, domuzlar, taylar, geyikler, maymunlar, kanatlı hayvanlar, bebekler, yetişkinler ve deney hayvanları yer almaktadır (Atii ve ark. 1989, Bezek 1994).

Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Arjantin, Kanada'da ishal semptomu gösteren buzağılar üzerinde yapılan çalışmalarda, rotavirus enfeksiyonlarının oldukça yüksek oranda tespit edildiği bildirilmiştir (Sukura ve Neuvonen 1990).

Özellikle son yıllarda yurdumuzda yenidoğan enteritis olayları ile ilgili olarak sağlıklı ve ishalli buzağılarda bazı araştırmalar yapılmıştır (Alkan ve ark. 1992, Yazıcı 1992, Burgu ve ark. 1995, Alkan 1998, Ekik 2002, Altındiş 2002).

Rotaviruslar tarafından oluşturulan enfeksiyonların teşhisi amacı ile kullanılan metotlar arasında Immuno Elektron Mikroskobi (IEM), Floresan Antikor Tekniği (FAT), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Agar Gel Presipitasyon Testi (AGPT), Hemaglutinasyon Inhibisyon Testi (HAI), Poliakrilamid Jel Eletroforez Testi (PAGE), Lateks Aglutinasyon Testi (LA), Reverse Pasif Hemaglutinasyon Testi (RPHA), Immuno Peroksidaz Testi (IPS), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Komplement Fikzasyon Testi (CFT), Serum Nötralizasyon Testi (SN) bulunmaktadır (Burgu ve Akça 1983, Benfield ve ark.1984, Alkan ve ark. 1992, Yazıcı ve Akça 1993, Burgu ve ark. 1995, Ekik 2002, Altındiş 2002).

Bu çalışma hem besicilik yapılan hem de halk elinde bulunan yenidoğan ve 0-6 aylık yaşlar arasındaki buzağılardan alınan kan ve gaita örnekleri ile gerçekleştirildi. Konya ili ve ilçelerindeki çiftliklerden toplanan 106 adet tamamı kolostrum almış ve ishal semptomları gösteren buzağılardan usülüne uygun olarak alınan ve hazırlanan kan serum örnekleri rotavirus antikorları yönünden, toplanan 106 adet gaita örneği rotavirus antijenleri yönünden ticari ELISA kiti ile teste tabi tutuldu. Böylece aynı buzağının kan serumu ve gaita örnekleri alınarak antikor ve antijen seviyeleri belirlendi.

Rotavirus antikor varlığının belirlenmesinde birçok metot kullanılmaktadır. SN, HAI, ELISA, CFT, FAT en yaygın kullanılan metotlar arasındadır.

İshalli buzağı serumlarında rotavirus antikorlarının tespitine yönelik ELISA yöntemi ile bu araştırmada ise; toplanan 106 adet kan serum örneğinin 90 adedi pozitif 16 adedi ise negatif olarak bulunarak, %84.90'lık bir seropozitiflik oranı tespit edilmiştir. Serum örneklerinin alındığı 106 buzağının tamamı kolostrum almıştır.

Birçok araştırmacı (Moreno-Lopez 1979, Schlafer ve Scott 1979, Reisshover ve ark. 1981, Schwers ve ark. 1983, Costrucci ve ark. 1994, Ekik 2002) rotavirusa karşı oluşan antikor düzeyleri hakkında incelemelerde bulunmuşlardır. Bunlardan

İsveç'te Moreno-Lopez (1979), Amerika'da Schlafer ve Scott (1979), Almanya'da Reisshover ve ark. (1981), Fransa'da Schwers ve ark. (1983) yapmış oldukları çalışmalarda annelerin rotavirus antikor prevalansını %90'ın üzerinde bulmuşlardır.

Schlafer ve Scott (1979) Amerika'da yaptıkları çalışmalarda, 110 danada rotavirusa karşı nötralizan antikorların varlığını araştırmışlar ve 108 danayı (%98) seropozitif olarak tespit etmişler.

Costrucci ve ark. (1994) İtalya'da yapmış oldukları serolojik saha çalışmalarında buzağılar, düveler ve danalardan 1964-1982 yılları arasında çeşitli dönemlerde topladıkları 2970 kan serumunu nötralizasyon testi ile rotavirus antikorları yönünden kontrol etmişler, seropozitiflik oranını %90'ın üstünde olduğunu ve alınan sonuçların İsveç, Amerika, Almanya, Fransa gibi ülkelerle benzerlik gösterdiğini de bildirmişlerdir.

Burgu ve Akça (1983) Türkiye'de yapmış oldukları çalışmada, 296 hayvana ait kan serumunu rotavirusa karşı nötralizan antikorların varlığı yönünden araştırmışlar ve 92' sini (%31.08) pozitif olarak tespit etmişlerdir.

Yazcı (1992) Türkiye'de yapmış olduğu çalışmada, mikronötralizasyon testi ile kontrol edilen 656 adet kan serumundan 150 tanesi (%22.86) rotavirus antikorları yönünden seropozitif olarak tespit etmiştir.

Burgu ve ark. (1995) Türkiye'de yapmış oldukları çalışmada, serum nötralizasyon testi ile kontrol edilen 80 adet buzağı serumunun 36 tanesini (%45) rotavirus antikorları yönünden seropozif olarak tespit etmişlerdir.

Ekik (2002) Türkiye'de Konya bölgesinde yapmış olduğu çalışmada, ishalli buzağıların annelerinden alınan 186 adet kan serumunda rotavirus antikorlarının varlığını mikronötralizasyon testi ile araştırarak rotavirus antikorları yönünden %100'lük bir seropozitiflik oranı belirlemiştir.

Araştırmada elde edilen seropozitiflik oranı (%84.90), diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara yakın Türkiye'de yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan yüksektir. Çalışmada 0-6 aylık yaşlar arasındaki buzağılardan örnekleme yapılması, seropoziflik oranının Türkiye'de yapılan çalışmalardan yüksek olmasını açıklayabilir. Seropozitif olan 0-6 aylık buzağıların bu antikorları doğumdan sonra alma ihtimalleri oldukça kuvvetlidir. Çünkü kolostrum yolu ile alınan maternal antikorlar yaşamın ilk altı ayında pasif bir immunite sağlamaktadır.

Seropozitif olan 0-6 aylık 90 adet buzağının, 35 adedinin optik dansite sonucu diğer 55 adet örneğin optik dansite sonucuna göre düşüktür. Antikor değerleri yüksek olan bu 55 buzağının klinik olarak bu enfeksiyonu daha önceden geçirdiklerini söylemek mümkündür. Antikor değerleri düşük olan 35 buzağının rotaviral antikorları doğumdan sonra anneden kolostrum yolu ile alma ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

Seropozif olarak saptanan buzağıların aynı zamanda akut ishal semptomu göstermesi, buzağıların bir kısmının enfeksiyona yeni yakalandığını ve bir kısmınında enfeksiyonu uzun bir seyir dönemi ile geçirdiğini söyleyebiliriz.

Seronegatif olarak saptanan 16 adet buzağının anneden kolostrum almasına rağmen negatif çıkması, seronegatif bir anneden doğduğu ihtimalini göstermektedir. Bu 16 buzağının klinik olarak ishal semptomu göstermesi hayvanların enfeksiyonla ilk kez karşılaştığını ifade etmektedir.

Aynı bölgede Ekik (2002) tarafından, ishalli buzağıların annelerinden aldığı kan serumlarında seropozitiflik oranının (%100) yüksek olarak saptanması, rotavirus etkeninin dünyanın değişik ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de Konya bölgesinde de çok yoğun olarak bulunduğunu kanıtlar.

Rotavirus enfeksiyonlarında virusun saçılmasında en önemli yol gaitadır ve virus gaita ile büyük miktarlarda saçılmaktadır. İshalli buzağıların yanı sıra sağlıklı hayvanların gaitalarından da büyük oranlarda rotavirus antijenleri saçılmaktadır (McNulty 1978).

Rotavirus antijen varlığının belirlenmesinde birçok metot kullanılmaktadır. ELISA, PAGE, IPS, LA, EM, FAT en yaygın kullanılan metotlar arasındadır (Julkunen ve ark. 1985, Weber ve ark.1992).

ELISA viral antijenlerin belirlenmesinde kullanılan en önemli metotlardan birisidir, özellikle rotavirusların ishalli buzağıların gaitalarından identifiye edilmelerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Edwards ve ark. 1987, Lipson ve ark. 2001).

Bu araştırmada ishal semptomu gösteren ve 0-6 aylık yaşlar arasında olan 106 adet buzağıdan gaita örneği toplandı ve ELISA ile rotavirus antijenleri yönünden kontrol edildi. Çalışma sonucunda 9 adet gaita örneği (%8.50) rotavirus antijenleri yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Reynold ve ark. (1984) İngiltere'de yaptıkları çalışmada 74 ishalli buzağıya ait gaita örneğini ELISA ve EM teknikleri ile yaptıkları kontrollerde 32 adedinde (%43.24) rotavirusu saptamışlardır.

Julkunen ve ark. (1985) yaptıkları çalışmada gastroenteritisli 570 hastadan topladıkları gaita örneklerini EIA, LA ve EM teknikleri ile çalışarak, 127 tanesinde (%22.28) rotavirusu tespit etmişlerdir. EIA testinin diğer testlere göre daha belirgin sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Sukura ve Neuvonen (1990) yaptıkları çalışmada topladıkları 375 gaita örneğini LA ve IEM tekniklerini kullanarak 45 adedinde (%12) rotavirusu saptamışlardır.

Alkan ve ark. (1992) ishalli buzağılardan topladıkları 97 adet gaita örneklerini RPHA ile araştırarak bu örneklerden 26 adedinde (%26.80) rotavirus antijen varlığını tespit etmişlerdir.

Yazıcı ve Akça (1993) yaptıkları çalışmada ishalli buzağılardan topladıkları 86 adet gaita örneğini ELISA ile kontrol ederek 13 adedinde (%17.80) rotavirus antijen varlığını ortaya koymuşlardır.

Burgu ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada 107 adet ishalli buzağı gaitasını EM, ELISA ve PAGE teknikleri ile araştırarak bu vakaların 36 adedinde (%33.60) rotavirusları belirlemişlerdir. PAGE analizi neticesinde 30 adet (%28.3), EM tekniği ile 9 adet (%8.4), ELISA ile 29 adet (%27.1) rotavirus tespit etmişlerdir. Uyguladıkları tekniklerin rotavirus enfeksiyonlarını yüksek duyarlılıkla tespit edebileceğini bildirmişlerdir.

Ekik (2002) ishalli buzağılardan topladığı 186 adet gaita örneğini ELISA ile araştırarak bu örneklerden 30 adedinde (%16.12) rotavirus antijen varlığını tespit etmiştir.

Çalışmamızda tespit edilen oran (%8.50), Yazıcı ve Akça (1993) (%17.80), Burgu ve ark. (1995) (%33.60) ve Ekik (2002) tarafından yapılan çalışmalarda belirlenen oranlardan (%16.12) daha düşüktür. Bu oranın düşük olmasını, buzağıların yaşlarının diğer araştırmalardaki buzağıların yaşlarından büyük olması ile açıklayabiliriz.

Yazıcı ve Akça (1993) tarafından gaitaları incelenen buzağıların yaşları 0-30 gün, Burgu ve ark. (1995) tarafından yapılan çalışmada 0-48 gün ve Ekik (2002)

tarafından yapılan çalışmada ise 0-180 gün olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada gaitaları kontrol edilen buzağıların yaşları 0-180 gün arasında dağılım göstermesine rağmen, rotavirus antijen varlığı 0-15 gün yaş diliminde bulunan buzağılarda saptanmıştır. Bunlardan 30 adet buzağı 0-15 yaş diliminde yer almakta ve toplam buzağı sayısının %28.30'unu oluşturmaktadır. Buzağıların %71.70'inin yaşlarının 15 günden büyük olması bu araştırmada rotavirus antijen varlığının düşük çıkmasını açıklayabilir. Sonuç 0-15 gün yaş diliminde incelendiği zaman ise elde edilen %30'luk pozitiflik oldukça yüksek bir oran olarak ortaya konulabilmektedir.

Sığır rotavirus enfeksiyonlarında yapılan çalışmalar enfeksiyonların çoğunlukla 0-15 günlük yaşlar arasında olduğunu göstermiştir. Garcia-Sanchez ve ark. (1993) enfeksiyon yaşını 13 gün, Burgu ve ark. (1995) 12.7 gün, Alkan (1998) 13.6 gün, Ekik (2002) 7.9 gün olarak belirlemişlerdir. Yapmış olduğumuz araştırma sonucunda enfeksiyon genellikle 0-15 gün arasında sınırlı kalmakla beraber ortalama olarak enfeksiyon yaşı 8.4 gün olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçta enfeksiyonun özellikle buzağıların yaşamlarının ilk günlerinde rotavirus enfeksiyonlarına karşı mutlak bir korunmaya ihtiyaç duydukları gerçeğini ortaya koymaktadır (Çizelge 4.6).

Bu araştırmada ishalli buzağılardan alınan 106 adet serum örneğinin 16 adedi rotavirus antikorları yönünden seronegatif tespit edildi. Bu seronegatif 16 örneğin gaita örnekleri ELISA ile incelendiğinde 9 adedinde rotavirus antijenlerine rastlanmıştır. Bu da bize serum örneklerinde rotavirus antikoru olmayan buzağıların %56.25'inde rotavirus enfeksiyonun görüldüğünü ve bu oranın Konya merkez ve çevre ilçelerinde ne kadar büyük olduğunu göstermiştir. Araştırmada tespit edilen 7 adet seronegatif örneğin gaitaları incelendiğinde bu 7 adet örnekte antijen tespit edilememiştir. Bu 7 adet örneğin annelerinin rotavirus enfeksiyonu ile karşılaşmadığını ve dolayısıyla kolostrum yoluyla bu antikorları yavruya nakletmediği veya bu buzağıların klinik olarak rotavirus enfeksiyonunu geçirmediğini göstermektedir. Bu 7 adet ishalli buzağılarda rotavirus antijen ve antikorlarına rastlanmaması ishalin sebebinin başka bir virus veya diğer enteropatojenlerden etkilendiğini göstermektedir (Çizelge 4.3).

Rotavirus enfeksiyonlarının mevsime bağlı olarak dağılım gösterdiği, özellikle de sonbahar ve ilkbahar aylarında sık olarak gözlendiği araştırıcılar tarafından belirtilmiştir (McNulty 1978). Ekik (2002) Konya bölgesinde yapmış olduğu

çalışmada, sonbahar ve ilkbahar aylarında topladıkları 186 adet buzağı gaitasının 30 tanesinde ELISA ile rotavirus antijen varlığını tespit ettiğini belirtmiştir. Bu araştırmada kan ve gaita örnekleri ekim, kasım, mart, nisan, mayıs aylarında toplanmıştır. İshal semptomu gösteren 106 adet buzağı gaitasının 9 tanesinde ELISA ile rotavirus antijen varlığı belirlenmesi enfeksiyonun Konya bölgesi için de aynı şekilde bu aylar arasında daha yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. Bu aylarda hassas hayvanların bakım, beslenme şartlarının düzeltilmesi ile yavruların korunması sağlanabilir.

Rotavirus enfeksiyonlarında yetiştirme tipi de enfeksiyonun görülmesinde önemli risk faktörlerindendir (Garcia-Sanchez ve ark. 1993). Burgu ve ark. (1995) çalışmalarında kapalı yetiştirmelerde tespit edilen sığır rotavirus enfeksiyonu antijen prevalansını %41 olarak bulurken, küçük kapasiteli özel yetiştirmelerdeki enfeksiyonun prevalansını ise %17 daha yüksek tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ekik (2002) Konya bölgesinde yaptığı çalışmada ELISA ile rotavirus antijen varlığı pozitif olarak belirlediği 30 adet gaitanın 22'si kapalı işletmelerde (%73.3), 8 adedi (%26.7) ise küçük işletmelerden alındığını belirtmiştir. Sığır rotavirus enfeksiyonlarında kapalı yetiştirmelerin önemli bir yer tuttuğunu ve enfeksiyonun bu tip yerlerde daha fazla sıklıkta görüldüğünü ortaya koymuşlardır (Çizelge 4.3).

Konya ve ilçelerinde yaptığımız çalışmada topladığımız 106 adet örneğin 86 adedi büyük kapasiteli kapalı işletmelerden, 20 adedi ise küçük aile işletmelerinden alınmıştır. Rotavirus antijen varlığı ELISA ile pozitif olarak belirlenen 9 örneğin 6'sı kapalı işletmelerden (%66.6), 3 (%33.4)'ü ise küçük işletmelerden alınmıştır. Elde edilen bu sonuçlarda sığır rotavirus enfeksiyonunun Konya ve çevresinde özellikle büyük işletmelerde sorun olabileceğini açıkça ortaya koymaktadır. Kapalı işletmelerde enfeksiyonun daha yaygın olarak görülmesinin nedeni ise ortak beslenme, buzağıların aynı ortamlarda bir arada barınmaları ve bu sayede artan bulaşma riski hastalığın görülme sıklığını etkilemektedir (Çizelge 4.3).

ABD'de 1970-1976 yılları arasında yenidoğan buzağı ishalleri nedeni ile 95 milyon dolar/yıl ekonomik kaybın olduğunu ve bu değerin 3.1 ve 8.7 milyon dolarının rotavirus enfeksiyonları nedeni ile oluştuğunu bildirmişlerdir (House 1978). Türkiye'de yenidoğanlarda ishal olgularına bağlı ekonomik kayıplara ait kesin bilgiler bulunmamakla beraber, rotavirus enfeksiyonu ile ilgili daha önce bildirilen

çalışmalar ve bu çalışmada elde edilen veriler diğer enteropatojenlerin yanı sıra rotavirus enfeksiyonlarına bağlı ekonomik kayıpların küçümsenemeyecek düzeyde olduğunu ortaya koymuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, rotavirus ishalleri üzerinde yenidoğan buzağılarda yapılan bu çalışma, enfeksiyonun Konya ve çevresinde yaygın olarak bulunduğunu, özellikle kapalı işletmelerde kontrol ve korunma açısından önemle üzerinde durulması gerektiğini göstermiştir. Özellikle yenidoğan hayvaların çok olduğu dönemlerde yani buzağılama periyodunda yoğun besicilik yapılan işletmelerde hijyenik kurallara kesinlikle dikkat edilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte buzağılarda görülen ishal olaylarında özellikle ELISA, LA ve eğer laboratuvar şartları uygun olursa PCR gibi çabuk sonuç veren test tekniklerinin de pratik teşhiste kullanılmasının yararlı olacağı açıkça bellidir. Çünkü bu gibi enfeksiyonların çabuk teşhisleri ölümleri azaltacak, tedavi şansını artıracak ve ülkemizi buzağı ölümlerinden dolayı olabilecek büyük ekonomik kayıplardan kurtaracaktır.

7. KAYNAKLAR

Alkan, F., Pulat, H., Yazıcı, Z., ve Burgu, İ. 1992. Ters (reverse) Pasif Hemaglutinasyon Testi ile İshalli Buzağı Gaitalarında Rotavirusların Tespiti. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 39: 238-246.

Alkan, F. 1998 Buzağı İshallerinde Rotavirus ve Coronavirusların Rolü. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 45.1.

Altındiş, M. 2002. Konya Bölgesi 0-5 Yaş Grubu Çocuklarda Rotavirus Enfeksiyonlarının Seroepidemiyolojisi ve 0-3 Yaş Arası İshalli Çocuklarda Rotavirus Enfeksiyonlarının Lateks, ELISA ve PAGE Teknikleri ile Araştırılması. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Konya.

Athanassious, R., Marsolais, G., Assaf, R., Dea, S., Descoteaux, P.L., Dulude, S., Montpetit, C. 1994. Delection of Bovine Coronavirus and Type A Rotavirus in Neonatal Calf Diarrhea and Winter Dysentery of Cattle İn Quebec: Evaluation of Three Diagnostic Methods. Can Vet J Volume: 35: 163-169.

Atii, D.J.I., Ojeh, C.K. and Durojaiye, O.A. 1989. Detection of Rotavirus Antigen in Diarrhoeic and Non-diarrhoeic Piglets in Nigeria, Reuve Elev Med. Vet. Pays Trop, 42, 4, 494-496.

Benfield, D.A., Stotz, I.J., Nelson, E.A. and Groon, K.S. 1984. Comparision of a Commercial Enzyme Linked İmmunosorbent Assay with Electron Microcopy Fluorescent Antibody and Virus İsolation fort he Delection of Bovine and Porcine Rotavirus. Am J Vet Res, 45, 10: 1998-2002.

Besser, T.E., Gay, C.C., Mcguire T.C. And Evermann J.F. 1988. Passive İmmunity to Bovine Rotavirus İnfection Associated with Transfer of Serum Antibody İnto the İntestinal Kumen, Journal of Virology, 62: 2238-2242.

Bezek, D. 1994. Rotavirus Enteritis in Food Animals. The Compendium. Vol 16, No. 2: 391-405.

Blood, D.C., Radostis, O.M. And Handerson, J.A. 1983. Veterinary Medicine, Sixty Edition, Baillere, Tindal, London, U. K.

Bridger, J.C., Hall, G. And Parsons, K.R., 1992. A Study of the Basis of Virulence Variation of Bovine Rotaviruses. Vet. Microbiol., 33: 169- 174.

Burgu, İ., ve Akça, Y. 1983. Sığırlarda Rotavirus Antikorlarının Dağılımı Üzerinde Serolojik Araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 30. 1: 35-44.

Burgu, İ., Akça, Y., Ünsüren, H., 1983. Dana ve Buzağılarda Viral Enteritisler 1- Virus İzolasyonu Üzerine Çalışmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 30. 1: 45-53.

Burgu, İ., Akça, Y., Alkan, F., Özkul, A. ve Karaoğlu, T. 1995. Yenidoğan İshalli Buzağılarda Rotavirusların Electron Microskopi (EM), Enzyme Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) ve Polyacrylamide Gel Electrophorosis (PAGE) Teknikleri ile Çabuk Teşhisi ve Antijenik Karakterizasyonu. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 42: 491-498.

Caple, I.W. 1989. Neonatal Viral Diarrhoeas, Australian Veterinary Journal 66. 12: 407-408.

Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, F., Traldi, V. and Angelillo, V. 1994. A Study on Neonatal Calf Diarrhea İnduced by Rotavirus. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 17. ¾. 321-331.

Cheung, E.Y., Hnatko, S.I., Gunning, H. and Wilson, J. 1982. Comparison of Rotazyme and Direct Electron Mikroscopy for Detection of Rotavirus in Human Stool. Journal of Clinical Microbiology, 16. 3: 562-563.

Dea, S., Begin, ME., Archambault, D., Elazhary, Y. and Roy, RS. 1984. Distinct Rotaviruses İsolated from Asymptomatic Calves. Cornell Vet. 75, 307-318.

Doneli, G. and Superti, F. 1994. The Rotavirus Genus, Comp Immun Microbiol Infec Dis. Vol. 17. No ¾. 305-320.

Edwards, S., Chasey, D., Napthine, P., Banks, J., Hewitt-Taylor, C. And Cranage, M. P. 1987. A Comparision of Three Rapid Diagnostic Methods for the Detection of Rotavirus İnfection in Calves. Veterinary Microbiology. 13: 19-25.

Ekik, M. 2002. Konya Bölgesinde Yenidoğan İshalli Buzağılardan Rotavirus Antijenlerinin ELISA ile Belirlenmesi ve Annelerinden Rotavirus Antikorlarının Tespiti. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilin Dalı. Doktora Tezi. Konya.

Estes, M.K., Conner, M.E., Gilger, M.A. and Graham, D.Y. 1989. Molecular Biology and İmmunology of Rotavirus İnfections. Immunological Investigations, 18. (1- 4): 571-581.

Fujii, R., Kuzuya, M., Homano, M., Ogura, H., Yamada, M., Mori, T. 2000. Neutralization Assay for Human Group C Rotaviruses Using a Reverse Passive Hemagglutination Test for Endpoint Determination. Clin J. Microbiol 38(1): 50-4.

Garcia-Sancez, J., Corral, C., Halaihel, N.G., Simon, M.C., Alonso, J.L., Muzquiz, J.L., Ortega, C. and Girones, O. 1993. Survey of Rotavirus İnfection in a Dairy Herd: Comparison Between Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Two Commercial Tests. Veterinary Microbiology. 34: 321-332.

Goto, Y., Kurogi, H., Inaba, Y. and Matumoto, M. 1986. Sequential İsolation of Rotavirus from İndividual Calves. Veterinary Microbiology. 11, 177-184.

Greig, S.L., Berriman, J.A., O'Brien, J.A., Taylor, J.A., Bellamy, A.R., Yeager, M.J., Mitra, A.K. 2006. Structural Determinants of Rotavirus Subgroup Specificity Mapped by Cryo-electron Microcopy. J. Mol. Biol. 356(1): 209-21.

Hall, G.A., Bridger, J.C., Parsons, K.R. and Cook, R. 1993. Variation in Rotavirus Virulence: A Comparison of Pathogenesis in Calves Between Two Rotaviruses of Different Virulence, Vet. Pathol., 30: 223-233.

Hammand, G.W., Ahluwalia, G.S., Barker, F.G. 1982. Comparison of Direct and İndirect Enzyme İmmunoassays with Direct Ultracentrifugation Before Electron Microscopy for Delection of Rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 16: 53-59.

House, J.A. 1978. Economic İmpact of Rotavirus and Other Neonatal Disease Agents of Animals. Javma 173, 573-576.

Hussein, H.A., Cornaglia, E., Saber, M.S. and El-Azhary, Y. 1995. Prevalence of Serotypes G6 and G10 Group A Rotaviruses in Dairy Calves in Quebec. Can J. Vet. Res. 59: 235-237.

Jensen, A. 1985 Evalution of the Two Commercial Kits for Rapid Detection of Human Rotavirus in Feces: Rotalex, A Latex Agglutination Test and Rotavirus ELISA Kit, Acta Path Microbiol İmmunol Scand Sect B. 93: 159-160.

Joklik, K.W. 1985. Virology Second Edition. Appleton Centry Grofts, Norwalk, Connecticut, USA.

Julkunen, I., Savolainen, J., Hautanen, A., Hovi, T. 1985. Detection of Rotavirus in Faecal Specimens by Enzyme İmmunoassays, Latex Agglutination and Electron Microscopy. Scand. J. İnfect. Dis. 17: 245-249.

Jyothırlatha, B.M., Kotigadde, S., Venkatesh, A., Shivananda, P.G. 1992. Rotavirus and Bacteriyal Enteropathogens Causing Acute Diarrhea. Indian J. Pediatr. 59. 2: 203-207.

Kapikian, Z.A. and Chanock, M.R. 1990. Rotavirus. Virology, Second Edition, Edted by Fields BN, Knipe DM, Raven Press, New York, 1353-1404.

Kebaabetswe, L.P., Sebunya, T.K., Matshoka, M.I., Ndungu, T. 2005. Detection an Molecular Charocterisation of Group A Rotavirus From Children in Northern Botswona. East Afr Med J. 82(4):203-8.

Kroki, M., Ohta, M., Ikemori, Y., Icatlo, Jr. F.C., Kobayashi, C., Yokoyama, H. And Kodama, Y. 1997. Fild Evaluation of Chicken Egg Yolk İmmunoglobulins Specific for Bovine Rotavirus in Neonatal Calves, Archives of Virology, 142: 843-851.

Lee, J., Babiuk, L.A. and Yoo, D. 1998. A Neutralizing Monoclonal Antibody to Bovine Rotavirus VP8 Neutralizens Rotavirus İnfection Without İnhibiting Virus Attachment to MA-104 Cells. Can J Vet Res, 62, 63-67.

Lipson, S.M., Swenssen, L., Goodwin, L., Porti, D., Denzi, S. and Pergolizzi, R. 2001. Evaluation of two Current Generation Enzyme Immunoassay and an İmproved İsolation-based Assay for the Rapid Detection and İsolation of Rotavirus from Stool. Journal of Clincal Virology, 21, 17-27.

Lu, W., Duhamel, G.E., Hoshino, Y., Benfield, D.A., Nelson, E.A. and Hess, R.A. 1995. Characterization of the Tovine Group A Rotavirus Strain Neonatal Calf Diarrhea Virus-cody (NCDV-cody). J Clin Microbiol, 33, 4, 990-994.

Makabe, T., Komaniwa, H., Kishi, Y., Yataya, K., Imagava, H., Sato, K. And Inaba Y. 1985. Isolation of Bovine Rotavirus in Cell Culture, Archives of Virology. 83: 123-127.

McNulty, M.S. 1978. Rotaviruses, J. Gen. Virol., 40: 1-18.

Mebus, C.A., Kono, M., Underdahl, N.R., Rhodes, M.B. and Twiehaus, M.J. 1971. Cell Culture Propagation of Neonatal Calf diarrhea Virus. Can. Vet. J. 12: 69-72.

Moosai, R.B., Alcock, R., Bell, T.M., Laidler, F.R., Peiris, J.S.M., Wyn-Jones, Apand., Madeley, C.R. 1985. Detection of Rotavirus by a Latex Agglutination Test, Rotalex: Comparison with Electron Microscopy, İmmunofluorescece, Polyacrylamide Gel Electrophorosis, and Enzme Linked İmmunosorbent Assay. J. Clin Pathol. 38: 674-700.

Moreno-Lopez, J. 1979. A Serosuvery Of Viruses During Outbreaks Of Acute Respiratory And/Or Enteric Disease İn Swedish Cattle. Z. Vet. B. 26. 8: 634-640.

Murakami, T., Hirano, N., Chitose, K., Tsuchiva, K., Ono, K., Sato, F., Suzuki, Y. and Murakami, Y. 1987. A Survey on Bovine Type 1-Associated Neonatal Calf Diarrhea in a Beef Herd, Jpn. J. Vet. Sci. 49: 1. 23-30.

Nagano, H., Goto, H. and Shimizu, K. 1984. Virological and Serological Studies of Rotavirus İnfection in Cattle. Ress Bull Obihiro Univ. 14: 1-8.

Ojeh, C.K. 1984. Isolation and Propagation of Bovine Rotavirus in Cell Culture. Rev Elev Med. Vet. Pays Trop. 37. 4: 400-405.

Paul, P.S. and Lyoo, Y.S. 1993. Immunogens of Rotaviruses, Veterinary Microbiology. 37: 299-317.

Pazdiora, P., Svecova, M., Jelinkova, H., Taborsko, J. 2002. Diagnosis of Rotavirus İnfections-comparison of Various Methods. Epidemiol Microbiol Imund. 51(3): 95-7.

Perk, K., Moussa, A.A., Tromp, A.M., Reda, I.M., Refai, M., Friedman, A., Farid, A.F., Gallily, O., Salah, S.M. 2000. Neonatal Dıarrheal Dısease of Daıry Cattle ın Egypt and Israel. Israel Vet. Med. Association Vol. 55. 1.

Piednoir, E., Bessaci, K., Bureau-Chalot, F., Sabauraud, P., Brodard, V., Andreoletti, L., Bajolek, O. 2003. Economic İmpact of Healthcore-assciated Rotavirus İnfection in a Paediatric Hospital. J. Hosp Infect. 55(3):190-5.

Reishouver, G., Lohr, J., Seilkapf, G., Cless, O. 1981. Serological Studies For The Presence Of Hemagglutination-İnhibiting Antibodies Against The " egg-drop syndrome 76 " Virus İn South Wuerttemberg. B. M. T. Woc. 94. 14: 279-80.

Reynold, D.J., Chasey, D., Scott, A.C. and Bridger, J.C. 1984. Evaluation of ELISA and Electron Microscopy for Detection of Coronavirus and Rotavirus in Bovine Faeces. The Veterinary Record. April 21: 397-401.

Rodger, S.M., Bishop, R.F. and Homes, I.H. 1982. Detection of a Rotavirus-like Agent Associated with Diarrhea in İnfant. J. Clin. Microbiol 16, 4, 724-726.

Roman, E. and Martinez, I. 2005. Detection of Rotavirus in Stool Samples of Gastroenteritis Patients. P. R. Health Sci J., 24(3): 179-84.

Rubenstein, A.S. and Miller, M.F. 1982. Comparison of an Enzyme İmmunoassay With Electron Microscopic Procedures for Detecting Rotavirus. J. Clin. Microbiol. 15: 938-944.

Sanekata, T., Yoshida, Y., Okada, H. and Oda, K. 1982. Detection of Rotavirus Antibody by İnhibition of Reverse Passive Hemagglutination. J. C. Mic. 15, 1, 148-155.

Schlafer, H.D. and Scott, M.F. 1979. Prevalence of Neutralizing Antibady to the Calf Rotavirus in New York cattle. Cornell Vet. Jul. 69. 3: 262-271.

Schwers, A., Maenhoudt, M. and Pastoret, P.P. 1983. Repeted Bovine Rotavirus İnfection and Exretion in Calves. Vet. Rec. 114: 411.

Shah, N.M. and Jhala, V. M. 1990. Latex Agglutination Test (Rotalex) for Rapid Diagnosis of Rotavirus in Neonatal Calf Diarrhea. Indian Journal of Animal Scienses. 60. 11: 1311-1312.

Singh, A. and Pandey, R. 1988. Analysis of Electrophoretypes of Rotavirus From Diarrhoeic Faeces of Neonatal Buffalo Calves in İndia. Acta. Virol. 32. 2: 156-159.

Sukura, A. and Neuvonen, E. 1990. Latex Test for Rapid Rotavirus Diagnosis in Calves. Acta. Vet. Scand. 31: 1-4.

Walker, P.G., Constable, P.D., Morin, D.E., Drackley, J.K., Foreman, J.H. And Thurmon, J.C. 1998. A Reliable, Practikal and Economical Protocol for İnducing Diarrhea and Severe Dehidration in the Neonatal Calf. Can J. Vet.Res. 62: 205-213.

Weber, B., Harms, F., Selb, B. and Doerr, H.W. 1992. Improvement of Rotavirus İsolation in the Cell Culture by İmmune Peroxidase Staining. Journal of Virolojical Methods. 38: 187-194.

White, D.O., Fenner, F.J. 1986. Medical Virology. 3rd edu. San Diego: Academic Press.

Yazıcı, Z., Özkul, A., Akça, Y., Burgu, İ. 1989. Buzağılarda Viral Gastroenteritisler. 1. Uluslararası Önemli Buzağı Hastalıkları Sempozyumu. Ankara.

Yazıcı, Z. 1992. Buzağılarda Rotavirus Enfeksiyonlarının Seroepidemiyolojisi ve ELISA Testi ile Rotavirus Antijenlerinin İdentifikasyonu. A. Ü. Sağ. Bil. Enst. Doktora Tezi.

Yazıcı, Z. ve Akça, Y. 1993. Buzağılarda Rotavirus Enfeksiyonlarının Seroepidemiyolojisi ve ELISA Testi ile Rotavirus Antijenlerinin İdentifikasyonu. A. Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi 40. (2): 231-240.