T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOVINE ROTAVİRUS ENFEKSİYONLARININ ÇABUK TEŞHİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE ELISA VE DOT-ELISA SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Serpil YANBAKAN

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK

KONYA-2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOVINE ROTAVİRUS ENFEKSİYONLARININ ÇABUK TEŞHİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE ELISA VE DOT-ELISA SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Serpil YANBAKAN

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 07202027 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ii. ÖNSÖZ

Rotavirus ishalleri, çoğu evcil hayvanın yenidoğan yavrularında ölüm ve tedavi giderleri ile direkt olarak, klinik belirtileri atlatmış olan yavrularda ise yaşamın daha sonraki dönemlerinde gözlenen gelişim bozuklukları ile indirekt olarak önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde binlerce bebek ya da çocuğun ölümünden sorumlu tutulan rotavirus ishalleri güncelliğini hem tıp hekimliği hem de veteriner hekimliği açısından her zaman korumaya devam etmektedir. Ülkemiz için elimizde detaylı veri bulunmamakla birlikte, rotavirusların enfeksiyon meydana getirmek için çok geniş bir canlı türü yelpazesine sahip olmalarının kaçınılmaz bir sonucu olarak teşhis amaçlı kitlerin kullanımının oldukça fazla olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde bu tür enfeksiyonların teşhisi amacıyla kullanılan kitlerin hemen hemen tamamının ithal ürünler olması yurtdışına bağımlılığı ve maliyeti arttırmaktadır. Bu araştırma ile rotavirus enfeksiyonları arasında önemli bir yeri olan bovine rotavirus tespiti için çabuk teşhise yönelik, ticari kitlere alternatif enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve Dot-ELISA sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde bilimsel yardım ve desteklerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Sibel YAVRU, Doç. Dr. Orhan YAPICI, Doç. Dr. Oya BULUT, Araş. Gör. Oğuzhan AVCI, Araş. Gör. Ela ESİN'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında her konuda destek olan Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Viroloji Laboratuvarı Şefi Dr. Veli Gülyaz'a, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı çalışanlarından uzman veteriner hekim Ayşe Er'e ve Kamil Üney'e, eğitim ve öğrenimim boyunca maddi ve manevi katkılarından dolayı aileme, maddi olarak destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koodinatörlüğüne teşekkür ederim.

Sunulan tez projesi Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 07202027).

iii. İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR **vi**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Tarihçe 2

1.2. Etiyoloji 5

1.2.1. Serotipler 7

1.2.2. Gruplar 9

1.2.3. Alt Gruplar 10

1.3. Virusun Replikasyonu 11

1.4. Çevresel Koşullara Duyarlılık 13

1.5. Epidemiyoloji 15

1.6. Rotavirus Konakçı Özgüllüğü 21

1.7. Türler Arası Bulaşma 22

1.8. Patogenez ve Patoloji 26

1.9. BRV Virulensi 28

1.10. Klinik Belirtiler 30

1.11. Teşhis 32

1.11.1. Direkt Yöntemler ile BRV Teşhisi 32

1.11.2. İndirekt Serolojik Yöntemler ile BRV Teşhisi 35

1.11.3. Hücre Kültürü Sistemleri ile BRV İzolasyonu ve İdentifikasyonu 37

1.12. İmmunite 41

1.13. Koruma ve Kontrol 45

2. GEREÇ ve YÖNTEM **51**

2.1. Gereç 51

2.1.1. Virus 51

2.1.2. Hücre Kültürü 51

2.1.3. Hücre Çoğaltma Vasatı 51

2.1.4. Pankreatin Solüsyonu 51

2.1.5. Solüsyonların Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler 52

2.1.6. Polyethylene glycol (PEG) 52

2.1.7. Protein Konsantrasyon Tespit Kiti 53

2.1.8. Deneme Hayvanları 53

2.1.9. Deney Hayvanı İmmunizasyonunda Kullanılan Adjuvantlar 53

2.1.10. Amonyum Sülfat 53
2.1.11. Diyaliz Materyali 54
2.1.12. Anti-BRV Poliklonal Antikoru 54
2.1.13. ELISA ve Dot-ELISA Sisteminde Kullanılan Materyaller 54
ELISA ve Dot-ELISA katı faz materyali 54
Konjugat 54
Monoklonal antikor 55
Dışkı örnekleri 55
2.1.14. Ticari ELISA 55
2.1.15. İstatistiksel Hesaplamalar 55
2.2. Yöntem 56
2.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması 56
2.2.2. Virusların Hücre Kültürüne Adaptasyonu ve Çoğaltılması 56
2.2.3. Virusların Titrasyonu 57
2.2.4. PEG-6000 Yöntemi ile Viral Proteinlerin Konsantre Edilmesi 58
2.2.5. Viral Protein Miktarının Belirlenmesi 59
2.2.6. Deney Hayvanları 59
2.2.7. Deney Hayvanlarının İmmunizasyonu 60
BRV B223 referens suşu ile immunizasyon 60
Pendik BRV izolatı ile immunizasyon 61
2.2.8. Anti-BRV Poliklonal Antikorunun Hazırlanması 61
Amonyum sülfat çökeltme metodu ile poliklonal antikorların konsantre edilmesi 62
Diyaliz düzeneğinin hazırlanması 62
2.2.9. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN_{50}) Titrelerinin Belirlenmesi 63
2.2.10. ELISA Sisteminin Hazırlanması 64
Pleyt gözlerinin tavşan anti-BRV poliklonal antikoru ile kaplanması 65
Pleyt gözlerinin monoklonal antikor ile kaplanması 66
2.2.11. Dışkı Örneklerinde Antigen Capture ELISA ile BRV Varlığının Araştırılması 67
2.2.12. ELISA Cut-off Değerinin Tespiti 67
2.2.13. Dot-ELISA Sisteminin Hazırlanması 68
Membran yüzeyinin tavşan anti-BRV poliklonal antikoru ile kaplanması 68

Membran yüzeyinin monoklonal antikor ile kaplanması 69
2.2.14. Dışkı Örneklerinde Dot-ELISA ile BRV Varlığının Araştırılması 69
2.2.15. Dışkı Örneklerinde Ticari ELISA ile BRV Varlığının Araştırılması 70
2.2.16. ELISA Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 70
2.2.17. Testlerin Sensitivitesi ve Spesifitesi 70
3. BULGULAR 71
3.1. Virus 71
3.2. Virusların Titresi 73
3.3. Viral Antijen Protein Miktarı 73
3.4. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN_{50}) Test Sonuçları 74
3.5. ELISA ve Dot-ELISA Optimizasyon Sonuçları 74
3.6. ELISA Sonuçları 77
3.7. Dot-ELISA Sonuçları 77
3.8. Ticari ELISA Sonuçları 80
3.9. Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi 81
3.10. Testlerin Sensitivitesi ve Spesifitesi 83
4. TARTIŞMA 84
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 98
6. ÖZET 100
7. SUMMARY 101
8. KAYNAKLAR 102
9. EKLER 122
EK A. Tavşanlara Uygulanan Adjuvantsız İmmunizasyon Süreci 122
EK B. Tavşanlara Uygulanan Adjuvantlı İmmunizasyon Süreci 123
EK C. Etik Kurul Kararı Örneği 124
10. ÖZGEÇMİŞ 125

iv. SİMGELER VE KISALTMALAR

BRV	Bovine Rotavirus (sığır rotavirusu)
°C	Derece santigrat
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
CO_2	Karbondioksit
CPE	Cytopathogenic effect (sitopatolojik efekt)
dk	Dakika
$DKID_{50}$	Doku kültürü infeksiyöz doz %50
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dsRNA	Double strain RNA (çift iplikçikli RNA)
EBK	Embriyonik sığır böbrek hücre kültürü
EDTA	Ethylen diamine tetra acetic acide
EM	Elektron mikroskopi
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FIA	Freund's incomplete adjuvant
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
HeLa	İnsan servikal karsinom hücre kültürü
HRPO	Horse radish peroxidase
H_2SO_4	Sülfirik asit
IFAT	İmmun floresan antikor tekniği
Ig	İmmunglobulin
LA	Lateks aglütinasyon
LLC-MK_2	Rhesus maymun böbrek hücre kültürü
Log	Logaritma
ml	Mililitre
M	Molar
MA104	Afrika yeşil maymun embriyonic böbrek hücre kültürü
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
mg	Miligram
µl	Mikrolitre

iv. SİMGELER VE KISALTMALAR (DEVAM)

µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
NCDV	Neonatal Calf Diarrhea Virus
OD	Optik dansite
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PEG-6000	Polyethylen gylicol 6000
PEG-8000	Polyethylen gylicol 8000
pH	Asitlik değeri
RNA	Ribo Nükleik Asit
PCR	Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
SN	Serum nötralizasyon
$	Amerika para birimi (Amerikan doları)
VP	Viral protein
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

1. GİRİŞ

Geleceğin hayvansal üretimi açısından büyük önem taşıyan, her açıdan iyi geliştirilmiş sığır ırklarının elde edilebilmesi için sağlık problemi en az düzeye indirgenmiş buzağıların yetiştirilebilmesi, nüfusun gittikçe arttığı günümüz dünyasında önemli bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır.

Buzağılarda, özellikle 0-1 yaş arasında gözlenen en önemli sağlık problemlerinin başında sindirim ve solunum sistemi hastalıkları yer almaktadır (Kaneene ve Hurd 1990). Yaşamın ilk aylarında şiddetli klinik belirtiler ve ölüme neden olan ishal olguları, aynı zamanda buzağıların gelişimini olumsuz yönde etkilemekte ve ileri yaşlarda üreme problemlerine özellikle dişi hayvanlarda ilk buzağılama yaşının artışına zemin hazırlamakta, bütün bunların bir sonucu olarak önemli direkt ya da indirekt ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Tzipori 1981).

Buzağılarda meydana gelen ishal olaylarının gerçekleşmesinde; virus, bakteri, protozoa ve işletme şartları (bakım, besleme, hijyenik yapı) gibi birçok etken rol oynamakla birlikte, farklı Avrupa ülkelerinde yapılan birçok araştırmada ishalli buzağıların dışkı örneklerinde belirlenen en önemli etkenlerin rotavirus ve cryptosporidia olduğu vurgulanmıştır (Lorenz 2006).

Ülkemizde ve dünya üzerindeki çeşitli ülkelerde yenidoğan buzağılarda diyare etkenleri arasında önemli bir yeri olan rotavirusların enfeksiyon spektrumunda yenidoğan bebek, tay, kuzu, domuz, maymun, geyik, kedi ve köpek ile kanatlı hayvanlar yer almaktadır (Fenner ve ark 1987).

Bovine Rotavirus (BRV), ülkemizin de içinde bulunduğu birçok ülkede yenidoğan buzağı ölümlerine bağlı ekonomik kayıplara neden olan önemli ve akut bir enfeksiyon kaynağıdır (Alkan ve ark 1992). Ülkemizde yenidoğan buzağılarda görülen rotavirus etkeni sonucu oluşan diyareye bağlı buzağı kaybına ait sayısal bir veri bulunmamakla birlikte ekonomik açıdan verim kaybına neden olan yenidoğan buzağı diyaresinin sahada yaygın olarak bulunduğu da bilinen bir gerçektir.

1.1. Tarihçe

Rotavirus ile ilgili ilk çalışmalar, 1943 yılında Light ve arkadaşlarının çocuklarda görülen bir diyare salgınına ait dışkı örneklerinde bakterilerin geçemediği filtre sistemlerinden geçebilen bir etken izole etmeleriyle başlamıştır. Yenidoğan buzağı diyaresine neden olan etkenler arasında virusların öneminin belirlenmesine yönelik araştırmalar sürerken ilk kez Mebus ve ark (1969)'nın Nebraska eyaletindeki diyare semptomlu buzağılar üzerinde gerçekleştirdikleri deneysel bir çalışmada, daha önce hiç tanımlanmamış bir virus tespit edilmiştir. Çeşitli araştırmacılar tarafından daha sonra yapılan birçok çalışmada tespiti yapılan reovirus benzeri etken ya da partiküller olarak tanımlanan ve bugün sığır rotavirusu olarak bilinen bu virus, yenidoğan buzağı diyare virus'u (Mebus ve ark 1971b), Nebraska buzağı diyare virus'u (Derbyshire ve Woode 1978), reovirus benzeri yenidoğan buzağı diyare etkeni (Woode ve ark 1974) ve yenidoğan gastroenterit virus'u (Davidson ve ark 1977, Mebus ve ark 1977) gibi çeşitli isimler verilerek değerlendirilmiştir.

Bishop ve ark (1973) akut gastroenteritli çocuklara ait duedonal mukoza biyopsi materyalinde elektron mikroskubu (EM) ile yaptıkları incelemeler sonucunda Mebus ve ark (1969) tarafından keşfedilen virus ile insandaki diyare etkeni arasında ilişki olduğunu ilk olarak ortaya koyan araştırmacılardır.

Flewett ve Woode (1978) EM yöntemi ile dışkı örneklerinde morfolojik olarak araba tekerleğine benzeyen buzağı diyare etkenine, latince terminolojide "tekerlek" anlamına gelen rotavirus ismini vermişlerdir. 1978 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)/Gıda ve Tarım Organizasyonu Karşılaştırmalı Viroloji Programında reovirus çalışma ekibinin üyelerinden Derbyshire ve Woode (1978), insan ve hayvanlarda diyare etkeni olan reovirus benzeri ajanlara rotavirus ismi verilebileceğini bildirmişlerdir. Yenidoğan buzağı diyare virus suşu, temel (candidate) referans virus olarak seçilmiştir. Bu virus hücre kültürüne adapte edildikten sonra diğer tüm rotavirus izolatlarının karakterize edilmesinde kullanılmıştır.

Buzağılara ait dışkı örneklerinde daha sonraki çalışmalar (Woode ve ark 1974, Woode ve Bridger 1975, Flewett ve Woode 1978) sonucunda elektron mikroskobu ile dışkı aracılığıyla yüksek miktarda viral partiküllerin etrafa saçıldığı

doğrulanarak 65 nm büyüklüğünde oldukları belirlenmiştir. Belirlenen bu viral partiküller ile Mebus ve ark (1969) tarafından kimliklendirilen viruslar arasında antijenik ve morfolojik olarak benzerlikler tespit edilmiştir. Diğer türlere ait dışkı örneklerinde çeşitli araştırmacılar (Bishop ve ark 1973, Flewett ve ark 1974a, 1974b, Woode ve Bridger 1975, Flewett ve Woode 1978) tarafından tespit edilen rotavirus, akut gastroenterit ile ilişkili bulunmuştur.

Rotavirus'un çeşitli hücre kültürlerine (Madin Darby sığır böbrek-MDBK, LLC-MK2, MA104, HeLa) adaptasyonu ile virusun çoğaltılması gerçekleştirilmiştir (Clark ve ark 1979). McNulty ve ark (1977), tripsin katkılı MDBK hücrelerinde buzağı rotaviruslarını başarı ile üretmişlerdir. Matsuno ve ark (1977), Afrika yeşil maymun embriyonik böbrek (MA104) hücreleri ile yapılan plak test sonucunda neonatal calf diarrhea virus (NCDV) varlığını ilk kez rapor eden araştırmacılardır. Ojeh ve ark (1984) diyare semptomlu buzağılardan elde edilen dışkı örneği süspansiyonunu MA104 hücrelerine inokule ederek idame vasatına tripsin ilavesi sonucu sitopatolojik effekt (CPE) oluşumunu gözlemlemiştir.

Ülkemizde rotavirus enfeksiyonlarına ait ilk çalışma, Burgu ve Akça (1983) tarafından erişkin hayvanlarda serolojik olarak gerçekleştirilen bir araştırmadır. Bunun yanında yenidoğan diyare semptomlu buzağılarda enfeksiyonun varlığı daha sonra yapılan hücre kültürü virus izolasyonu ve moleküler düzeydeki araştırmalarda (Alkan ve ark 1992, Burgu ve ark 1995, Çabalar ve ark 2000, Ekik 2002, Erdoğan ve ark 2003, Yavru ve ark 2008) bildirilmiştir. Ülkemizde sığır ve buzağı dışkı örneklerinde BRV teşhisi amacıyla yapılan araştırmalar, tesadüfi örneklemeler sonucunda ve genellikle ticari Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) BRV teşhis kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yazıcı 1992, Alkan 1998, Ekik 2002).

Alkan ve ark (1992) 97 adet diyare semptomlu buzağıdan topladıkları dışkı örneklerini rotavirus varlığı bakımından Reverse Passive Hemaglütinasyon Testi (RPHA) ile araştırarak bu örneklerden 26'sında (%26,8), rotavirus antijen varlığını tespit etmişlerdir. Yazıcı ve Akça (1993), yaptıkları çalışmada diyare olgusu gösteren 86 adet buzağı dışkısını ELISA ile kontrol ederek %17,3 (13 adet) oranında rotavirus antijen varlığını ortaya koymuşlardır. Burgu ve ark (1995) 107 adet diyare semptomlu buzağı dışkı örneğinde BRV tespiti amacıyla, EM, ELISA, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) teknikleri ile gerçekleştirdikleri bir

araştırmada, örneklerin %33,6'sında primer etkenin BRV olduğunu belirtmişlerdir. Alkan (1998), Bursa, Şanlıurfa, Konya, Denizli, Samsun ve Ankara illerindeki işletmelerden sağlanan diyare semptomlu 83 adet buzağı dışkı örneğinde BRV ya da bovine coronavirus (BCV) etkeninin tespit edilmesi amacıyla ticari ELISA ile BRV ve geliştirilen monoklonal antikor temelli ELISA ile BCV etkeninin varlığını bildirmişlerdir. Buna göre, 83 adet buzağıdan sağlanan dışkı örneklerinden 52 adedinde (%61,4) araştırılan viruslardan en az birisinin varlığı tespit edilmiştir. Bu olgulardan 7 adedinde (%13,4) BRV ve BCV mix enfeksiyon tarzında saptanırken, 37 (%71,1) adet olguda sadece BRV ve 8 (%15,4) adet olguda sadece BCV enfeksiyon varlığı tespit edilmiştir.

Şahna (2002) ELISA ve PAGE metotlarını kullanarak erişkin gebe sığırlardaki BRV enfeksiyon oranı ile BRV'nin saçılmasında gebeliğin rolünü ve yenidoğanların enfeksiyondan korunmasında maternal antikorların etkisini araştırmıştır. Aynı araştırmada ELISA ve PAGE metotları ile tespit edilen BRV etkeni doğal enfekte erişkin sığırların özellikle doğum yaptıkları gün virus saçtıkları ve kolostrum/süt ile enfeksiyonu yenidoğana aktardıkları belirtilmiştir. Yenidoğana kolostrum/süt ile aktarılan maternal antikorların postnatal yaşamın ilk bir haftalık döneminde enfeksiyon oluşumunu engellediği, daha sonraki günlerde ise klinik enfeksiyon gelişimini önlediği belirlenmiştir. Araştırmada ELISA ve PAGE testleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; her iki test tekniği ile erken dönemlerindeki buzağılarda BRV enfeksiyonunun saptanmasında benzer sonuçlar alındığı, enfeksiyonun ileri dönemlerindeki BRV teşhisinde ELISA'nın daha yüksek duyarlılıkta olduğu belirtilmiştir.

Erdoğan ve ark (2003) yaptıkları çalışmada Kars ilindeki yenidoğan ishalli ve ishalsiz buzağılara ait 624 adet dışkı örneğinde, ticari ELISA ve Lateks aglütinasyon (LA) test tekniklerini kullanarak rotavirus ve coronavirus enfeksiyonlarının görülme sıklığını araştırmışlardır. Neonatal buzağılarda rotavirus ve coronavirusun çiftlik prevalansının sırasıyla %31,1 ve %2,2 olduğu belirlenmiştir. İshalli buzağıların %26,9'unda ve ishalsiz buzağıların ise %4,9'unda rotavirus antijen varlığı tespit edilmiştir.

Gülyaz ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada diyare semptomlu buzağı dışkı örneğinden elde edilen saha izolatı ile MA104 hücre kültürüne yapılan inokulasyonlar sonucunda Türkiye'de ishalli buzağı dışkı örneklerinden ilk olarak rotavirus izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

1.2. Etiyoloji

İnsan ve hayvanlara ait rotaviruslar morfolojik, moleküler, biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerine göre taksonomik olarak Reoviridae ailesi içerisinde gruplandırılır (Derbyshire ve Woode 1978, Kapikian ve ark 1981). Hayvanları ve insanları enfekte ettikleri bilinen orthoreoviruslar ve orbivirus cinsleri de *Reoviridae* ailesi içerisinde yer almaktadır (Derbyshire ve Woode 1978, Kalica ve ark 1978, Woode ve Bridger 1975).

Farklı alttiplere sahip tam rotavirus partikülleri, EM ile benzer görüntüler vermekle beraber dışkıda iki farklı büyüklükte partiküller tespit edilmiştir (Flewett ve Woode 1978, Cukor ve Blacklow 1984). Bunlardan büyük partiküller, sezyum klorit (CsCl) santrifüj tekniği ile 1,36 g/ml yoğunlukta olup 70-75 nm büyüklüğünde, düz, çift katmanlı kapsid bulundurmaktadırlar (Flewett ve Woode 1978, Cukor ve Blacklow 1984). Küçük partiküller ise 1,38 g/ml yoğunlukta, 60-65 nm boyutunda olup pürüzlü bir yüzeye sahip tek katmanlı bir kapsid içermektedirler. Sadece tam ve çift katmanlı rotavirus partiküllerinin enfektif olma özelliğine sahip oldukları bildirilmiştir (Flewett ve Woode 1978, Cukor ve Blacklow 1984).

Etken zarsız olup çift katlı ikozahedral simetrili bir protein kapsid ile öz (core) kısmına sahiptir. Rotavirus enfeksiyöz partikülü (virion), üç tabakalı partikülden (triple-layered particle; TLP) oluşan yapıya sahiptir. Bu tabakalar dış kapsid, iç kapsid ve öz bölgesidir. Virus partikülleri, kendi RNA'larını aktif mRNA'ya transkripe etmek için RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimine sahiptir. mRNA üretimi için gerekli tüm enzimler viral kapsidde yer almaktadır (Kalica ve ark 1978, Matsui ve ark 1989).

Rotavirus'a ait 11 segmentli genom, pozitif polaritelidir ve çift sarmal RNA ihtiva eder. Çift iplikçikli RNA fragmentleri, PAGE tekniği ile migrasyon kabiliyetlerine göre 1'den 11'e kadar numaralandırılmaktadır. Her bir segment en az

bir viral proteinin kodlanmasından sorumludur. Rotavirus genomuna ait bu segmentler türler arasında, dizilim ve elektroforetik migrasyon kabiliyetlerine göre bir takım farklılıklar sergilemektedir. Segmentli yapıya sahip genom nedeniyle genetik rekombinasyonun bir çeşidi olan genetik reassortment olayına rastlanabilir (Estes ve Cohen 1989).

Rotavirus'a ait yapısal proteinlerden VP1, VP2, VP3 virus partikülü içerisindeki öz bölgesinde bulunurlar. VP7 ve VP4 (VP5+VP8) dış kapsidde bulunan yapısal proteinlerdendir. İç kapsidde yer alan, virusun en önemli immunojenik proteini olan VP6, grup spesifik antijen özelliği gösterip öz bölgesini çevrelemektedir (Estes ve Cohen 1989). VP1 proteini RNA'ya bağımlı RNA polimeraz olarak görev yaparken (Dhama ve ark 2009), VP2 translasyon aşamasında viral mRNA'ya bağlanarak çift iplikçikli RNA segmentlerinin replikasyonunda ve rotavirus virionlarının kapsid içerisine toplanmasında rol oynamaktadır (Brüssow ve ark 1990).

Deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çeşitli araştırmalarda (Offit ve ark 1986, Offit ve Dudzik 1989, Matsui ve ark 1989), rotavirus dış kapsid proteinlerinden VP4 ve VP7'nin, virus nötralizasyonu ile ilgili olarak koruyucu bağışıklık oluşturmada rol oynadıkları gösterilmiştir. VP4 ve VP7 proteinlerinin, bağırsak içi hedef epitel hücrelerin enfeksiyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Offit ve ark 1986, Liu ve ark 1988). Rotavirus serotipini belirleyen bu proteinlerin, bağışıklık sisteminde koruyucu rol oynayan nötralizan antikorların artışında etkili oldukları bilinmektedir (Zheng ve ark 1989, Dhama ve ark 2009).

Rotavirus'a ait dış kapsid proteini VP4, virusun yüzeyinde bulunan bir çıkıntı (spike) proteinidir. VP4'ün konakçı hücreye bağlanma, penetrasyon, hemaglutinasyon, nötralizasyon ve virulans gibi önemli fonksiyonları vardır (Kalica ve ark 1983, Offit ve ark 1986). Çıkıntıların stabilizasyonu ve viral enfektivitenin sağlanması için VP4'ün VP5 ve VP8 alt ünitelerine ayrılması gereklidir (Crawford ve ark 2001). VP4, proteolitik bir enzim olan tripsin aktivitesi ile VP5 ve VP8 alt ünitelerine dönüştürüldüğünde dış kapsid proteinleri, virus enfektivitesinden sorumlu hemaglütinin ve nötralizasyon aktivitesi gibi çeşitli fonksiyonlara sahip olurlar (Mattion ve ark 1994). Buna göre enfeksiyözite, dış kapsidin bulunup

bulunmamasına bağlıdır (Espejo ve Arias 1981, Estes ve ark 1981, Dhama ve ark 2009).

Rotavirus'a ait dış kapsid proteinlerinden bir diğeri olan VP7, kuvvetli bir immunojen olup nötralizan antikor seviyesini arttırır (Hoshino ve ark 1988). Rotavirusa ait, serotip spesifitesinin başlıca belirleyicisi VP7 olup (Kalica ve ark 1981, Greenberg ve ark 1983a, 1983b), G (glikoprotein) serotipini temsil eder ve virion dış kapsidinin büyük bir bölümünü oluşturur (Bridger ve ark 1992, Arias ve ark 1996). VP4 ise P (proteaza duyarlı protein) serotipini temsil eder (Mattion ve ark 1994). VP4 ve VP7'yi temsil eden G ve P rotavirus serotipleri aşı geliştirilmesi açısından önemlidir. Çünkü rotavirus dış kapsidi üzerinde bulunan bu bölgeler nötralizan antikorların hedefi halindedirler. A grubu rotaviruslar arasında 14 adet G serotipi ve 12 adet P serotipi belirlenmiştir (Estes ve Cohen 1989).

Rotavirus'a ait genom yapısında 5 adet yapısal olmayan protein (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5) bulunur. NSP3'ün, viral replikasyon sırasında protein sentezinin translasyonunun arttırılmasında rolü vardır. NSP4, plazma membranının permeabilitesini değiştirir ve epitel hücrelerin yüzeyleri arasındaki sıkı bağlantıların (tight junction) yapısını değiştirerek intraselüler kalsiyum seviyesini artırır ve virusun hücre içine girmesini (endositoz) kolaylaştırılır. NSP4, viral partikülün olgunlaşmasında önemli bir adım olan endoplazmik retikulumdan subviral çift katmanlı partikülün tomurcuklanması için intraselüler reseptör olarak da görev yapar (Rodriguez ve ark 2008). Rotavirus'a ait NSP20, NSP26, NSP34, NSP35, NSP53 gibi yapısal olmayan proteinler ise olgunlaşmış virus partikülünde bulunmayan ancak enfekte hücrede tespit edilen proteinlerdir (Fields ve ark 1996).

Rotavirus'lar, kapsid proteininin antijenik özelliğine göre serolojik olarak serotip, grup ve alt gruplara ayrılırlar (Estes ve Cohen 1989).

1.2.1. Serotipler

BRV suşları, tip spesifik dış kapsid proteinleri olan VP7 ve VP4'ün varlığına bağlı olarak sırasıyla G ve P serolojik tipleri içerisinde değerlendirilir (Estes ve Cohen 1989). Serotipe özgü poliklonal antikorlar kullanılarak yapılan nötralizasyon testlerinin (Wyatt ve ark 1982, Gerna ve ark 1984, Hoshino ve Kapikian 2000)

yanında, rotavirus G ve P serotiplerinin belirlenmesine yönelik olarak monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan ELISA (Shaw ve ark 1985, Akatani ve Ikegami 1987, Taniguchi ve ark 1987), nükleik asit hibridizasyonu, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ve nükleik asit sekans analizi metotları ile serotip sınıflandırılması yapılmaktadır (Glass ve ark 1985, Hoshino ve Kapikian 1994) .

Bovine Rotavirus'un içinde bulunduğu grup A rotaviruslar, VP7 aktivitesine bağlı olarak farklı serotipler içerisinde sınıflandırılabilir (Matsuno ve ark 1985, Midthun ve ark 1989, Urasawa ve ark 1989, Wyatt ve ark 1983). Grup A rotaviruslar arasında 14 adet G serotipine ait rotavirus tanımlanmış olup, sığır izolatları arasında daha yaygın olarak G1, G6, G8 ve G10 serotipine ait rotaviruslar görülmektedir (Estes ve Cohen 1989, Matsuda ve ark 1990). İnsanlarda 10 adet G serotipi, 7 adet P serotipi karakterize edilmiştir (Hoshino ve Kapikian 2000).

Çeşitli araştırmacılar (Dyall-Smith ve Holmes 1984, Glass ve ark 1985) tarafından farklı türlere ait rotavirus'lar üzerinde çeşitli test teknikleri ile yapılan araştırmalar sonucunda farklı türlere ait rotavirus izolatları arasında serotip benzerliği bildirilmiştir. Buna göre domuz, köpek, at rotavirusları ile insan serotip G3 rotavirusu arasında benzerlik olduğu (Hoshino ve ark 1983, Wyatt ve ark 1982), buna rağmen tay (H-1) ve buzağılarda görülen rotavirus serotiplerinin insan rotavirus'undan ayrı olduğu bildirilmiştir (Wyatt ve ark 1982, Hoshino ve ark 1983).

Serotip farklılığı gösteren rotavirus izolatlarının birbiriyle bağlantısı üzerinde in vivo ortamda yapılan çeşitli çalışmalarda (Gaul ve ark 1982, Wyatt ve ark 1982, Bohl ve ark 1984) bu serotipler arasında çapraz koruma sağlanmadığı pasif immunizasyonda serotipin önemini ortaya koymak amacıyla Snodgrass ve ark (1984) tarafından inekler üzerinde yapılan bir araştırmada belirtilmiştir.

Bazı insan ve hayvan rotavirus'ları serotip özgüllüğü bakımından benzerlik göstermektedir. Buzağı ve insan rotavirus'u arasındaki antijenik yakınlığın varlığına ait ilk tespit, immunelektron mikroskopi (IEM) ve immunfloresan (FA) çalışmaları ile ortaya konulmuştur (Flewett ve ark 1974a). Daha sonra insan, buzağı, domuz, kuzu, tavşan ve tay rotavirusları ve SA11 rotavirus üzerinde farklı test teknikleri ile yapılan çalışmalar sonucunda bu etkenlerin aynı grup antijenine sahip oldukları ve grup antijenlerinin virus'a ait iç kapsid protein tabakası üzerinde yer aldığı tespit

edilmiştir (Kapikian ve ark 1975, Kapikian ve ark 1976, Woode ve ark 1976, Thouless ve ark 1977, Woode ve ark 1983). Örneğin; maymun virus SA11, insan serotip G3 virusu ile antijenik olarak çok benzer olduğu ifade edilmektedir. Sığır rotavirus'u ve insan rotavirus'u arasında da gözlemlenen benzer antijenik ilişki, bu iki virus arasında potansiyel bir zoonotik ilgi olduğunu göstermektedir (Albert ve ark 1987, Gaul ve ark 1982).

Bazı hayvan ve insan rotavirus suşları arasında çapraz-nötralizasyon testi, çapraz hibridizasyon tekniği ve dizi analizi yöntemleri sonucunda türler arası rotavirus suşları bakımından antijenik benzerlikler bildirilmiştir (Brüssow ve ark 1990). Bu özellikten yararlanarak hayvan rotavirus suşlarından insanlar için rotavirus aşıları hazırlanmakta ve immunprofilakside kullanılmaktadır (Brüssow ve ark 1990, Nagesha ve Holmes 1991).

1.2.2. Gruplar

Rotavirus'a ait RNA gen segmenti göç profilleri ve genom parçalarına ait birbirinden farklı yapıların tespit edilmesi ile alfabe harfleri ile karakterize edilen serolojik gruplandırmalar gerçekleştirilmiştir. Buna göre, A'dan G'ye kadar uzanan birbirinden farklı 7 rotavirus grubu belirlenmiştir (Pedley ve ark 1983,1986).

Grup A, B, C rotavirusları insan ve hayvanlarda bulunurken, D, E, F grubuna ait rotaviruslar sadece hayvanlarda yer alan serogruplardır (Estes ve Cohen 1989). Grup A rotavirusları özellikle insanlar, genç çiftlik hayvanları, pek çok memeli ve kuş türünü etkileyen önemli enfeksiyöz diyare etkenleridir (Estes ve Cohen 1989). Grup A ve B rotavirusları buzağı ve kuzuları (Chasey ve Banks 1984, Fijtman ve ark 1987, Theil ve McCloskey 1989) enfekte etmekle birlikte grup A rotavirusları buzağı ve kuzularda daha yaygın olup, klinik olarak daha çok önem taşır. Grup A buzağı diyare etkeni olan rotaviruslar arasında en çok bilinen viral suşlar; yenidoğan buzağı diyare virus'u, İngiltere buzağı rotavirus'u, B641 buzağı rotavirus'u, B223 buzağı rotavirus'udur. Yenidoğan buzağılarda görülen sığır rotavirusu özellikle 1-3 haftalık buzağılardaki başlıca diyare etkenleri arasında yer almaktadır (Lucchelli ve ark 1994).

Pararotaviruslar olarak da isimlendirilen grup C rotavirusları ilk olarak Saif ve ark (1980) tarafından domuzlarda ve Rodger ve ark (1982) tarafından insanlarda tespit edilmiştir. İnsan ve domuzlardaki grup C rotaviruslar antijenik olarak yakınlık göstermekte olup benzer yapıda RNA genom elektroforez profili göstermektedir (Saif ve Theil 1985, Bridger ve ark 1986). Grup A ve C rotavirusları morfolojik olarak benzerlik göstermekle birlikte antijenik özellik ve elektroforez profili yönünden farklılık göstermektedir (Saif ve ark 1980, Pedley ve ark 1983, Saif ve Theil 1985).

Grup D, E ve F rotavirusları sadece hayvanlarda tespit edilmiş olan serogruplardır. B, D ve E serolojik gruplara ait rotaviruslar antijenik ve elektroforetik bakımdan farklıdır (Pedley ve ark 1983, Saif ve Theil 1985, Pedley ve ark 1986).

1.2.3. Alt Gruplar

Rotavirus iç kapsid proteini olan VP6 üzerinde bulunan nötralizasyon ile ilgisi olmayan epitoplar, rotaviruslara ait alt grup özelliklerinin karakterize edilmesinde kullanılır. Grup A rotavirusları yine VP6'da bulunan farklı epitoplar ile alt gruplara ayrılabilir. İnsan grup A rotavirusları üzerindeki araştırmalarda, VP6'ya ait moleküler yapıya bağlı olarak Roma rakamları ile karakterize edilen 3 adet alt grup tanımlanmıştır. Bu alt gruplar, monoklonal antikorlar ile reaktivitesine göre alt grup 1, alt grup 2 ve alt grup olmayan (non-subgrup) I ya da II olarak sınıflandırılır (Kalica ve ark 1981, Kapikian ve ark 1981, Greenberg ve ark 1983a, Hoshino ve ark 1987, Mattion ve ark 1989, Urasawa ve ark 1989, Iturriza ve ark 2002). İnsan rotavirus'larının çoğunluğu alt grup I ve II özelliği gösterir (Kapikian ve ark 1981, Greenberg ve ark 1983a). Bazı hayvan (Gottfried domuz suşu alt grup II ve at F1-14 suşu alt grup I ve II) ve insan rotavirus suşları antijenik özellik bakımından her iki alt gruba ait benzer özellikler göstermektedir (Bohl ve ark 1984, Hoshino ve ark 1987, Nagesha ve Holmes 1988). Memeli ve kuş rotavirus suşlarının her ikisinde birden alt grup olmayan (non-subgrup) I ve II mevcuttur (Hoshino ve ark 1987).

1.3. Virusun Replikasyonu

Doğal olarak gastrointestinal sistemdeki incebağırsağa ait villus yüzeyindeki enterosit hücrelerine affinite duyan ve bu hücrelerin sitoplazmasında replike olan rotavirus'lara ait replikasyon stratejisi, ilk olarak maymun böbreğinden elde edilen devamlı hücre kültürü üzerinde yapılan deneysel araştırmalar sonucunda aydınlatılmıştır (Estes ve Cohen 1989).

Rotavirus'un konakçı hücreye bağlanması, enterositlerin yüzeyinde bulunan integrin ve sialik asit içeren gangliozid gibi reseptörler aracılığıyla sağlanır. Sadece üç tabakalı tam rotavirus partikülleri konakçı hücreye bağlanabilir (Nava ve ark 2004).

Sindirim enzimleri (tripsin, pankreatin gibi proteazlar) ile muamelenin invitro rotavirus (Estes ve Cohen 1989) ve BRV (Clark ve ark 1979, Bachmann ve Hess 1981) kültivasyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir. Antiproteaz aktivitesine sahip olan fötal sığır serumu ve serum içerisinde bulunan lesitin gibi bileşimlerin rotavirus replikasyonunu inhibe ettiği bilinmekle birlikte etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Estes ve ark 1979, Vonderfecht ve ark 1988, Walsh ve ark 1985). Tripsin ile muamele edilen ve tripsin ile muamele edilmeyen rotavirus'ların farklı mekanizmalar ile konakçı hücre içerisine yerleştiği MA104 hücrelerinde Rhesus maymun rotavirus'u ile yapılan deneysel bir araştırmada gösterilmiştir (Kantharidis ve ark 1988). Bu araştırmaya göre, deneysel olarak tripsin ile muamele edilen enfeksiyöz rotavirus partikülünün direkt penetrasyon ile hücre membranından 3-5 dk içerisinde sitoplazmaya geçtiği gözlenirken, tripsin ile aktive edilmeyen rotavirus'un 30-50 dakika (dk) içerisinde hücre yüzeyinden kaybolduğu belirlenmiştir.

Rotavirusların hücre kültürlerinde çoğaltılabilmesi için proteolitik enzimlere ihtiyaç duyulmasının nedeni bu enzimlerin dış kapsitte yer alan polipeptit tabakanın parçalanmasında ve enfeksiyözitenin arttırılmasında etkili olmalarıdır (Arias ve ark 1996, Bachmann ve Hess 1981). Rotavirus'un konakçı hücre sitoplazmasına girebilmesi ve produktif enfeksiyon oluşturabilmesi için dış kapsid proteini olan VP4'ün proteolitik enzimler ile VP5 ve VP8 alt ünitelerine ayrışması gereklidir. Bu ayrılma olayı, virus'un konakçı hücreye penetrasyonunu artırır. Ancak rotavirus'un

hücreye bağlanması için gerekli değildir ve alt ünitelerine ayrılmamış olan viral partiküller de konakçı hücre ile füzyon gerçekleştirebilir. Buna göre, konakçı hücreye bağlanmadan sorumlu hemaglütinasyon aktivitesine sahip VP8 ile virus ve konakçı hücre arasındaki ilk etkileşim başlamaktadır. VP8, aynı zamanda epitel hücreler arasındaki yeni oluşan bağlantıların gelişimini inhibe ederek virus'un, bu bağlantıların altında yer alan gizli integrin reseptörlerine ulaşmasını sağlar. Rotavirus ve hücre arasındaki ikinci bir etkileşim, VP5 ve konakçı hücre reseptörü olan integrin (α2β1) arasındaki füzyon olayı ile gerçekleşir (Nava ve ark 2004).

Rotavirus'un konakçı hücreye penetrasyonu, füzyon ile direk hücre içine alınma ya da reseptör aracılıklı endositoz (Ca^{+2} bağımlı endositoz) olayı ile gerçekleştirilmektedir. Reseptör aracılıklı endositoz yolu ile penetrasyonda, konakçı hücre yüzeyinde bulunan primer reseptörler ile konakçı hücre yüzeyine bağlanması sağlanan rotavirus, sekonder reseptörler aracılığıyla gerçekleşen endozom oluşumu ile hücre içine alınır. Bu aşamada, rotavirus'a ait yapısal olmayan proteinlerden olan NSP4, membran plazma membranının permeabilitesini değiştirir. Epitel hücrelerin yüzeyleri arasındaki sıkı bağlantıların yapısı değişerek, intraselüler kalsiyum seviyesi artar ve böylece virusun hücre içine girmesi (endositoz) kolaylaştırılır. Konakçı hücre yüzeyinde değişikliğe uğrayan Ca^{+2} konsantrasyonu ile birlikte gerçekleşen Ca^{+2} bağımlı endositoz süreci ile enfeksiyöz rotavirus partikülleri sitoplazma içerisine alınır. Artan permeabilite ile endozom keseciğinin yıkımlanması sonucunda, transkripsiyonel olarak aktif viral partiküller sitoplazma içerisine salınır (Ruiz ve ark 2000).

Hücre kültürü ortamında tripsin ile ayrışmamış rotavirus partikülleri enfektif değildir ve konakçı hücre içerisine yavaş bir şekilde girer. Tripsin ile muamele edilmemiş virus partikülleri, fagositoz yolu ile hücre içine geçtikten sonra lizozomlar içerisine alınır ve lizozom enzimleri ile kapsidden sıyrılır (Estes ve Cohen 1989). Tripsin ile aktive olan rotavirus'lar ise direkt olarak konakçı hücre membranından geçerek konakçı hücre içine girerek hızlı bir şekilde internalize olurlar ve enterositlerin sitoplazmasında prodüktif enfeksiyon gerçekleştirilir. Konakçı hücre içindeki düşük Ca^{+2} konsantrasyonu ortamında rotavirus'a ait dış kapsidin ayrılması gerçekleşir. Üç katmanlı tam virus partikülleri, transkripsiyonel olarak aktif olan çift tabakalı partiküller (double-layered particle; DLP) haline dönüşür. Rotavirus ile

enfekte olan hücreler, viral double strain RNA (dsRNA)'nın replikasyonu için gerekli olan enzimlere sahip olmadıklarından dolayı gerekli replikasyon enzimleri (RNA'ya bağlı RNA polimeraz) viral partiküller tarafından sağlanır.

Bu partiküller içindeki viral RNA, virusa ait RNA polimerazın aktivasyonu ile Messenger RNA (Mrna)'ya (pozatif polariteli single strain RNA:+ssRNA) transkribe olur. Viral mRNA'lar viral proteinlerin sentezi ve negatif polariteli RNA sentezi için kalıp görevi görür. Yeni sentez edilen viral proteinlerden VP1, VP3 ve mRNA segmentleri sitoplazmadaki viroplazma içinde yeni viral öz bölgelerini oluşturmak için paketlenir. Çift sarmallı RNA genomu oluşturmak amacıyla gerçekleştirilen negatif polariteli RNA replikasyonu, virus'a ait öz bölgelerinin içinde gerçekleşir. Subviral partiküller, viroplazma ile bağlantılı olarak oluşturulur. Viroplazma içinde yer alan VP6 proteini, yeni oluşan öz bölgelerini çevreleyerek yeni çift tabakalı partiküller ile birleştirilir. Yüzeyinde VP6 proteini ve iç kısmında öz bölgesi bulunan bu çift tabakalı yeni subviral partiküller, endoplazmik retikulumun (ER) membranında bulunan NSP4 reseptörlerine VP6 proteini ile bağlanır ve tomurcuklanma ile geçici bir zarf kazanıp ER lümenine girer. ER membranında bulunan integral membran glikoprotein VP7 proteini de tomurcuklanma sırasında kazanılır. Rotavirus dış kapsidinde yer alan VP4 proteini, sitoplazmik bir proteindir ve bu protein de tomurcuklanma sırasında kazanılır. Viral partiküller ER içinde ilerlerken, geçici zarlarını ve NSP4'leri kaybeder. VP4 ve VP7 virusun dış kapsidini yapmak üzere organize olur ve virusun olgunlaşması sonucu üç tabakalı partiküler (TLP) oluşur. ER'da tomurcuklanma ve virusun olgunlaşması için yüksek Ca^{+2} konsantrasyonu gereklidir. Olgunlaşma aşamasını takiben hücre lizisi ile virionların hücre dışına saçılımı gerçekleştirilir (Suzuki ve ark 1985, Estes ve Cohen 1989). Rotavirus'un ER'dan intestinal hücrelerin apikal yüzeyine veziküller içinde taşındığı ve bu veziküllerin hücre lizisi ile serbest kalmadan plazma memranı ile füzyonu sonucunda da virionların konakçı hücreden salınabildiği bildirilmiştir (Estes ve Cohen 1989).

1.4. Çevresel Koşullara Duyarlılık

Geniş bir konakçı dağılımına sahip olan rotaviruslar, dış etkenlere dirençli olup başka bir konakçıya bulaşma gerçekleştirilmediği takdirde bile haftalar ya da

aylarca dış ortamda varlığını sürdürebilmektedir. Yüksek pH ortamında rotavirusa ait dış kapsid yüzeyinde bulunan ve hemaglütinasyon aktivitesine sahip olan spike (VP4) yapısının kaybolduğu bildirilmiştir (Anthony ve ark 1991). Kediye ve insana ait rotaviruslar ile yapılan deneysel araştırmalar sonucunda, +4^{o}C'de 1,5 mM $CaCl_2$ içinde stabilize edildiklerinde +20^{o}C'de aylarca virus enfeksiyözitesinin korunabildiği bildirilmiştir. Virusa ait hemaglütinasyon aktivitesi 45^{o}C'de hızlı bir şekilde kaybolmaktadır. Enfektivite ve hemaglütinasyon aktiviteleri, tekrarlayan dondurma ve çözdürme işlemleriyle de bozulabilmektedir (Estes ve ark 1979). Dışkı örneklerinde SA11 rotavirus nükleik asit stabilitesinin araştırıldığı deneysel bir çalışmada (Ramos ve ark 1998), yaklaşık olarak 10ºC'de 32 ay boyunca viral enfektivitenin korunduğu bildirilmiştir. Dışkıdaki BRV'nin oda sıcaklığında 7 ay boyunca enfektivitesini koruduğu bildirilmiştir (Flewett ve ark 1975).

Buzağı dışkısında bulunan rotavirus'un, oda sıcaklığında 6 ay kadar canlılığını koruduğu bilinmektedir (Flewett ve ark 1975). Iodophore (%4, %1 ve %0,31'lik), sodyum hipoklorit (%3) solüsyonu, lysol (%5) ya da formaldehit tuzu (%10), kuzuya ait enfekte bağırsaktan izole edilen rotavirus titresi üzerinde çok az etkilidir. Rotavirus ile enfekte kuzuya ait bağırsak içeriğinin lysol (%5) ve formaldehit tuzu (%10) ile en az 2 saat süre ile muamelesinin rotavirus üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Snodgrass ve Herring 1977). Fenol, formalin, klorin, betapropiolakton ve ozon gibi dezenfektanlar ile rotavirus enfeksiyözitesi inaktive edilebilir (Kurtz 1980).

SA11 rotavirus inokule edilmiş hücre kültüründe yapılan deneysel araştırmanın sonucunda (Ramos ve ark 1998), eter ve kloroform gibi organik çözücülerle muamelenin, tekrarlanan dondurma çözdürme işlemleri gibi çeşitli etkenlerin varlığında bile virus enfektivitesini etkilemediğini göstermiştir. Sodyum hipoklorit ve formaldehit gibi iyonik olmayan dezenfektanlar, dışkıdaki rotavirus üzerinde düşük seviyede etki yapar. Etanol (%95'lik), dışkıda bulunan rotavirus'a karşı belirtilen en etkili dezenfektandır ve virusa ait dış kapsidi yok ederek etkisini gösterir (Kapikian ve Chanock 1990). Virus, 37ºC'de 1 saat, 25ºC'de 24-48 saat ve 50ºC'de 5 dakika boyunca dayanıklılık göstermektedir (Estes ve ark 1979). Ayrıca insan sütünde pastörizasyondan (80ºC'de 15 dk) sonra bile rotavirus tespiti yapılmıştır (Benkaddour ve ark 1993). Tripsin, pankreatin ya da elastin gibi çeşitli

sindirim enzimleri ile muamele sonucunda virus enfektivitesinin arttığı bilinmektedir. Virus enfektivitesinin 3,5-10 gibi geniş bir pH aralığında korunduğu bildirilmiştir (Kapikian ve Chanock 1990). Ethylen diamine tetra acetic acide (EDTA) gibi bağlayıcı özellikteki kimyasalların, virusa ait VP4 ve VP7 proteinlerini yok ederek viral partikülleri enfeksiyon kabiliyetinden yoksun partiküller haline dönüştürdükleri bilinmektedir (Cohen ve ark 1979).

1.5. Epidemiyoloji

Ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan sığır yetiştiriciliğinde düzenli olarak sağlıklı buzağı alınamaması, verimliliği etkileyen en önemli faktörlerdendir. Buzağı yetiştiriciliğinde doğumu takip eden 0-28. günleri kapsayan neonatal dönem, BRV enfeksiyonu bakımından en kritik dönemlerdendir (Mickelsen ve Evermann 1994). Neonatal buzağı hastalıkları ve ölümleri sığır yetiştiriciliği yapılan tüm işletmelerde önemli sağlık problemlerindendir. Ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Buzağının ölümü, ölümle birlikte genetik materyalin kaybı, tedavi masrafları, iyileşme görülmesine rağmen yaşamın daha sonraki dönemlerinde performans gerilemesinden kaynaklanan kayıplar bunlardan birkaçıdır (Arda 1988, Eskiizmirliler ve ark 2001).

Buzağılarda neonatal dönem hastalıklarını, enfeksiyöz (bakteriyel, viral, paraziter ve mikotik) ve nonenfeksiyöz (vitamin, mineral madde, iz element yetersizlikleri, konjenital anomaliler vs) etkenlere bağlı olarak sınıflandırmak mümkündür. Neonatal dönemde görülen hastalıklar ve ölümlerle ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda hastalık ve ölüme yol açan etkenler olarak en çok; Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), rotavirus, coronavirus, astrovirus, bovine viral diarrhea virus (BVDV), parvovirus, adenovirus, *Escherichia coli, Salmonella, Clostridium perfiringes, Campylobacter spp., Eimeria spp.* ve *Cryptosprodium spp.* bildirilmektedir (Diker ve İstanbulluoğlu 1983, Burgu ve Öztürk 1986, Sezen 1986, Aytuğ 1986, Blowey 1993, Wikse ve ark 1994).

Rotavirusların başlıca bulaşma yolu, fekal-oral yoldur. Enfekte hayvanların dışkıları ile yüksek miktarda (yaklaşık 10^{11} partikül/g) virus partikülü etrafa saçılır ve enfeksiyonun 3. veya 4. günü bu saçılım en üst seviyeye ulaşır (Ahmed ve Stevens

1990, Murphy ve ark 1999). Rotavirus'ların çevre koşullarına ve inaktivasyona karşı oldukça dayanıklı olması ve aylarca canlı kalabilmeleri nedeniyle BRV ile enfekte diyareli buzağıların dışkısı önemli bir çevresel kontaminasyon kaynağıdır (Murphy ve ark 1999).

Seroepidemiyolojik ve moleküler epidemiyolojik bulgulara göre, rotaviruslar insan ve hayvan populasyonlarında dünya çapında bir yaygınlık göstermektedir (Brown ve ark 1987, 1988, Flores ve ark 1988, Gaul ve ark 1982, Hoshino ve ark 1984, Mattion ve ark 1989, Penaranda ve ark 1989, Urasawa ve ark 1989). İnsan ve hayvan rotavirusları belirli antijenik özellikleri bakımından benzerlikler göstermektedir (Flewett ve Woode 1978, Kalica ve ark 1978, Kapikian ve ark 1981, Hoshino ve ark 1984, Saif ve Theil 1985, Bridger ve ark 1986, Eiden ve ark 1986, Gaul ve ark 1982, Brown ve ark 1987, Hoshino ve ark 1988, Yolken ve ark 1988). Bu durum, türler arasında karşılıklı bir enfeksiyon varlığı olasılığını akla getirmektedir (Flewett ve Woode 1978, Kalica ve ark 1978, Woode ve ark 1978).

Gelişmiş ve gelişmekte olan farklı ülkelerde yapılan epidemiyoloji çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular, buzağı yaşamının ilk dönemlerini etkileyen faktörler arasında neonatal buzağılarda görülen rotavirus enfeksiyonunun önemli bir orana sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Dünyanın çeşitli ülkelerinde, farklı yaş gruplarındaki buzağılara ait morbidite ve mortalite oranlarını belirleyen epidemiyolojik çalışmalar (Andrews ve Read 1984, Blowey 1993, Sivula ve ark 1996, Collery ve ark 1996, Donovan ve ark 1998, Dutil ve ark 1999, Gitau ve ark 1994, French ve ark 2001, Svensson ve ark 2003, Wudu ve ark 2008) yapılmıştır. Hemen her yaştaki buzağılar rotavirus enfeksiyonuna duyarlı olmakla beraber, rotavirus epidemiyolojisi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda enfeksiyonun özellikle 1 yaşın altındaki buzağılarda daha yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (Bridger 1994, Collery ve ark 1996). Buzağılarda doğumu takiben 2. güne kadar erken (Garcia-Sanchez ve ark 1993) BRV tespiti bildirilmekle birlikte, BRV pozitif olgularda kaydedilen ortalama yaş, genellikle doğum sonrası ikinci haftaya rastlamaktadır. BRV enfeksiyonu görülen buzağılara ait yaş ortalaması, Steiner ve ark (1997) tarafından 13 gün, Burgu ve ark (1995) tarafından 12,7 gün ve Alkan (1998) tarafından 13,6 gün olarak bildirilmiştir.

Soğuk ve kuru hava ile seyreden aylarda, ılık ve rutubetli seyreden aylara göre daha sık olarak enfeksiyon bulgusu bildirilmiştir (Cilla ve ark 2000, Yazıcı 1992). Ayrıca melez hayvanların yerli ırklara oranla rotavirus enfeksiyonuna karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Chauhan ve Singh 1996).

Rotavirus enfeksiyonları lokal enfeksiyonlardır ve serum antikorlarının korunmada etkinliği konusunda şüpheler söz konusudur. Seropozitif subklinik erişkin sığırlar, yenidoğan buzağılar için enfeksiyon kaynağı durumundadır. Bununla birlikte kolostrum/süt yolu ile buzağıların pasif olarak enfeksiyondan korunması mümkün olabilmektedir (Çabalar 2004).

Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde, klinik enfekte yenidoğanların yanı sıra, subklinik enfekte erişkin sığırlar ve sağlıklı görünümlü enfekte buzağıların da neonatal dönemdeki buzağılara enfeksiyonun bulaştırılmasında ve sürüde enfeksiyonun devamlılığının sağlanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (Benfield ve ark 1982, Chauhan ve Singh 1996, Goto ve ark 1986, Myers ve ark 1984). Ishizaki ve ark (1995) kapalı bir işletmede 3 yıl boyunca yaptıkları bir çalışmada, ishalli ve sağlıklı buzağılardan identifiye ettikleri BRV'nin antijenik değişikliğe uğramadan 3 yıl boyunca aynı ortamda belirlendiğini ifade etmişlerdir. Erişkin sığırların, enfeksiyonu klinik enfekte hayvanlar ile yakın temas sonucunda aldıkları ve kronik olarak saçtıkları virus ile sürüde enfeksiyonun devam etmesini sağladıkları bildirilmiştir (Woode ve Bridger 1975). Kodituwakku ve Harbour (1990) gebe sığırlarda rotavirus'un aralıklı olarak saçılarak yenidoğanların virusu almaları sonucu klinik enfeksiyon şekillendiğini, barınakların dezenfeksiyon sonrası dönemlerde kontaminasyon kaynağı olabileceğini bildirmişlerdir. Çabalar (2004)'e göre, seropozitif subklinik erişkin sığırların, enfeksiyonun epidemiyolojisinde bulaşma kaynağı olarak rol oynayabilecekleri düşünülmelidir. Bu nedenle, epidemiyolojik açıdan erişkin sığırlardaki rotavirus enfeksiyonları ile yenidoğan buzağılardaki diyare olgularının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Çabalar 2004).

Erişkin subklinik enfekte sığırlardaki rotavirus saçılımı, gebeliğin geç dönemlerinde, özellikle doğum yaptıkları gün, muhtemelen hormonal değişiklikler ve hormonların immun sistemdeki immunosupresif etkilerine bağlı olarak artmaktadır. Böylece enfekte hayvanlar, yenidoğanların etkeni edinmelerinde ve virus'u etrafa yaymalarında önemli bir rol oynamaktadırlar (Murakami ve ark 1987).

Bovine Rotavirus enfeksiyonunun tanısı, virus-antijen tespiti ya da virus'a spesifik antikorların belirlenmesi ile yapılmaktadır (Crouch ve Acres 1984, Burgu ve ark 1995, Alkan ve ark 1999, Şahna ve Alkan 2003, Çabalar 2004, Tan ve ark 2007, Yavru ve ark 2008, Yıldırım ve ark 2008).

Türkiye'de diyare semptomlu sığır ve buzağılarda BRV'ye ilişkin enteritislerin varlığı çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Alkan ve ark 1992, Burgu ve ark 1995). Buna göre Burgu ve Akça (1983), yaptıkları çalışmada seropozitiflik oranını %28,3 olarak bulurken, daha sonra yapılan bir çalışmada (Burgu ve ark 1995) bu oran %31 olarak belirlenmiştir. Alkan ve ark (1999), ileri gebe sığırlarda %43,8 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir.

Alkan ve ark (1999) ülkemizdeki 8 farklı işletmeden örnekledikleri 585 erişkin sığıra ait dışkı örneğini BRV antijenleri yönünden incelemişler ancak pozitif örnek belirleyememişlerdir. Serum örneklerinde yapılan kontrollerde ise işletmelere göre %14 ile %78 arasında değişen oranlarda (ortalama %43) seropozitiflik saptanmıştır.

Yazıcı (1992) buzağılarda rotavirus enfeksiyonun seroepidemiyolojisi üzerine yapmış olduğu araştırmada, sağlıklı ve diyare semptomlu buzağılardan toplanan kan örneklerinde %22,86 oranında rotavirus antikoru ve dışkı örneklerinde ise %17,80 oranında rotavirus antijeni tespit etmiştir.

Tan ve ark (2007) Aydın yöresinde bulunan farklı sığırcılık işletmelerinde BRV enfeksiyonunun seroprevalansı ve yaş gruplarına göre spesifik antikorların dağılımını incelemişlerdir. Buna göre, 1 gün-2 ay arasındaki yaş grubunun en az seropozitifliğe (%17,9) sahip olduğu, en yüksek seropozitifliğin ise 7 ay ve üzerindeki yaş grubunda bulunan hayvanlarda (%47,2) görüldüğü bildirilmiştir.

Yavru ve ark (2008), 1-6 ay yaşındaki diyare semptomlu buzağılar ve annelerine ait serum ve dışkı örneklerini ticari olarak sağlanan indirekt ve direkt ELISA ile test etmişler, bu buzağılara ait 190 adet ve 2 yaşın üzerindeki annelerine ait 184 adet kan serumu örneği üzerinde çalışan araştırmacılar (2008), rotavirus varlığı bakımından 164 adet sığır ve bunlara ait 144 adet buzağıda seropozitiflik tespit etmişlerdir. Buna göre, 6 yaş ve üstü annelerde rotavirus antikor düzeyi

(%32,33) en yüksek seviyede iken, 2-3 yaş arasındaki annelerde en düşük seviyede (%10,18) tespit edilmiştir. 5-6 aylık erkek buzağılarda antikor düzeyi en yüksek seviyede, 3-4 aylık dişi buzağılardaki antikor seviyesi ise en düşük seviyede tespit edilmiştir.

Yıldırım ve ark (2008) ülkemizin kuzeydoğusunda bulunan 1 yaşın üzerindeki aşılanmamış sığırlara ait 498 adet kan serumunda BRV ve BCV enfeksiyon prevalansının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdikleri serolojik bir araştırmada, test edilen 146 adet serum örneğinin %29,3'ünde BRV enfeksiyon varlığını belirlemişlerdir.

Ülkemizde diyare semptomlu buzağılarda BRV enfeksiyonunun varlığı ile ilgili olarak gerçekleştirilen serolojik ve virolojik araştırmaların (Burgu ve ark 1995, Emre ve Fidancı 1998, Alkan 1998, Çabalar ve ark 1998, Çabalar ve ark 2001) sonucunda, rotavirus enfeksiyon prevelansının %0-53 arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir.

Rotavirus ile sıkça karşılaşılan kombine enfeksiyonlar, kombinasyona katılan viral ajan çeşitliliğine bağlı olarak çok ciddi boyutlara ulaşabilir. Diyare semptomu gösteren hayvanlardan alınan dışkı örneklerinde rotavirus ile birlikte farklı enteropatojenik etkenler de izole edilebilmektedir. Bunlar arasında başta *Escherichia coli* ve coronaviruslar olmak üzere, *Clostridia, Criptosporidium* gibi etkenler yer almaktadır. Bu etkenlerle beraber şekillenen ortak bir enfeksiyon, hastalığın prognozunu kötüye sürükleyebilmektedir (Blowey 1993, Butler ve Clarke 1994, Garcia ve ark 2000).

Buzağı morbidite ve mortalitesinin belirlendiği çalışmalarda çeşitli ülkelerdeki araştırmacılar (Ernst ve ark 1985, Blowey 1993) tarafından farklı oranlarda rotavirus enfeksiyon yüzdesi bildirilmiştir. Blowey (1993) rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium, Escherichia coli* (verotoksijenik veya enterotoksijenik) ve *Salmonell*a mikroorganizmalarının sırasıyla %42, %14, %23, %13 ve %12 oranında buzağı diyaresine neden olduğunu bildirmiştir. Neonatal diyare semptomlu buzağılar ile yapılan bir çalışmada ise *Cryptosporidium spp*., rotavirus, *Escherichia coli*, coronavirus ve *Salmonella spp*. sırasıyla %52,3, %42,7, %11,9, %7,3 ve %0,9 oranında belirlenmiştir (Ernst ve ark 1985). Buzağı diyaresinin

şekillenmesinde *Clostridium perfringens* tip A, B, C, D ve bunların eneterotoksinlerinin de rolü olduğu çeşitli araştırmacılar (Radostits ve ark 1994, Fleming 1994, Manteca ve ark 2001) tarafından belirlenmiştir.

Garcia ve ark (2000) İspanya'da bir sütçü sığır çiftliğinde bulunan diyare semptomlu 1-30 günlük buzağılardan elde edilen 218 adet dışkı örneğinde, rotavirus ile eş zamanlı olarak meydana gelen coronavirus, *Cryptosporidium*, $F5^+$ *Escherichia coli* ve *Salmonella spp* varlığını ortaya koymak amacıyla buzağıları 1–7, 8–14, 15–21 ve 22–30 gün olarak belirlenen çeşitli yaş gruplarına göre enfeksiyon oranını belirlemişlerdir. Bu çalışmanın sonucuna göre, belirtilen yaş gruplarında sırasıyla %46,9, %45,6, %33,8 ve %48,3 oranında rotavirus varlığı belirlenmiştir. Buna göre, rotavirus varlığı bakımından yaş grupları arasında çok farklı bir oran olmadığı tespit edilmiştir.

Björkman ve ark (2003) İsveç'te bulunan bir sütçü sığır işletmesindeki 90 günden daha küçük buzağılarda, *Cryptosporidium parvum ve Giardia intestinalis* varlığını, rotavirus, coronavirus ve *Escherichia coli* K99+ ile karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Buna göre, toplam 270 adet buzağı dışkı örneği ile yapılan teşhis çalışmasının sonucunda, rotavirus ile enfekte hayvan sayısı 35 (%13), olarak belirtilmiştir.

Buzağı hastalıkları ve ölümlerinin gelişmiş ülkelerde dahi ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı bilinmektedir. 1978 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde BRV enfeksiyonu sonucu oluşan ekonomik kaybın 95 milyon $ ile ifade edilirken (House 1978), 1994 yılında 976 milyon dolar ($)'a ulaştığı (Toombs ve ark 1994), %5 oranında buzağı mortalitesi görülen İngiltere'de ise ekonomik kaybın yıllık 20 milyon sterlin olduğu (Blowey 1993) vurgulanmıştır. Buna ilave olarak buzağılarda perinatal dönemde görülen hastalıkların gelişim bozukluklarına, erişkin yaşlarda ise verim ve performans kaybına neden olduğu birçok araştırmacı (Toombs ve ark 1994, Sivula ve ark 1996, Virtala ve ark 1996) tarafından belirtilmiştir. Ülkemizde yenidoğan buzağılarda BRV ile ilişkili diyare olgusuna bağlı ölümler ve ekonomik kayıplara ait kesin veriler bulunmamaktadır.

1.6. Rotavirus Konakçı Özgüllüğü

Rotaviruslar, kuzu, buzağı ve domuzlarda önemli bir diyare etkenidirler. (Flewett ve Woode 1978, House 1978, Torres-Medina ve ark 1985). BRV'ye bağlı enfeksiyon, erişkinlerde genellikle subklinik enfeksiyon meydana getirmekle birlikte farklı türlere ait yenidoğanlarda akut enterite neden olurlar. Fare, maymun, kedi, insan, domuz, at, koyun, keçi, antilop, bizon, geyik, tavşan, köpek, buzağı, tavuk, hindi, ördek ve papağanlar üzerinde yapılan araştırmalarda rotavirus izolasyonu bildirilmiştir (Baumeister ve ark 1983, Christensen 1989, Cukor ve Blacklow 1984, Flewett ve Woode 1978, Fulton ve ark 1981, Holmes 1979, Hoshino ve ark 1981, Jones ve ark 1979, McNulty ve ark 1979, Muniiappa ve ark 1987, Puntel ve ark 2002, Rodgers ve Baldwin 1991).

Rotaviruslar çeşitli evcil kuş türlerinden de izole edilmiştir (Minamoto ve ark 1988, Takehara ve ark 1991, Legrottaglie ve ark 1997). Rotavirus'ların hindi, sülün ve güvercinlerde şiddetli diyareyi takiben mortaliteyi arttıran önemli etkenler arasında olduğu belirtilmiştir (McNulty ve ark 1980, Legrottaglie ve ark 1997, Battilani ve ark 2003). Tavukların rotavirus enfeksiyonuna duyarlı olduğu belirtilmekle birlikte klinik belirtilerin hafif olduğu ya da hiç bulunmadığı bildirilmiştir (Yason ve Schat 1987). Brüssow ve ark (1992a) Almanya'da diyare belirtisi gösteren 3 günlük bir buzağıya ait dışkı örneğinde sığır rotavirus 993/83 suşunu izole etmişlerdir. Araştırmacılar (1992a), izole ettikleri bu virusun genetik ve antijenik özellikleri bakımından memeli rotavirus'undan daha çok avian rotaviruslarına yakınlık gösterdiğini tespit etmişlerdir (Brüssow ve ark 1992b, Ito ve ark 1997, Rohwedder ve ark 1997).

Offit ve ark (1984) yenidoğan farelere SA11 rotavirus suşunu oral yoldan inokulasyonu ile yaptığı deneysel çalışma sonucunda gastrointestinal yolda virus replikasyonunu, klinik semptomlar, ince bağırsaklardaki histopatolojik bulgular ve tip spesifik humoral immun yanıt bulguları ışığında değerlendirmişlerdir.

Genellikle daha az yer kaplamaları, daha ekonomik olmaları, çok sayıda hayvan ile aynı anda çalışabilme imkanının bulunmasından dolayı, daha çok tavşan ve fare gibi küçük hayvan modellerinde çeşitli türlere özgü rotaviruslar ile çalışılmıştır (Ciarlet ve ark 1998a, 1998b, 1998c, 2000, Ciarlet ve Conner 2000,

Conner ve ark 1888, Conner ve ark 1991, 1993, Conner ve Ramig 1996). Rotavirusa bağlı aktif humoral bağışıklık ve korumanın kontrolüne ilişkin deneysel araştırmanın yapıldığı ilk hayvan modeli tavşandır. Conner ve ark (1988) 4 aylık Yeni Zelanda tavşanı ile deneysel rotavirus inokulasyonu çalışmaları neticesinde bu hayvanların hem primer hem de sekonder aktif bağışıklık çalışmalarında iyi bir deney hayvanı modeli olabileceği yönünde fikir birliğine varmışlardır. Araştırmacılar (1988), olası bir rotavirus aşısı geliştirilmesinde de bu hayvanlar ile çalışmanın uygun olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmayı takiben yetişkin fare modeli üzerinde rotavirus ile çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Burns ve ark 1995, Feng ve ark 1994, Ward ve ark 1990, Ward ve ark 1992).

Ciarlet ve ark (2002) doku kültürüne adaptasyonu sağlanmış insan (Wa, WI61, HAL1166), simian (rhesus rotavirus [RRV], SA11), sığır (WC3), tavşan (ALA), domuz (OSU), vahşi-tip sıçan (ECwt) grup A rotavirus suşları ile phosphate-buffered saline (PBS) karışımını yenidoğan ve yetişkin ratlara oral yolla inokule ederek yaptıkları deneysel araştırmanın sonucunda dışkı ile saçılan enfeksiyöz virus titresini tespit edip ince bağırsakta histopatolojik değişiklikler görmüşlerdir. Ayrıca, bağırsak bölümlerindeki rotavirus antijen dağılımını immunfloresan (IF) test tekniği ile tespit etmişlerdir.

1.7. Türler Arası Bulaşma

Çeşitli canlı türlerine ait rotaviruslar arasında genetik olarak etkileşim söz konusudur. İnsan rotaviruslarının hayvanları enfekte ettiğine ve diyareyi tetiklediğine ilişkin araştırmalar bulunmaktadır (Mebus ve ark 1976, Wyatt ve ark 1976). Örneğin, insan rotavirusları, buzağı (Derbyshire ve Woode 1978, Mebus ve ark 1977, Woode ve Crouch 1978), kuzu (Davidson ve ark 1977, Derbyshire ve Woode 1978, Snodgrass ve ark 1984), domuz (Davidson ve ark 1977, Derbyshire ve Woode 1978, Woode ve Crouch 1978) gibi çeşitli hayvanları enfekte edebilmektedir.

Albert ve ark (1987) hayvanlarda enfeksiyon oluşturan rotaviruslar ile insan rotavirusları arasındaki çapraz reaksiyonun varlığını PAGE tekniğini kullanarak ortaya koymuşlardır. İnsana ait rotavirus izolatı ile yapılan genotip ve sekans analizi çalışmaları sonucunda, bu izolatlara ait genotipin çeşitli hayvan suşlarına ya da

hayvan-insan rotavirus genetik reassortmentleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Ward ve ark 2006).

Çeşitli serolojik gruplara ait rotaviruslar, farklı memeli türlerini enfekte edebilimektedir. Örneğin, serogrup B ye ait rotaviruslara ait antikor ya da antijenler, insan (Brown ve ark 1987), fare (Eiden ve ark 1985) ve domuz serumunda (Eiden ve ark 1986) tespit edilmişlerdir. Çinli çocuklarda ve yetişkinlerde görülen şiddetli diyare salgını, grup B rotavirusların zoonoz olabileceği hakkında spekulasyonlara yol açmıştır (Eiden ve ark 1985, 1986).

Yenidoğanlara yapılan canlı attenüe sığır ve simian rotavirus aşı uygulamaları sonucunda, hayvan rotaviruslarının deneysel olarak insanları enfekte edebildiği ortaya konulmuştur (Kapikian ve ark 1986). Hayvan rotaviruslarının insanlarda doğal olarak diyare etkeni olarak görülmesine dair henüz sınırlı bilgi vardır (Eiden ve ark 1985, 1986, Burns ve ark 1989). Bir istisna olarak bir kediye ait rotavirus gastroenteritli bir çocuktan (Nakagomi ve Nakagomi 1989) ve sığıra ait iki rotavirus yine gastroenteritli iki çocuktan izole edilmiştir (Gerna ve ark 1992). Doğada bu durumun benzeri olan türler arası bulaşma olgusuna ait çok fazla kanıt mevcut değildir (Estes ve Cohen 1989).

Amerika ve diğer bazı ülkelerde buzağılar üzerindeki epidemiyolojik çalışmalara göre, VP7'ye ait G6 ve G10 serotiplerinin sıkça görüldüğü bildirilmiştir (Parwani ve ark 1993, Lucchelli ve ark 1994). BRV'ye ait diğer G serotipleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Hussein ve ark 1995, Parwani ve ark 1993, Lucchelli ve ark 1994). Sığır rotavirus'una ait saha suşları arasında G1, G2, G3, G8 ve G11 tiplerinin varlığı çeşitli araştırmacılar (Blackhall ve ark 1992, Hussein ve ark 1995, Parwani ve ark 1993, Lucchelli ve ark 1994) tarafından bildirilmiştir. G6 ve G10 dünya üzerindeki buzağılar arasında en yaygın olarak görülen rotavirus serotipleridir. Buna rağmen domuz ve attan izole edilen G8 serotipi daha az yaygındır. G6 (Beards ve ark 1980) ve G10 (Gerna ve ark 1992) spesifikliği gösteren insan rotavirus suşları üzerindeki son çalışmalara göre; bu tipler normal olarak sığır populasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Adah ve ark (2003) Nijerya'da sığır ve insandan izole edilen G8 serotipine ait rotaviruslar arasında genetik yönden benzerlik tespit etmişlerdir.

İnsanda bulunan G ve P serotiplerine ait kombinasyonlar çeşitli hayvan türlerinde de tespit edilmiştir. Örneğin, Amerika ve Kanada'daki buzağılarda (Lucchelli ve ark 1994) Hindistan'daki inek ve buffalolarda G10 P[11] varlığı bildirilmiştir (Gulati ve ark 1999).

Nakagomi ve ark (1990) köpek ve kedi rotavirus suşlarına ait VP7 gen sekans analizine göre, bu iki rotavirus arasında yüksek derecede homoloji bulunması türler arası bulaşma olasılığını düşündürmektedir.

Rotavirus'a ait segmentli genom yapısı, influenza virusu gibi segmentli genom yapısına sahip diğer viruslarda olduğu gibi reassortment mekanizması ile yeni şuşlar şekillendirebilmektedir. İki farklı rotavirus suşunun aynı konakçı hücreyi enfekte etmesi ile başlayan genetik reassortment olayı sırasında, replikasyon ve kurgulanma aşamasında genom segmentlerinin değiştirilmesi söz konusudur (Ramig 1997). Rotavirus enfeksiyonları ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar, insan ve hayvan populasyonları arasında sürekli dolaşım halinde olan suş çeşitliliğinin arttığını göstermektedir. Artan suş çeşitliliğinin nedeni, nokta mutasyonların zaman içindeki birikimi (genetik drift) ile birlikte, soy ağacını etkileyen ve antikordan kaçışı sağlayan mutantların ya da aynı hücreyi etkileyen ikili enfeksiyonlar sonucunda meydana gelen genetik reassortment etkisi ile açıklanabilir (Iturriza ve ark 2003).

Brüssow ve ark (1992b)'na göre, 3 günlük diyare semptomlu buzağı dışkısında saptanan bir rotavirus izolatının bilinen diğer sığır rotavirus suşlarından farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar (1992b), serolojik ve moleküler analizler sonucunda bu izolatın bir kuş rotavirusu ile yakın ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılara (1992b) göre, tespit edilen bu sığır rotavirus izolatı, omurgalılara ait farklı sınıflar arasında doğal olarak gerçekleşen bir genetik reassortment varlığını kanıtlamaktadır.

Hurtado ve ark (1995) Kuzey Amerika'daki ishalli buzağılara ait dışkı örneklerinde grup A BRV'ye ait G1, G2, G3 serotiplerinin belirlenmesi amacıyla geliştirdikleri ELISA sisteminde, birden fazla serotipe sahip iki ayrı BRV suşunun varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacıların (1995) bulgularına göre, bulunan sonuç bu iki rotavirus'a ait ortak bir enfeksiyonun varlığını göstermektedir. G1, G2 ve G3 serotiplerine ait BRV suşları, insan ve hayvan rotavirusları arasındaki doğal

reassortmentler olabileceği gibi doğal olarak hayvan suşları arasında da gerçekleşebilmektedir (Hurtado ve ark 1995). Hurtado ve ark (1995)'na göre, sığır rotavirus G tipleri insan ve diğer populasyonlar arasında sirkülasyon halindedir.

Gratacap-Cavallier ve ark (2000) Fransa'nın doğu bölgesinde rotaviral gastroenteritli çocukların evlerinden aldıkları içme suyu örneklerinde, grup A sığır ve domuz rotavirusu (serotip bildirilmemiştir) tespit etmişlerdir. Çocuklara ait rotavirus izolatı ve suda bulunan izolatlar arasında yakınlık bulunmamakla birlikte, hayvan rotavirusları ile kontamine içme suyunun insan-hayvan virus reassortment olayını kolaylaştırdığı yönünde fikir birliğine varılmıştır.

Mulherin ve ark (2008) akut diyare belirtisi gösteren 14 günlük bir zürafa (*Giraffa camelopardalis*) yavrusundan izole edilen rotavirus'a ait VP4 ve VP7 proteinleri üzerinde yaptıkları detaylı sekans analizi sonucunda, bu izolatın (G10P11), sığır rotavirus'u (BRV) ile moleküler yönden benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Steyer ve ark (2008) domuz, insan ve sığırlara ait dışkı örnekleri ile hayvan türleri arasında zoonotik bir bulaşı varlığını ve rotaviruslar arasındaki genetik reassortmenti tespit etmek amacıyla yapmış oldukları araştırmada, domuz rotavirusu ile insan rotavirusu arasında amino asit sekans benzerliğinin olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizdeki sığırlarda rotavirus enfeksiyonun yaygınlığını belirten serolojik ve virolojik çalışmalar (Burgu ve ark 1995, Burgu ve ark 1999, Emre ve Fidancı 1998, Alkan 1998, Çabalar ve ark 1998, Çabalar ve ark 2001) göz önünde bulundurularak bu araştırmaların yürütüldüğü kamu işletmeleri ile diğer bazı işletmelerde koyun ve sığırların bir arada bulundurulduğu ve türler arası BRV etken nakli olasılığının düşünüldüğü bildirilmiştir (Burgu ve ark 1999). Türkiye'deki farklı türlere ait rotaviruslar ve aynı türler arasındaki rotavirusların moleküler yönden karşılaştırılmasına ilişkin günümüze kadar yapılmış bir çalışma mevcut değildir.

1.8. Patogenez ve Patoloji

Rotavirus'un organizmaya ağız yoluyla alınmasını takiben, ince bağırsakta bulunan farklılaşmış villus kolumnar epitel hücrelerinin (enterosit) enfeksiyonu ile viral replikasyon meydana gelmektedir. Virus replikasyonuna bağlı olarak, enterositlerin yıkımı ve bağırsak boşluğuna dökülmeleri gerçekleşmektedir (Mebus ve ark 1969, Mebus ve ark 1971a). Enfeksiyon, olgun epitel hücrelerinin kaybı ile sonuçlanmaktadır ki, villuslardaki hasarlı hücrelerin yerini adsorbsiyon yeteneği olmayan, olgunlaşmamış ve disakkaridaz ve sodyum potasyum ATPaz aktivitesinden yoksun farklılaşmamış küboidal epitelyum hücreleri almaktadır (Moon 1978, Argenzio 1985). Virus replikasyonuna bağlı olarak meydana gelen yoğun enterosit yıkımı sonucunda, villilerin luminal yüzeyleri boyunca gerçekleşen normal sindirim-adsorbsiyon mekanizması bozularak, bağırsak içi besin ve emilim fonksiyonları kısıtlanır. Villilerin tepesindeki epitel hücrelerinin yerini sürekli olarak kriptlerden prolifere olan yeni hücreler almaktadır. Bu hücrelerdeki yenilenme oranı gençlerde daha yavaştır ve bu nedenle de neonatal hayvanlar enfeksiyona karşı daha duyarlıdırlar (Snodgrass ve ark 1980). İnce bağırsaklar boyunca gerçekleşen enfekte hücre tahribatı sonucunda, villuslarda kısalma ve kaybolma (villöz atrofi), komşu villiler arasında ise füzyon gözlenmektedir (Woode ve Crouch 1978, Woode ve ark 1978). Viral replikasyon sonucunda hasar gören hücreler, bağırsak boşluğuna dökülür ve dışkılama ile büyük miktarda virus atılımı gerçekleşir (10^{10} virus partikülü/g dışkı). BRV virus saçılımı genellikle 2-12 gün sürebilmektedir. Ancak, beslenmesi yetersiz olan sığırlarda normal bağırsak fonksiyonlarının yerine gelmesi 3-8 haftayı bulabilmektedir (Holland 1990).

Olgun enterositlerin, enfeksiyon sonucu dejenerasyonuna bağlı olarak bikarbonat, sodyum, potasyum, klorid ve su kaybı, bunun kaçınılmaz sonucu olarak da asidozis şekillenir (Holland 1990). Bağırsak içerisindeki sindirilemeyen sütün mikrobial fermentasyonu, asidozis şekillenmesinde anahtar rol oynayan diğer bir faktördür (Mebus ve ark 1977). İntestinal laktaz miktarı azalmış olan yenidoğanlar tarafından sütün ağız yoluyla alınması, bağırsak içerisindeki ozmotik düzensizliği daha da şiddetlendirebilir (Chauhan ve Singh 1992). Tüm bu faktörler, genç hayvanlarda bağırsak epitelyumunda meydana gelen yangısal değişimlerle birlikte diyarenin oluşmasında rol alan hipermotiliteye katkıda bulunur (Steele ve ark 2004).

Villus tahribatına bağlı olarak genç hayvanlarda süt ile alınan primer karbonhidrat olan laktoz emiliminin azalması sonucunda, laktoz sindirilmeden ve emilimi gerçekleştirilmeden ince bağırsağa geçer. Sodyum, glikoz ve suyun bağırsak içi emiliminin azalması ile laktaz, alkalin fosfataz, sükroz aktivitesindeki azalma sonucunda diyare şekillenebilir. Glikoz ve sodyum emiliminin jejenumun proksimal ve medial bölümünde gerçekleşmesi nedeni ile bu kısımdaki bir hasar, çok şiddetli bir diyareye neden olabilir. Ancak kolondan da sodyum emiliminin gerçekleşmesi, buradaki epitellerin hasar görmediği enfeksiyonlarda diyarenin şiddetinin daha az olmasına yol açmaktadır. Rota ve coronavirus'ların birlikte seyrettiği enfeksiyonlarda ise hem jejenum hem de kolon hasar gördüğünden diyarenin şiddeti de fazla olmaktadır (Woode ve Bridger 1975).

Yenidoğan sıçanlarda rotavirusla indüklenen intestinal sekresyona ilişkin John Stephen ve ark.'nın 1980'lerin sonunda gerçekleştirdikleri bir araştırmada, villus tepe hücrelerinin rotavirus ile invazyonunun nöroaktif/hormonal maddelerin salınımını tetiklediği, bu durumun villusların kısalmasına neden olduğunu ve böylece ince bağırsak absorbsiyon kapasitesinin düştüğü bildirilmiştir (Lundgren ve Svensson 2001).

McNulty ve Logan (1983)'a göre, BRV enfeksiyonu esnasında herhangi bir karakteristik otopsi bulgusuna rastlanmamıştır. Genellikle akut bir gastroenteritis tablosu görülmekte ve bu durum özellikle duedonum ve ince bağırsağın diğer kısımlarını etkisi altına almaktadır. Makroskobik olarak bağırsaklarda ödem, gerginlik ve bazı olgularda bağırsak mukozasında hemorajik odaklar görülmektedir (McNulty ve Logan 1983).

Rotavirus patojenezinin aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalarda rotavirus enfeksiyonunun sadece gastrointestinal sistemde lokalize olduğu düşünülmekteydi. Rotavirus ile enfekte hayvanlar ve çocuklara ait serebrospinal sıvı ve kan serumu ile yapılan çalışmalarda (Nishimura ve ark 1993, Ushijima ve ark 1994) rotaviral RNA bulgusu rapor edilmiştir. Rotavirus ile enfekte çocuklarda gözlenen patolojik bulgularda rotavirus antijeni ve RNA'sının; merkezi sinir sistemi, dalak, kalp, böbrekler, testis, idrar kesesinde bulunduğu farklı araştırmacılar (Hongou ve ark 1998, Pager ve ark 2000, Li ve ark 2001, Lynch ve ark 2001, Li ve Wang 2003) tarafından bildirilmiştir. Rotavirusun bağırsak içi ortamdan dolaşım

sistemine geçtiğini vurgulayan bu bulgular ışığında Blutt ve ark (2003), türe özgü insan ve hayvan (sığır, domuz, sıçangiller) rotavirus suşları ile yaptıkları moleküler bir araştırmanın sonucunda, ayrı ayrı enfekte edilen immunocompotent (bağışıklık sistem işleyişi normal) çocuk ve hayvan modellerine (fare, tavşan, 1-10 günlük buzağı) ait her iki serum örneğinde rotavirus antijeninin, rotaviral RNA'nın ya da her ikisinin birden mevcut olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacıların (2003) yapmış oldukları bu tespit, gastrointestinal sistemden ayrılıp kan dolaşımına katılan rotavirusun dolaşım sistemindeki viral replikasyonuna (viremi), patogenez ve immunolojik özelliğine dair yeni verilerin elde edilmesine ışık tutacak niteliktedir.

Fare, tavşan, sığır, rat, domuz ve maymun gibi hayvanlara ait serumların yanı sıra, bu hayvanların nazal sekresyonlarında, karaciğer, akciğer, böbrek ve beyinlerinde rotavirus antijeni ya da enfeksiyöz rotavirus tespit edilmiştir (Azevedo ve ark 2005, Jaimes ve ark 2005, Zhao ve ark 2005). Çeşitli rotavirus suşları ile ratlar üzerinde yapılan deneysel bir araştırmada (Crawford ve ark 2006), söz konusu hayvanlara ait kan ve serum örneklerinde enfeksiyöz rotavirusun varlığı gösterilmiştir. Rotavirusun replikasyon için serviks, göğüs, kemik, akciğerler, prostat, ovaryum gibi farklı hücre tiplerini seçiyor olması, gastrointestinal sistem dışındaki organların kan yolu ile kontaminasyonunu düşündürmüştür (Crawford ve ark 2006).

Rotavirus enfeksiyonuna ait patolojik bulgular çeşitli virus türleri ile benzerlik gösterebilir. Rotaviruslar, yenidoğan buzağı diyaresine ait önemli bir etiyolojik etken olan coronaviruslar ile benzer patojenite gösterir (Snodgrass ve ark 1986). Rotavirus ve coronavirus enfeksiyonları, *Cryptosporidium* ile birlikte seyrettiğinde, buzağılardaki mortalite oranı %100'e ulaşabilir (Rosales ve ark 1998). Rotavirus ve astrovirusların villusların apikal yarımındaki hücreleri enfekte ederek diyare oluşturduğu, coronavirusların villusların tamamını enfekte ederek daha fazla villöz atrofi ve diyareye neden olduğu belirtilmiştir (Pensaert ve ark 1994).

1.9. BRV Virulensi

Dodet ve ark (1997) yenidoğanlarda villus enterositlerinin, kriptlerden gelen hücreler ile yer değiştirme hızının daha yavaş olduğunu ve virulensi düşük olan

rotavirus suşlarının bile hastalığa neden olabileceğini, ancak 8 haftalıktan daha büyük buzağılar ve erişkinlerde enterosit göçünün daha hızlı olması sebebiyle virus replikasyon oranının daha yavaş şekillendiği ve bu nedenle ancak virulensi yüksek BRV suşlarının enfeksiyon meydana getirebileceğini bildirmişlerdir. Benzer olarak, Bridger ve ark (1992), düşük virulensli BRV ile gelişen enfeksiyonlarda enterositlerdeki CPE'nin de düşük düzeyde geliştiğini ve bunun subklinik enfeksiyonlara neden olduğunu belirtmişlerdir.

Deneysel olarak rotavirus inokulasyonunun gerçekleştirildiği farklı yaşlara sahip buzağılarda rotavirus etkenine bağlı enfeksiyonun klinik ve subklinik görünümünün araştırıldığı ilk çalışmalarda (Mebus ve ark 1969), 1 günlük buzağılara Amerika sığır rotavirus'u ile yapılan inokulasyonlar sonucu diyare meydana geldiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, dört adet Avustralya rotavirus suşu ile yapılan deneysel enfeksiyonlar sonucunda, 7 günlükten daha büyük buzağılarda enfeksiyona ait herhangi bir hastalık bulgusuna rastlanmamıştır (Tzipori ve ark 1980). Tzipori ve ark (1980) ortak bir yorum yaparak rotavirusun bu yaştaki buzağıları etkilemediği yönünde görüş bildirmişlerdir. Buna rağmen, daha sonra çeşitli Avrupa ülkelerinde gerçekleştirilen araştırmalarda (Bridger ve Woode 1975, Woode ve ark 1978), 8 haftalığa kadar olan buzağılarda doğal ve deneysel yollar ile gerçekleşen rotavirus enfeksiyonuna bağlı hastalık varlığı bildirilmiştir.

Buzağılarda rotavirus patogenezinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda (Mebus ve ark 1969, Logan ve ark 1979, Castrucci ve ark 1983) daha çok 2 günlük buzağılar tercih edilmiştir. İki haftalık buzağılar ile yapılan çalışmalarda (Acres ve ark 1977, Reynolds ve ark 1986) elde edilen sonuçlara göre doğal rotavirus saçılımı, klinik belirtiler oluşturarak ya da oluşturmadan gerçekleşebilir. Yaşa bağlı direncin araştırılması ve hastalığın kontrol edilmesinde aktif immunitenin öneminin bildirildiği çalışmalarda (Bridger ve ark 1992, Bridger 1994, Dodet ve ark 1997) ise daha çok 6 hafta ve daha büyük yaştaki buzağılar üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Bridger (1994) 2 günlük, 2 haftalık, 6 haftalık ve daha ileri yaşlardaki buzağılar ile gerçekleştirdiği deneysel bir çalışmada, $10^{-5,0}$-$10^{-6,5}$ doku kültürü infektif doz 50 ($DKID_{50}$) arasındaki titreye sahip üç farklı sığır rotavirus izolatını

(C3-160, 17/4 ve 39/58) buzağılara inokule ederek, buzağı yaşı ve rotavirus izolatına bağlı olarak elde edilen virulens değerlerini karşılaştırmışlardır. Klinik olarak normal ve hastalıklı görülen buzağılardaki tüm yaş gruplarında en üst seviyedeki virus saçılımı oranları ve virusun saçılım süresi boyunca benzer oranlar kaydedilmiştir. Bu araştırmanın (1994) sonucuna göre, normal olarak gözlenen buzağılarda 4,6 ± 1,2 günlük hayvanların dışkılarının her bir gramında $10^{-6,7\pm1,08}$ $DKID_{50}$ ve hastalıklı buzağılarda ise 5,3 ± 0,98 günlük hayvanların dışkılarının her bir gramında $10^{-7,45\pm0,94}$ $DKID_{50}$ oranında virus tespit edilmiştir.

1.10. Klinik Belirtiler

Rotavirus enfeksiyonu, yenidoğan buzağılardaki enfeksiyöz diyare etkenlerinin en önemlilerinden biri olup, enfeksiyona ait klinik semptomlar yenidoğan hayvan türlerinin tamamında benzerlik göstermektedir (House 1978). Virus hayvanlarda semptomsuz, hafif, geçici bir diyare ile şekillenebildiği gibi, aşırı sıvı kaybı ve elektrolit dengesizliği gibi şiddetli belirtiler ile de ortaya çıkabilmektedir (Theil ve ark 1985, Collins ve ark 1989).

Beyaz ishal ya da süt ishali olarak da adlandırılan buzağı, domuz, tay ve kuzu rotavirus enfeksiyonlarında inkübasyon periyodunun 16-24 saat olduğu belirtilmiştir (Murphy ve ark 1999). Buzağılarda bu sürenin 12-96 saat arasında değişebildiği de bildirilmiştir (Chauhan ve Singh 1992, Steele ve ark 2004).

Yenidoğan enfekte hayvanlarda hafif depresyon, aşırı sulu, sarı renkli, mukuslu bir dışkı, anoreksiye bağlı olarak dehidrasyon ve kilo kaybı ile sonuçlanan bir klinik tablo görülebilir. BRV enfeksiyonunun sığırlardaki klinik seyir şekline değişen yüzdelerde (%30-40) merkezi sinir sistemi depresyonu ve sistemik su kaybı eşlik edebilir. BRV enfeksiyonunun şiddetli seyrettiği durumlarda, elektrolit dengesizliği ve su kaybının bir sonucu olarak kalp durmasına bağlı ölüm de şekillenebilir. Yüksek miktarda alınan süt ile mevcut diyarenin şiddeti artabilir. Çünkü rotavirus enfeksiyonu sonucunda villusların tahribatına bağlı olarak laktoz emiliminin azalması ve glukoza bağlı olarak aktivasyon gösteren sodyum iyonu (Na^+) transportunun durması sonucunda sindirilemeyen laktoz, bakteriyel üremeyi de arttırır (Mebus ve ark 1971a, Saif ve Theil 1990).

Bovine Rotavirus'a bağlı olarak gelişen enfeksiyonların klinik belirtilerine benzerlik gösteren pek çok enteropatojenin varlığı nedeniyle, herhangi bir sürüde meydana gelen akut enfeksiyöz diyareyi sadece BRV ile ilişkilendirmek güçtür. Rotavirus'a bağlı enfeksiyon sonucu, diğer enteropatojenler ile komplike olmadığı durumlarda bağırsaklarda büyük lezyonlar meydana gelmez ve şekillenen diyare, 3-4 gün içerisinde tedavi gerektirmeden kendiliğinden iyileşme gösterir. Diğer enteropatojenler ile ortak bir enfeksiyon durumu yoksa, hastalığın klinik belirtileri 2-4 güne kadar hafiflemekte fakat 5-7 gün boyunca dışkı ile virus saçılması devam etmektedir (Holland 1990). Bovine Rotavirus enfeksiyonu, *Escherichia coli, Salmonella, Cryptosporidium* veya *Clostridium,* kötü hijyen koşulları, soğuk hava, kalabalık ortam ve özellikle de yetersiz kolostrum alınması gibi etkenlerle komplike olduğunda bağırsaklar konjesyone hatta hemorajiktir, artan diyarenin şiddetine bağlı olarak da mortalite görülebilmektedir (Blood ve ark 1983, McNulty ve Logan 1983, Murphy ve ark 1999).

Normal olarak sağlıklı görülen buzağıların dışkı örneklerinde de rotavirus bulunabileceği gibi, klinik olarak farklı şekillerde hastalık belirtisi gösteren buzağılara ait dışkı örneklerinde de rotavirus'a rastlamak mümkündür (Dea ve ark 1985, Tzipori ve ark 1980). Rotavirus suşları arasındaki virulens farklılığı, konakçının yaşı, konakçının immun durumu, inokulum dozu, ortak bir enfeksiyonun varlığı, çevresel stres etkenleri (hava şartları, ortam, kalabalık), beslenme gibi birden fazla faktör sığırlar arasında görülen klinik çeşitliliği etkileyebilmektedir (McNulty ve Logan 1983, Radostits ve Acres 1983, Tsunemitsu ve ark 1989). Bu faktörler ile birlikte elektrolit dengesizliği, sıvı kaybı, metabolik asidoz mortaliteye etki etmektedir. Birçok rotavirus enfeksiyonunun hafif ve sınırlı seyretmesi sevindirici olmakla birlikte yenidoğan buzağılarda genellikle yüksek morbidite görülmektedir. Yenidoğanlarda rotavirus enfeksiyonlarında bildirilen morbidite oranı %100 iken, mortalite oranı %0-50 arasında değişiklik göstermektedir (Schlafer ve Scott 1979).

Bovine Rotavirus enfeksiyonuna ait nonspesifik klinik belirtilerin varlığı ve enfeksiyona ait bulguların diğer patojenlerin meydana getirdikleri ile karıştırılabilmesi olasılığı göz önünde bulundurulduğunda, etken teşhisinde destekleyici virolojik, serolojik, patolojik veya histopatolojik bulguların varlığı

şarttır. Bu nedenlerden dolayı, BRV'nin sahada ve veteriner teşhis laboratuvarlarında çabuk ve etkili test teknikleri ile tespiti önemlidir.

1.11. Teşhis

Rotavirus'ların affinite gösterdiği en önemli organlar ince bağırsaklardır. Bu nedenle etkenin direkt teşhisine olanak tanıyan dışkı, bağırsak içerikleri ve bağırsaktan alınan doku parçaları en çok kullanılan klinik örneklerdir. Etken sekonder bakteriyel enfeksiyonlar ile birlikte şekillendiğinde, enfeksiyonun tanısında güçlük çıkabilmektedir (Estes ve Cohen 1989).

Etkenin laboratuvar tanısı amacıyla, BRV enfeksiyonunun erken döneminde toplanan dışkıda direkt yöntemler ile BRV teşhisi, etkene özgü antikorların gösterilmesi ve antikor titresindeki artışın ortaya konulması (indirekt serolojik yöntemler), klinik örnekten hücre kültüründe virusun izolasyonu yöntemleri kullanılabilmektedir. Etken izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla günümüze kadar bir çok metot denenmesine rağmen hızlı teşhis metotlarının geliştirilmesi, enfeksiyon bölgesinde gerekli önlemlerin ve hijyen tedbirlerinin bir an önce alınması yönünden önemlidir (Estes ve Cohen 1989).

1.11.1. Direkt Yöntemler ile BRV Teşhisi

Buzağı ve erişkin sığırlardan alınarak soğuk zincir ortamında laboratuvara getirilen şüpheli dışkı örneklerinde direkt yöntemler ile rotaviral antijenin gösterilmesi söz konusudur. Bu amaçla EM ile virus partikülünün gösterilmesi, ELISA ile viral antijen tespiti ve moleküler yöntemler ile viral nükleik asidin saptanması gibi direkt yöntemler kullanılarak etken teşhisine gidilir (Ustaçelebi ve Us 2008).

Bu teknikler arasında yer alan EM yöntemi, pahalı ekipman gerektirmesi nedeniyle belirli referans laboratuvarlarında uygulanabilmektedir. Birçok araştırma laboratuvarında pratik kullanımı sınırlıdır ve rutin teşhiste kullanımı tercih edilmeyen bir metotdur. EM yöntemi ile özellikle hücre kültürlerinde üretilmesi zor olan rotavirus benzeri virus partiküllerinin morfolojik yapısı belirlenerek virus

identifikasyonu gerçekleştirilir. Bu yöntem ile BRV teşhisi için dışkı örneğinde çok sayıda virion partikülünün varlığı şarttır. Buna göre, 1 gr dışkıda en az 10^5 virus partikülü olması gereklidir. Bu gereklilik, immun elektron mikroskobi (IEM) yöntemi ile ortadan kaldırılmıştır. Buna göre, az miktarda virus partikülü içeren örnekler önce antiserum ile muamele edilir ve sonra negatif boyama yapılarak incelenmektedir (Ustaçelebi ve Us 2008).

Klinik örneklerde viral antijenlerin saptanması amacıyla pek çok araştırma laboratuvarında kullanılan en yaygın metot enzim bağlı immun yöntemlerden biri olan ELISA'dır (Crowther 2009). Veteriner teşhis laboratuvarlarında çeşitli hayvan türlerine ait dışkı örneklerinde BRV antijen varlığının belirlenmesi amacıyla farklı ELISA sistemleri kullanılmıştır (Yolken ve Stopa 1979, Crouch ve Acres 1984, Rodák ve ark 2005). Dışkıda BRV tespitine yönelik olarak kullanılması WHO tarafından standart bir metot olarak kabul gören ELISA, çok sayıdaki dışkı örneğinin aynı anda işlenebilmesini sağlayan pratik bir teşhis metodudur.

Morfolojik olarak aynı fakat antijenik ve genetik özellikleri bakımından farklı olan rotavirus gruplarının tespitine yönelik olarak farklı tipte ELISA teknikleri denenmiş ve başarılı sonuçlar vermiştir. Gelişmiş ve gelişmekte olan pek çok dünya ülkesinde sığır ve diğer rotavirusların teşhisinde ticari olarak sağlanan ELISA teşhis kitlerinin yanı sıra, laboratuvar ortamında hazırlanan çeşitli ELISA düzenekleri de kullanılmaktadır.

Vonderfecht ve ark (1994) katı faz enzim immun test ile rat ve domuz dışkı örneklerinde grup B rotavirusa ait antijen varlığını göstermişler ve bu test tekniği ile hayvanlarda grup B rotavirusun tespit edilebileceğini vurgulamışlardır.

James ve ark (1998) insan grup C rotavirusu ile oluşturdukları rekombinant VP6'yı insekt hücrelerinde çoğalttıktan sonra, rotavirus tespiti amacıyla geliştirdikleri ELISA sisteminde viral antijen olarak kullanmışlardır. Bu sistem, dışkı örneklerinde grup C rotavirus enfeksiyonun prevalansının belirlenmesinde kullanılmıştır. Daha sonra ELISA ile pozitif sonuç veren örneklerin doğrulaması EM, dsRNA'ya ait poliakrilamid jel elektroforezi ya da VP6 geninin RT-PCR yöntemi ile tanımlanması ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre böcek hücrelerinde üretimi gerçekleştirilen insan grup C rotavirus'a özgü VP6 proteinine ait viral antijen,

patojen free tavşanlar ve yumurta tavuklarının immunizasyonunda kullanılmıştır. Oluşturulan ELISA sistemindeki spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirgemek amacıyla iki farklı hayvandan elde edilen antikorlar kullanılmıştır ki bu antikorlardan ilki virus yakalayıcı, diğeri ise belirleyici antikor rolü üstlenmektedir. Bununla birlikte kuluçka tavuklarının immunizasyonu ile yumurta sarısında yüksek miktarlarda üretilen poliklonal antikorlar da belirleyici antikor olarak kullanılmıştır. James ve ark (1998) grup C rotavirusuna ait grup-spesifik antijenleri tanımlamak amacıyla insan grup C rotavirusunun teşhisine yönelik olarak geliştirmiş oldukları ELISA ile EM metodu sonuçlarını karşılaştırdıklarında ELISA sisteminin 10 kat daha fazla duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Kelkar ve ark (2004) çocuklarda görülen rotavirus enfeksiyonunun çabuk teşhisine yönelik olarak geliştirdikleri ELISA kitinde hücre kültürüne adaptasyonu sağlanmış semipurifiye simian rotavirus suşu olan SA11'i antijen olarak kullanmışlar ve sonuçları ticari bir ELISA teşhis kiti ile karşılaştırmışlardır. Geliştirilen ELISA ile pozitif örneklere ait daha yüksek bir optik dansite (OD) değeri bulunmuştur. Ticari kit ile test edilecek dışkı örnekleri ile bir gün boyunca süren inkübasyon periyodu, geliştirilen ELISA ile 2 saat gibi kısa bir sürede tamamlanmakta olup geliştirilen ELISA ile doku kültürü stoklarındaki rotavirus da tespit edilebilmektedir.

Viral enfeksiyonların çabuk teşhisinde kullanılan ELISA sistemlerinin optimizasyonu aşamasında bazı sorunlar ortaya çıkabilir. Örneğin, katı fazın duyarlı hale getirilmesinde kullanılan viral antijen ya da antikorun yanlış sulandırılması sonucunda yetersiz adsorbsiyon, yetersiz yıkama işlemi sonucunda oluşabilecek hatalı pozitif sonuçlar, fazla yıkama işlemi sonucunda yetersiz bağlanmalar, yetersiz inkübasyon süreleri ile immunolojik reaksiyonların tamamlanamaması, çapraz reaksiyonlar, hatalı uygulamalar görülebilir. Fakat iyi optimize edilmiş bir ELISA sisteminde belirtilen bu olumsuz durumların engellenmesi mümkündür (Crowther 2009).

Üretilmesi ve tanımlanması zor ya da zaman alıcı olan viral nükleik asitin belirlenmesi ve virus identifikasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)'dur (Ustaçelebi ve Us 2008). Çeşitli araştırmacılar (Parwani ve ark 1993, Elschner ve ark

2002, Wani ve ark 2004) tarafından buzağılara ait dışkı örneklerinde BRV etken teşhisi amacıyla uygulanan PCR yöntemi ile BRV nükleik asiti (RNA) tiplendirilmiştir. Dışkı içeriğinde bulunan mikroorganizmaların fazlalığı nedeniyle hedef nükleik asit sayısı artacağından dışkı örnekleri ile PCR çalışmadan önce dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Çevresel kontaminasyona da elverişli olmaları nedeniyle, dışkı örneklerinde viral nükleik asit tespiti amacıyla PCR ile çalışma güçlüğü bulunmaktadır (Durmaz 2001).

1.11.2. İndirekt Serolojik Yöntemler ile BRV Teşhisi

Virolojik tanı laboratuvarlarında geliştirilen hızlı ve güvenilir serolojik metotlar (ELISA, IF) ile tek bir serum örneğinde istenilen özellikteki (IgG, IgM, IgA) antikorların saptanması ve enfeksiyonun seyri hakkında bilgi almak mümkündür (Ustaçelebi ve Us 2008).

Rotavirus'a karşı oluşan nötralizan antikorların belirlenmesinde, serum nötralizasyon (SN) testi, plak-redüksiyon virus nötralizasyon (PRVN) testi ve floresan focus nötralizasyon (FFN) testi, hemaglütinasyon inhibisyon (HI) gibi diğer serolojik testler de kullanılmaktadır (Estes ve Cohen 1989).

Hafez ve ark (1980) tarafından yapılan bir çalışmada, sığırlarda ve mandalarda rotaviruslara karşı oluşan antikorları saptamak için HI, nötralizasyon ve immunodiffuzyon testi kullanılmış ve nötralizasyon testinin HI testine oranla daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Thiel (1980) domuzlar ve sığırlar üzerinde yaptığı çalışmada rotavirus'a spesifik antikor taramalarında nötralizasyon testinin, HI testine göre daha duyarlı olduğunu belirtmiştir. Araştırmacılar (1980) ayrıca, rotavirus'larla yapılan HI testinde en iyi sonuç veren eritrosit türünün domuz eritrositleri olduğunu bildirmişlerdir. Schlafer ve Scott (1979) danalarda rotaviruslara karşı nötralizasyon testi ile yaptıkları antikor taramasında 110 adet serumdan 108'inde 1/4-1/1024 arasında değişen antikor dağılımını saptadıklarını bildirmişlerdir. Hafez ve ark (1980) 313 adet sığır serumunun %51'inde HI değerlerini 1/10-1/640 arasında bulmuşlardır. Brunner (1978) Almanya Bavyera'da yaptığı çalışmada nötralizasyon testi sonucunda, kontrol ettiği 1000 adet sığır serumunun 985'inde (%98,5) nötralizan antikor varlığını bildirmiştir.

Castrucci (1988) tarafından yapılan serolojik bir saha çalışmasında mikronötralizasyon testi kullanılarak sığırlardaki rotavirus antikorlarının varlığı araştırılmış ve bu araştırmanın sonucunda %90 ve daha fazla seropozitiflik oranı tespit edilmiştir.

Ülkemizde sığır populasyonu arasında sık görülen neonatal diyare ile seyreden hastalıklar içinde rotavirusların durumunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, rotaviruslara karşı oluşan antikor durumu daha çok nötralizasyon ve HI testleri ile araştırılmıştır. Ülkemizde sığırlarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerine yapılan ilk çalışma Burgu ve Akça (1983)'ya aittir. Bu amaçla Kuzey İrlanda rotavirus suşu (75/447) kullanılarak yapılan serolojik araştırmada, 296 adet yetişkin sığırdan alınan serum örnekleri ile SN ve HI testleri karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Araştırmanın (1983) sonucunda, SN testinde pozitif olarak belirlenen örneklerin 23 adedi HI testi ile pozitif olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar (1983), SN testinin HI testine oranla daha duyarlı bir test tekniği olduğunu belirtmişlerdir.

Alkan ve ark (1999) ülkemizdeki 8 farklı işletmeden örnekledikleri serumlarda serum nötralizasyon testi ile yapılan kontrollerde işletmelere göre %14 ile %78 arasında değişen oranlarda (ortalama %43) seropozitiflik tespit etmişlerdir.

Yazıcı (1992) buzağılarda rotavirus enfeksiyonun seroepidemiyolojisi üzerine yapmış olduğu bir çalışmada, serum nötralizasyon testi ile kontrolleri yapılan sağlıklı ve diyare semptomlu buzağılardan toplanan kan örneklerinde %22,86 oranında rotavirus antikoruna sahip hayvan belirlenmiştir.

Şahna (2002) 385 adet erişkin sığır ve bu sığırların buzağılarına ait kan ve süt serumlarında rotavirus spesifik nötralizan antikorların araştırılması amacıyla uyguladığı nötralizasyon testi ile %54,1 oranında BRV spesifik antikor varlığı saptamıştır. Ayrıca yapılan SN_{50} testi ile buzağıların kan serumlarında 1:5-1:640 arasında değişen oranlarda antikor titresi belirlenmiştir.

Serum nötralizasyon testi uluslararası alanda kabul edilen bir test olmasına rağmen ELISA ile karşılaştırıldığında, bazı serumlarda bulunan nötralizasyonu inhibe eden antikor faktörlerinin varlığı nedeniyle yanlış pozitif sonuç verebilmesi

olasılığı bulunan, canlı hücre kültürü sistemleri gerektiren ve zaman alıcı bir test tekniğidir (Ustaçelebi ve Us 2008).

1.11.3. Hücre Kültürü Sistemleri ile BRV İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Rotavirusun hücre kültüründe çoğalması için sindirim enzimi katkılı vasat ihtiva eden hücre kültürü ortamında, uzun bir inkübasyon periyoduna ihtiyaç duyulur ve bu sürecin sonucunda spesifik CPE oluşumu gözlenir (Estes ve Cohen 1989). BRV'nin hücre kültürü ortamına adaptasyonu sürecinde, çeşitli sindirim enzimlerinin kültür vasatına ilavesi ile virusa özgü karakteristik CPE oluşumu ile BRV varlığı ortaya konulabilmektedir. BRV izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla farklı orijine sahip duyarlı hücre kültürleri kullanılmıştır. BRV, tripsin ve pankreatin katkılı Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) ya da MEM ortamında çoğaltılan primer Afrika yeşil maymun hücre kültürleri, MDBK (Saravanan ve ark 2007), primer embriyonik sığır böbrek hücreleri (EBK), maymun böbrek hücre kültürü (LLC-MK_2) (Clark ve ark 1979), insan servikal karsinom hücreleri (HeLa) (Clark ve ark 1979) ve MA104 hücre kültürlerinde (Murakami ve ark 1981, Kohno ve ark 2000, Villegas ve ark 2002, Gülyaz ve ark 2005) gerçekleştirilen seri pasajlarla çoğaltılabilir.

Proteolitik enzim (tripsin, pankreatin) katkılı hücre kültürlerinde virus enfektivitesinin arttırıldığına dair ilk çalışma, Spendlove ve Schaffer (1965) tarafından reoviruslar üzerinde yapılmıştır. Spendlove ve ark (1970) çeşitli proteolitik enzimler ile tekrarladıkları hücre kültür çalışmalarında enzimlerin virus kapsidinde oluşturdukları değişiklik ile enfektiviteyi uyardığını bildirmişlerdir. Daha sonra rotavirus üretimi amacıyla yapılan pek çok çalışmada (Babiuk ve ark 1977, Theil ve ark 1977, Almeida ve ark 1978, Clark ve ark 1979), proteolitik enzimler ile enfektivitenin arttırıldığı bildirilmiştir. Hücre kültürüne yapılan bu proteolitik enzim uygulaması ile rotavirus'a özgü dış kapsid proteini olan VP4; VP5 ve VP8 alt ünitelerine ayrılır ve böylece virus enfektivitesinin aktivasyonu sağlanmış olur (Clark ve ark 1981, Espejo ve Arias 1981, Estes ve ark 1981).

Murakami ve ark (1981), Japonya'da 22 adet sürüden topladıkları 51 adet ishalli buzağı dışkısını tripsin ön muamelesi ile MA104 hücre kültürlerine inokule

ederek rotavirus izolasyonuna gitmişler ve 14 adet örneği rotavirus yönünden pozitif olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar (1981), elde ettikleri sonuçları IFAT ve EM teknikleri ile elde ettikleri sonuçlar ile karşılaştırmışlardır ve IFAT ile 14 adet örneğin tamamını, EM ile 10 adet dışkı örneğini pozitif olarak tespit etmişlerdir.

BRV'nin çeşitli hücre kültürlerine adaptasyonunun arttırılması amacıyla kullanılan sindirim enzimlerinin virus CPE'sine etkisi pek çok araştırmacı (Clark ve ark 1979, Twist ve ark 1984, Greenberg ve ark 1986, Tsunemitsu ve ark 1991, Sato ve ark 1995, Arias ve ark 1996, Gülyaz ve ark 2005, Saravanan ve ark 2007) tarafından ortaya konmuştur. Saravanan ve ark (2007), yenidoğan buzağı dışkı örneklerinden elde ettikleri supernatantları MDBK hücre kültüründe tripsinli ve tripsinsiz vasat ortamına ilave ederek gerçekleştirdikleri araştırmanın sonucunda, tripsin ilavesi yapılan hücre kültürlerinde 5. günden sonra spesifik CPE bulgusuna rastlamışlar ve tripsin uygulamasının MDBK hücre kültüründe sığır rotavirus izolasyonunda önemli bir basamak olduğunu vurgulamışlardır.

Mohammed ve Saunders (1977) yenidoğan diyare semptomlu buzağılara ait rotavirus'u, fötal intestinal hücrelerinden hazırlanan hücre kültürlerinde çoğaltmışlardır. Bu amaçla fötal hücreler ile hazırlanan monolayer hücre kültürünü 21. pasaja kadar üretip aşı virusundan hazırladıkları inokulum ile virus ekimini gerçekleştirmişler ve rotavirus'a ait ilk CPE'yi inokulasyondan sonra 24-48 saat içinde tespit etmişlerdir.

Clark ve ark (1979) çeşitli hücre kültürlerine (MDBK, LLC-MK2, MA104, HeLa hücreleri) yapılan tripsin ilavesi ile yüksek titrede rotavirus üretimini gerçekleştirmişlerdir. Tripsinli ve tripsinsiz hücre kültür ortamında rotavirus üretiminin karşılaştırılarak incelendiği bu araştırmanın sonucuna göre, tripsin katkılı hücre kültürü ortamlarında BRV enfektivitesinin arttığı bildirilmiştir.

Twist ve ark (1984) sığır ve insan rotaviruslarını tripsin katkılı vasat ve tavuk serumu ile ayrıca tripsin katkılı vasat ve fötal dana serumu ihtiva eden BSC-1 ve CV-1 hücre kültürleri kullanarak plak reduksiyon testi ile değerlendirmişlerdir. Her iki virus'a ait plak test sonucunda, tavuk serumu katkılı vasat ile tripsinsiz vasat ortamındaki hücre kültüründen daha yüksek oranda bir plak titresi tespit edilmiştir. Tavuk serumunun insan ve sığır rotavirus replikasyonunu inhibe etmediğini tespit

eden araştırmacılar (1984), tripsin inhibitörü içermeyen tavuk serumunun, tripsin inhibitörü içeren fötal serum katkılı ortam ile karşılaştırıldığında tavuk serumu varlığının plak oluşumunu arttırdığını vurgulamışlardır.

Greenberg ve ark (1986) genotipik olarak benzerlik gösteren, serotipik olarak ayrı olan üç adet sıçan (murine) rotavirus suşunu MA104 hücre kültüründe tripsin ilavesiyle adapte ederek çoğaltmışlardır. Saif ve ark (1988), grup C rotavirusların MA104 hücrelerine adaptasyonunu sağlayan ilk araştırmacılardır. Tsunemitsu ve ark (1991), daha önce domuz ve insanlardan izole edilen grup C rotaviruslarını ilk kez sığır dışkısından izole etmeyi başararak, MA104 hücre kültürü içeren roller tüplerinde, yüksek konsantrasyonda tripsin varlığında çoğaltmışlar ve virus identifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Sato ve ark (1995) grup A insan, sığır, at ve domuz rotavirusunun çoğaltılmasında enzimlerin rolü üzerine yaptıkları bir araştırmada, çeşitli enzimlerin (pankreatin, tripsin, proteaz, alkalin fosfataz, pepsin, α-amilaz, lipaz, adenosin deaminaz, laktaz, lizozim, ribonükleaz, trioz fosfat izomeraz) MA104 hücre kültür ortamındaki etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar (Sato ve ark 1995) α-amilaz, lipaz enzimlerinin at ve domuz viruslarının üremesini baskıladığını; adenozin deaminaz, laktaz, lizozim, ribonükleaz, trioz fosfat izomerazın ise belirtilen türlere ait rotavirusun üremesi üzerinde az ya da hiç katkısı olmadığını, pankreatin ve tripsin enzimi varlığında ise daha fazla rotavirus üremesi gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.

Arias ve ark (1996) farklı tripsin konsantrasyonlarında hücre kültürlerinde rotavirus'a ait VP4'ün VP5 ve VP8'e parçalanması sonucunda PAGE tekniği ile iki farklı bant halinde belirlenebildiğini ve virus enfektivitesinin aktivasyonunu sağlayan protein yapısındaki bu değişikliğin Rossmann (1989)'ın belirtmiş olduğu kanyon hipotezinde vurgulanan immun sistemden kaçış stratejisi ile açıklanabileceğini vurgulamışlardır. Pek çok virus tarafından uygulanan bu kaçış statejisine göre, virusun üç boyutlu yapısında "kanyon" diye tabir edilen, antikor üzerinde bulunan antijen bağlanma bölgelerine yerleşip konakçı virus etkileşiminin gerçekleşeceği çukurcuklarda, konformasyonel yapı değişikliği ile antikorlar viral antijeni tanıma yeteneğinden yoksun bırakılır.

MA104 hücre kültürüne tripsin varlığında yapılan inokulasyonun ardından BRV'ye özgü CPE'nin gözlenebilmesi 3-8 gün gerektirir. Üçüncü günün sonunda hücre kültürlerinde meydana gelen CPE kontrol edilerek değerlendirilir ve nötralizasyon testi ya da floresan antikor (FA) metodu ile enfekte olan hücre kültürlerinin BRV yönünden kontrolü gerçekleştirilir (Al-Yousif ve ark 2000). Enfeksiyon ilerledikçe, bağırsak mukozasındaki epitel hücre tahribatı artacağından; genellikle diyare başlangıcından 72 saat sonra alınan dokularda FA testi ile BRV tespit edilemeyecektir. Bu dezavantajdan dolayı, FA test tekniğinin spesifite ve sensitivite oranları, hastalık süresince örnek toplama önceliğine bağlıdır ve virus dışkı ile saçılmaya devam ettiği sürece, teşhiste ELISA gibi doğrulayıcı nitelikte olan diğer test tekniklerinin de uygulanması önerilmektedir (Al-Yousif ve ark 2000).

Ülkemizde buzağı ve erişkin sığırlarda BRV enfeksiyonunun teşhisi genellikle virusun ya da virus antijenlerinin dışkıdaki varlığının ELISA ile saptanması esasına dayanmaktadır (Alkan ve ark 1992, Yazıcı 1992, Burgu ve ark 1995, Çabalar ve ark 2001, Ekik 2002, Özkul ve ark 2002, Şahna 2002, Şahna ve Alkan 2003, Gülyaz ve ark 2005, Yavru ve ark 2008). Bu virusların hücre kültüründe kolaylıkla üretilememesi nedeniyle hücre kültürü izolasyonu, rutin teşhiste nadiren kullanılan bir yöntemdir (Alkan ve ark 1999). Gülyaz ve ark (2005), diyare semptomlu buzağı dışkısından elde ettikleri grup A BRV izolatını, pankreatin enzimi katkılı MA104 hücre kültüründe çoğaltan ilk araştırmacılardır.

Sonuç olarak günümüzde yerli ve yabancı pek çok araştırmacı, BRV enfeksiyonunun direkt, indirekt teşhisinde ve hücre kültürü ile izolasyonu ve çoğaltılması aşamalarında ortaya çıkan sensitivite ve spesifite oranlarınının karşılaştırılması amacıyla çeşitli ELISA sistemlerinden yararlanmışlardır. Bu sonuçlara göre, doğrulayıcı bir test tekniği olan ELISA, ülkemizdeki BRV enfeksiyonun teşhisi amacıyla pek çok araştırmacı (Alkan ve ark 1992, Yazıcı 1992, Burgu ve ark 1995, Çabalar ve ark 2001, Ekik 2002, Özkul ve ark 2002, Şahna 2002, Şahna ve Alkan 2003, Gülyaz ve ark 2005, Tan ve ark 2007, Yavru ve ark 2008) tarafından tercih edilmiştir.

1.12. İmmunite

Bovine Rotavirus enfeksiyonu, viremi dönemi oluşturmadan lokal olarak seyreden bir enfeksiyondur. Enfeksiyonun seyrinde immünolojik olarak iki farklı görüş söz konusudur. Buna göre bağırsak lümeninde, özellikle bağırsak mukozasında bağışıklık mevcut ise immun mekanizma etkili olabilir ya da teşhiste ve hastalığın prognozunda serumdaki antikorlar sekonder olarak role sahiptir (Burgu 1988).

Viral enfeksiyöz etkenlerden en çok etkilenen gastrointestinal yüzey, sindirim faaliyeti sırasında gerçekleşen adsorbsiyon olayı için büyük öneme sahip olan ince bağırsaklardır. İnce bağırsaklarda oluşan immunizasyonda, Peyer plaklarında bulunan lenfositler önemli bir role sahiptir. Bu lenfositlerin %80'ini B lenfositler, kalanını ise T lenfositler oluşturur. Rotavirus enfeksiyonlarından korunmada, bağırsak lamina propria katında bulunan ve immunglobulinlerin (Ig) üretiminden sorumlu olan B lenfositler, fazla miktarda IgA ve daha az miktarda IgM üreten immun sistem hücreleridir (Bachmann ve Hess 1983).

Bovine Rotavirus enfeksiyonu, aktif bağışıklık gelişmeden önce yenidoğan buzağı yaşamının genellikle ilk birkaç haftasını etkiler. Yenidoğan hayvanların sütten kesilme zamanı ve kolostrum alıp almadıkları, enfeksiyonun seyrini etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır. Bu amaçla, kolostrum vasıtasıyla yenidoğan buzağıya aktarılan pasif maternal antikorlar, hastalığın kontrolü açısından önemlidir (Burgu 1988).

Postnatal dönemde sütteki antikor titresi 3-7 gün içinde hızla azalmakta, buna bağlı olarak buzağılarda enfeksiyon riski hızla artmaktadır (Snodgrass ve ark 1980). Mebus ve ark (1973)'na göre, gebe ineklerin aşılanması ile sütteki antikor sekresyonunun miktarını ve süresini uzatarak enfeksiyonun insidensini azaltmak mümkündür. Buzağılar, postnatal dönemin 8. haftasına kadar hastalığa yüksek duyarlılık göstermektedir (Saif ve ark 1994, Kohara ve Tsunemitsu 2000). Buna göre, aktif immunitenin gelişmesiyle enfeksiyona karşı duyarlılık azalmaktadır.

Yetişkin sığırlar ve danalar sağlıklı görülmelerine rağmen virus saçabilirler. Kan dolaşımında BRV antikoru bulunması reenfeksiyona karşı korunma sağlamamaktadır (Snodgrass ve Wells 1978, Woode ve ark 1975). Doğumdan hemen

sonra enfekte olan buzağıların virulent olan saha suşlarına karşı aktif immunizasyonu neredeyse hemen hemen imkansızdır. Yenidoğanlarda kolostrum ya da süt ile bağırsak lümenine alınan maternal antikorlar, BRV enfeksiyonu için pasif bir korunma sağlar (Bridger ve Woode 1975, Snodgrass ve Wells 1978, Besser ve ark 1988). Bu nedenle buzağılardaki kolostral antikor seviyelerinin yükseltilmesi amacıyla gebelerin aşılanması yoluyla buzağılara yapılan pasif transfer ile koruyuculuk yükseltilir. Bağırsaktaki kolostral antikorların da saha virusunu nötralize edebileceği ve hastalığı önleyebileceği varsayılmaktadır (Lee ve ark 2000).

Yenidoğan buzağıların aktif immunizasyonu, BRV enfeksiyonu için muhtemel bir yaklaşım olarak değerlendirilmiş olup, doku kültüründe hazırlanan attenüe rotavirus aşılarının sahadaki sonuçlarının tartışmalı olduğu belirtilmiştir (Thurber ve ark 1977). Bu nedenle alternatif bir yaklaşım olarak aşılama ile annelerde antikor oluşumunun sağlanması ve doğal enfeksiyonlarda olduğu gibi pasif immunite ile yenidoğanların enfeksiyona karşı korunması düşünülmüştür ve bu amaçla hazırlanan ticari aşılar sahaya sunulmuştur.

Bovine Rotavirus'a ait VP4 ve VP7 proteinlerine karşı deneysel olarak oluşturulan serum nötralizan antikorların ve mukozal antikorların enfeksiyona karşı korumada etkili olduğu Holland (1990) tarafından bildirilmiştir.

Saif ve ark (1983) 3 farklı deneysel gruba ayrılan 15 adet gebe ineğe ait kolostrum örneklerini toplayarak, aşılı ve aşısız ineklere ait kolostrum alan buzağılardaki pasif bağışıklık düzeyini araştırmışlardır. Bu araştırmaya (1983) göre, birinci grup ineklere kas içi ve meme içi yol ile adjuvantlı Ohio Tarım Araştırmaları ve Geliştirme Merkezi modifiye canlı rotavirus aşısı, ikinci grup ineklere kas içi ticari modifiye canlı rota-coronavirus aşısı uygulanmış ve üçüncü grup ineklere inokulasyon yapılmayarak kontrol grubu olarak bırakılmışlardır. Bu deneysel gruplardan ayrı ayrı toplanan kolostrumlar, daha önce kolostrum almamış ve serum antikoru yönünden negatif olan 28 adet yenidoğan erkek Holstein buzağının beslenmesinde kullanılmıştır. Bunlardan 8 tanesine kolostrum verilmemiştir. Daha sonra oral yolla virulent BRV verilerek diyare oluşturulmuştur ve dışkı örnekleri rotavirus saçılımı yönünden ELISA ile değerlendirilmiştir. Bu araştırmanın (1983) sonucuna göre, kolostrum verilmeyen 8 adet buzağıda diyare ve beraberinde dışkı ile rotavirus saçılımı tespit edilmiş ve bu grupta uzun süreli olarak kalıcı hastalık

durumu görülmüştür. Birinci grup ineklerden elde edilen kolostrum (günlük besinleri ile birlikte %1 oranında) ile beslenen 8 adet buzağının hem rotavirusa bağlı olarak şekillenen diyareden hem de virus saçılımından korunduğu tespit edilmiştir.

Buzağılardaki BRV enfeksiyonu ile ilgili çeşitli araştırmalarda (Woode ve ark 1975, Woode 1978, Woode ve Crouch 1978), rotavirus enfeksiyonuna karşı meydana gelen serum antikor düzeylerindeki artışın, hayvanlarda gelişen direncin bir göstergesi olmadığı belirtilmiştir. Bu araştırmalara ait sonuçlara göre, yalnızca çok yüksek antikor titresine ulaşıldığı zaman serumdaki antikorların bağırsak lümenine geçtiği bildirilmiştir.

Kohara ve Tsunemitsu (2000) maternal serum antikorlarının doğal BRV enfeksiyonu sonucunda şekillenen diyareye karşı koruyuculuk düzeyinin araştırılması amacıyla, Japonya'nın Hokkaido bölgesinde bulunan bir sığır çiftliğindeki 2 günlük buzağılar ile gerçekleştirdikleri araştırmada, 168 adet yenidoğan buzağıyı annelerinden ayırarak doğal yolla beslemişlerdir. Bu araştırmanın (2000) sonucunda, 135 adet buzağıda (%80,4) doğumdan itibaren 14 gün sonra doğal BRV enfeksiyonu sonucunda diyare görülmüştür ve 33 adet buzağıda doğumdan sonraki 1 ay boyunca diyare görülmediği bildirilmiştir. Kohara ve Tsunemitsu (2000)'ya göre, sığır serumundaki virus nötralizan antikor titresi, BRV'ye karşı korumada belirleyici bir rol oynamaktadır. Buna göre, 14 günlük BRV enfeksiyonuna bağlı diyare semptomu gösteren buzağılara ait serum nötralizan antikor titreleri, diyare olmayan buzağıların titrelerine göre önemli ölçüde düşük seviyede belirlenmiştir (Kohara ve Tsunemitsu 2000).

Alkan ve ark (2004) yenidoğan buzağıların BRV ve BCV enfeksiyonlarından korunmada aşı etkinliğinin araştırılması amacıyla yapmış oldukları bir araştırmada, ticari bir aşı ile aşılanan sığırlarda BRV ve BCV spesifik bağışıklığın düzeyi ile yenidoğanların enfeksiyonunda pasif bağışıklığın rolünü incelemişlerdir. Araştırmacılar (2004), aşılı ve aşı uygulanmamış gruplarda bulunan annelerden doğan buzağıların enfeksiyona maruz kalma oranları ve klinik enfeksiyon oranlarını karşılaştırmalı olarak ele almışlardır. Bu amaçla erişkin sığırlar ve buzağılardan sağlanan dışkı ve serum örneklerinde enfeksiyon etkeni ve antikor varlığı araştırılmıştır. Araştırmacılar (2004), enfeksiyona maruz kalma oranını, aşı

uygulanan annelerden doğan buzağılarda %30 olarak belirlerken, aşı uygulanmayan annelerden doğan buzağılarda %54,5 olarak saptamışlardır.

Snodgrass ve ark (1980) kolostrumdaki BRV antikor titresinin 3-7 gün içerisinde hızla azaldığını ve buna bağlı olarak da buzağılarda enfeksiyon riskinin hızla arttığını bildirmişlerdir. Bunun yanında kanda BRV antikoru bulunmasının reenfeksiyonlara karşı koruma sağlayamadığı ve genç hayvanların enfeksiyona daha duyarlı oldukları daha önce yapılan çalışmalarda (Snodgrass ve ark 1978, Woode ve ark 1975) belirtilmiş olup, 8 haftalığa kadar olan buzağıların klinik tablo ile seyreden enfeksiyona karşı ne kadar açık oldukları daha sonra yapılan çalışmalar (Saif ve ark 1994, Kohara ve Tsunemitsu 2000) ile desteklenmiştir.

Şahna (2002) 385 adet erişkin sığıra ve buzağılarına ait kan ve süt serumlarında rotavirus spesifik nötralizan antikorların araştırılması amacıyla yapmış olduğu serolojik bir çalışmada, kolostrum ve sütteki antikor titrelerinin doğum sonrası 3. gün ve sonrasında önemli düzeyde azalması ile buzağılardaki BRV enfeksiyon tespiti zamanı arasında bir korrelasyon olduğunu vurgulamıştır. Tan ve ark (2007)'na göre, ülkemizde erişkin sığırlarda tespit edilen yüksek rotavirus antikor seropozitifliğine rağmen, yenidoğan hayvanlardaki düşük seropozitiflik oranı ve düşük antikor titreleri, kolostrum yoluyla anneden yavruya nakledilen antikorların çok yetersiz olduğunun ve uzun süre koruma sağlayamadığının bir göstergesidir.

Yavru ve ark (2008) 1-6 aylık diyare semptomlu buzağılar ve annelerine ait serum ve dışkı örneklerini ticari olarak sağlanan indirekt ve direkt ELISA ile test etmişler, bu buzağılara ait 190 adet ve 2 yaşın üzerindeki annelerine ait 184 adet kan serumu örneği üzerinde çalışan araştırmacılar (2008), rotavirus varlığı bakımından 164 adet sığır ve bunlara ait 144 adet buzağıda seropozitiflik tespit etmişlerdir. Buna göre, 6 yaş ve üstü annelerde rotavirus antikor düzeyi en yüksek seviyede (%32,33) iken, 2-3 yaş arasındaki annelerde en düşük seviyede (%10,18) tespit edilmiştir. 5-6 aylık erkek buzağılarda antikor düzeyi en yüksek seviyede, 3-4 aylık dişi buzağılardaki antikor seviyesi ise en düşük seviyede tespit edilmiştir.

1.13. Koruma ve Kontrol

Rotavirus enfeksiyonu sırasında şekillenen diyare tablosu sonucunda dışkı ile çok fazla miktardaki virus etrafa saçılabilmektedir. Ayrıca etkenin dış ortam şartlarına karşı dirençli olması da hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır. Enfeksiyonun kontrol edilmesinde, hayvanların bulunduğu çevre şartlarına ve hijyen koşullarının uygun olmasına önem verilmesi gerekmektedir (Estes ve Cohen 1989).

Ülkemizde BRV enfeksiyon varlığı ile ilgili araştırmalarda (Yazıcı 1992, Alkan ve ark 1999, Burgu ve ark 1995, Burgu ve ark 1999, Çabalar ve ark 2001, Tan ve ark 2007) BRV varlığı tespit edilen sığırcılık işletmelerinde yapılan gözlemler ile bakım şartlarının enfeksiyondan korunmadaki önemi vurgulanmıştır. Tan ve ark (2007)'nın yaptıkları araştırmada sığır rotavirus bulgusu rastlanılan işletmelerin kapalı işletmeler olduğu, hayvanların birbirine çok yakın olarak bakılıp beslendiği gözlemlenmiş ve bu işletmelerde BRV enfeksiyonuna karşı korunma tedbirleri uygulanmadığı görülmüştür. Sonuç olarak, özellikle enfeksiyona açık seronegatif hayvanlar ile daha duyarlı olan genç hayvanlara karşı hijyen ve aşılama gibi koruma ve kontrol önlemlerinin uygulanması işletmelerde hastalığa bağlı ekonomik kayıpların önüne geçilebilmesi açısından önem kazanmaktadır. Özellikle aşılama ile sürü içerisindeki subklinik enfekte hayvanlardan klinik enfeksiyona duyarlı hayvanlara bulaşma önlenebilir. Böylece sütteki antikor sekresyonunun miktar ve süresi uzatılabilir (Mebus ve ark 1973).

Bovine Rotavirus'a karşı spesifik antikor taşıyan sığırlar, kolostrum ve sütleri ile aktardıkları antikorlar aracılığıyla yenidoğan buzağıların enfeksiyondan korunmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Alkan ve ark 2004). Doğal enfekte annelerden doğan buzağılara aktarılan antikor titresi, annenin enfeksiyon geçirme zamanı ve antijenik uyarımın seviyesi gibi faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca doğal enfekte erişkin sığırlarda genellikle serum antikor düzeyinin çok yüksek olmadığı ve dolayısıyla süt ve kolostrum vasıtası ile yenidoğan hayvanların enfeksiyondan korunmalarında çoğunlukla yetersiz kaldığı belirtilmiştir (Wieda ve ark 1987, Kohara ve Tsunemitsu 2000, Şahna 2002). Bu nedenle yenidoğan buzağıların BRV enfeksiyonundan korunmasında; erişkin sığırların gebeliğin geç dönemlerinde aşılanması yoluyla annelerde yüksek antikor titresinin elde edilmesi,

yenidoğanlarda maternal antikorlar yoluyla enfeksiyona karşı etkin korunmanın sağlanması ve yenidoğanların ticari aşılar ile aşılanmasının önemli olduğu bildirilmiştir (Snodgrass ve ark 1980, Snodgrass 1982, Kohara ve ark 1997, Fernandez ve ark 1998, Kim ve ark 2002).

Yenidoğan buzağıların modifiye canlı rotavirus içeren oral aşılar ile aktif immunizasyonlarının gerçekleştirilebileceği de ileri sürülmektedir. Ancak, buzağıların oral aşılanması ile oluşan etkinin, kolostrumda bulunan spesifik antikorlar tarafından engellendiği bilinmektedir. Kolostrum bariyeri olarak da adlandırılan bu etki, oral aşıların saha koşullarında neden yetersiz kaldığını da açıklamaktadır. Enterik bir viral enfeksiyona karşı bağırsak içi antikor yanıtı olarak IgM ve IgA antikorlarının üretimi gerçekleştirilir. Fakat kolostrum yolu ile virusa karşı spesifik antikorların alınması ile bağırsak içi bu antikor yanıtında azalma olduğu görülmektedir. Bu nedenlerden dolayı enfeksiyonun endemik olarak görüldüğü sürülerde kolostrum yolu ile yüksek miktarda virus'a spesifik antikor alabilen buzağıların oral yol ile aşılanmasının gereksiz olduğu bildirilmiştir (Radostits ve ark 2007).

Freitag ve ark (1984) Mebus ve arkadaşlarının 1976 yılında attenüe rotavirus-coronavirus aşılarını 6-7 saatlik buzağılara uygulayarak gerçekleştirdikleri deneysel çalışmalar sonucunda, hayvanlarda hastalığın semptomlarının oluşmadığının ortaya konulduğunu bildirmişlerdir.

Ticari olarak sağlanan modifiye canlı ya da inaktif BRV ve BCV aşılarının, gebe inekler üzerinde etkili olduğu ve spesifik kolostral antikor seviyesi arttırılarak buzağıların pasif immunizasyonu sonucunda enfeksiyona karşı korumada önemli rol oynadığı bilinmektedir. Gebe hayvanların aşılanması rotavirus yönünden sağlıklı buzağılar elde edilmesinde gerekli olan profilaktik bir önlemdir (Freitag ve ark 1984). Doğumdan sonra yüksek seviyede olan kolostral antikor seviyesinde 24-48 saat sonra bir düşüş gözlendiği bildirilmiştir (Radostits ve ark 2007).

Buzağıların enfeksiyona karşı korunmalarını sağlamak amacıyla en çok duyarlılık gösterdikleri bilinen durum, doğumdan sonraki 10 gün ile 3 haftalık süre boyunca aşılama ile antikor seviyesi yükseltilmiş olan annelere ait kolostrumu

almaları önerilmektedir. Doğumdan 3 gün sonra sütteki rotavirus antikorlarının seviyesinde bir düşüş görüldüğü bilinmektedir (Radostits ve ark 2007).

Türkiye'de ve farklı ülkelerde yapılan seroepidemiyolojik çalışmalar (Garcia-Sanchez ve ark 1993, Burgu ve ark 1995, Kohara ve ark 1997), erişkin sığırlarda BRV ile subklinik enfeksiyon oranının oldukça yüksek olduğunu ve dolayısıyla erişkin sığırların değişik düzeylerde bağışık bulunduğunu ortaya koymuştur.

Freitag ve ark (1984) Hudson ve arkadaşlarının 1981 yılında rotavirus-coronavirus aşıları ile 6000 adet inek üzerinde yapmış oldukları deneysel bir çalışmada, aşılanmamış ineklerin buzağılarında %1 düzeyinde mortalite, %11 düzeyinde morbidite bulduklarını, aşılanmış gebe ineklerin buzağılarında ise %0,04 düzeyinde mortalite ve %3 düzeyinde morbidite oranının bulunduğunu bildirmişlerdir. Freitag ve ark (1984) rotavirus-coronavirus-*Escherichia coli* K99 kombine attenüe aşılarını gebe hayvanlara uygulamışlar ve aşılanmamış hayvanların buzağılarında aşılanmadan önce %50'nin üzerinde olan mortalite oranını aşılamadan sonra %5-6'ya kadar düşürmeyi başarmışlardır. Araştırmacılar (1984), bu aşının buzağılara uygulanması sonucunda da başarılı sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar (Bridger ve Woode 1975, Snodgrass ve ark 1980) tarafından hazırlanan farklı immunizasyon teknikleri ile BRV enfeksiyonuna karşı koruma sağlanabilmiştir. Snodgrass ve ark (1980) aşı hazırlanması amacıyla doku kültürüne adaptasyonu sağlanmış olan buzağı rotavirusunu Bridger ve Woode (1975) tarafından bildirilen yönteme uygun olarak kullanmışlardır. Araştırmacılar (Snodgrass ve ark 1980), ayrıca Theil ve ark (1978)'nın bildirdiği metodu uygulayarak virus'u tripsin ile muamele etmişler ve sığır embriyo böbrek hücrelerine idame vasatına tripsin ilavesi ile virus ekimini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar (1980), ilk ve ikinci aşılamalarda, rotavirus'a ait altıncı ve dokuzuncu hücre kültürü pasajlarını, sırasıyla $10^{-4,8}$ $DKID_{50}$/ml ve $10^{-7,8}$ $DKID_{50}$/ml titrelerinde kullanmışlardır. Buna göre virus bir gece boyunca 40^0C'de %0.5 formaldehit ile inaktive edilmiştir. Eşit hacimde buzağı rotavirus'u ve tamamlanmamış Freund adjuvantı ile hazırlanan emülsiyon, boyun bölgesine kas içi enjeksiyon yolu ile enjekte edilmiş ve ayrıca böbrek hücre kültürüne hazırlanan placebo aşı kontrol grubuna uygulanmıştır. Sonuç olarak bu yöntem ile hazırlanan aşının yenidoğanların

enfeksiyondan korunmasında, morbidite ve mortalite oranlarının azaltılmasında etkili sonuçlar verdiği araştırmacılar tarafından (1980) bildirilmiştir.

Besser ve ark (1988) MA104 hücre kültürüne tripsin ilavesi ile adaptasyonu sağlanan sığır rotavirusunu (Lincoln NCDV suşu) 5-10 günlük 24 adet buzağıya enjekte ederek, immunizasyon öncesi ve sonrası serum ve ince bağırsağa ait nötralizan rotavirus antikor değerlerinin karşılaştırılması sonucunda, pasif immunizasyonun buzağıları rotavirus enfeksiyonuna karşı koruyabildiği belirtilmişlerdir.

Kohara ve ark (1997) buzağılamadan 6-11 hafta önce grup A BRV'ye karşı aşılanan annelerden doğan buzağılarda, doğumdan 3-4 hafta sonraki serum antikor düzeyinin kontrol grubuna ait ineklerden doğan buzağılara göre daha yüksek seviyede olduğunu bildirmişlerdir. Aşılanan annelerde artan kolostrum ve serum antikor düzeylerinin, buzağıların BRV enfeksiyonuna karşı pasif immunizasyonunda etkili olduğu görülmüştür. Aşılı annelerden doğan buzağılardaki serum antikor titresi, G6 serotipine ait BRV enfeksiyonundan korumada doğumdan sonraki 3 hafta süresince etkili olmakla birlikte, bazı buzağılarda BRV ile ilişkili diyare varlığı görülmüştür. Kohara ve ark (1997) BRV enfeksiyonundan korunmada kolostrum ve süt yolu ile alınan antikorların serum antikorlarından daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

İnsan ve hayvan grup A rotavirus suşları arasındaki antijenik ilişki, rotaviruslara ait zoonotik bir potansiyelin varlığını düşündürmektedir. Rotaviruslar arasındaki serotip farklılıkları üzerindeki saha çalışmalarının daha etkili bir aşılama programının oluşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Martella ve ark 2009).

Çeşitli araştırmacıların (Lopez ve ark 1988, Blowey 1993, Garcia-Sanchez ve ark 1993, Sivula ve ark 1996, Donoven ve ark 1998, Garcia ve ark 2000, French ve ark 2001) çalışmalarında hayvancılık işletmelerinde BRV enfeksiyonuna karşı uygulanabilecek çeşitli koruma yöntemleri ve alınması gerekli olan bazı tedbirler belirtilmiştir. Buna göre, hayvanların türü, ırkı, sayısı, beslenme amacı, verim özellikleri ve değerleri, yaşa göre hayvanların gruplandırılması, sürüye dışarıdan yeni katılan hayvan sayısı ve tarihi, son yıllarda hayvanların geçirdiği hastalıklar ve

tedaviler, parazit mücadelesi ve aşılamalar kayıt edilebilir. Hayvanların barınması ile ilgili olarak, ahır sayısı, ahır türü, büyüklüğü, kullanılan yataklık türü, temizleme sıklığı, dezenfeksiyon sıklığı, havalandırma imkanları ve ahırda barındırılan diğer hayvanlar göz önünde bulundurulmalıdır. Hayvanların beslenmesi ile ilgili olarak; verilen yemin tipi, yemlerin temin edildiği kaynaklar, yemlerin depolanma şartları ve içme suyu kaynakları kontrol edilmelidir (Lopez ve ark 1988, Donoven ve ark 1998, Garcia ve ark 2000).

Bovine Rotavirus enfeksiyonunun özellikle başlangıç dönemlerinde, dışkı örneklerindeki antijen miktarının yetersizliğinden dolayı ELISA haricindeki diğer teşhis metotlarında duyarlılığın düşük olması nedeniyle viral antijen tespiti sınırlı kalabilmektedir. Etkenin hücre kültürüne adaptasyon güçlüğü bilinmekte olup, hücre kültüründe virus izolasyonu rotavirusun çabuk teşhisinde tercih edilmemektedir. BRV teşhisine yönelik olarak uygulanan metotların çok azı sensitivite (duyarlılık) ve spesifisite (özgüllük) oranları bakımından tanıda değer taşımaktadır. Pek çok viral antijenin tespit edilmesine olanak sağlayan ELISA, BRV enfeksiyonunun çabuk teşhisi amacıyla kullanılan bir test tekniğidir ve WHO tarafından standart bir metot olarak kabul görmektedir.

Virolojik tanı amaçlı kullanılan virus izolasyonu ve serolojik testlerden sonuç alındığında, viral enfeksiyonu çoğunlukla klinik seyrini tamamlamış ya da iyileşme evresine girmiştir (Durmaz 2001). Bu nedenle lokal bir enfeksiyon sonucunda akut seyirli bir hastalık tablosu ile sığırlarda şekillenen diyareye bağlı olarak dışkı ile yüksek miktarlarda etrafa saçılan, bulaşma kabiliyeti yüksek BRV etkeninin ELISA gibi hızlı ve duyarlı bir teşhis metodu ile en kısa sürede tanımlanması önemlidir.

Ülkemizde veteriner sahada kullanılan ve yüksek miktardaki ödeneklerle yurtdışından ithal edilmekte olan BRV enfeksiyonuna bağlı çeşitli tanı kitlerinin temininde dışa bağımlılığın azaltılması oldukça önemli bir unsurdur. Bu nedenle BRV etkeninin tanısında ekonomik, hızlı ve etkili tanı yöntemlerinin kullanılması gereklidir. Buzağılarda rotavirus enfeksiyonu süresi boyunca antibiyotik ve sıvı tedavisi ile desteklenen uzun tedavi süresi kısaltılarak, mortalite ve morbidite oranları azaltıldığında ülkemiz ekonomisine oldukça önemli bir katkı sağlanabilir.

Bu çalışmada BRV teşhis kitine alternatif olarak geliştirilen BRV ELISA teşhis metotlarının, ülkemizdeki BRV etkeninin teşhisi amacıyla uygulanmakta olan ithal ELISA sistemleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlandı. Veteriner sahada ve BRV teşhisi amacıyla ticari ELISA sistemlerinin kullanıldığı virolojik teşhis laboratuvarlarında yerel BRV suşlarına özgün ve duyarlı ELISA teşhis kitlerinin kullanılabilmesi önemli bir gelişme olarak görülmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Virus

Araştırmada, deney hayvanlarının bovine rotavirus (BRV) ile immunizasyonu ve ELISA sistemlerinde kullanmak amacıyla pozitif kontrol antijeninin elde edilmesi için Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan buzağı dışkısından elde edilen BRV saha izolatı (Pendik BRV izolatı, grup A, G10, P11) ve BRV'nin B223 referens suşu (Grup A, serotip 7, G10, P11) kullanıldı.

2.1.2. Hücre Kültürü

Bovine Rotavirus B223 suşu ve Pendik BRV saha izolatının çoğaltılması, titrasyonu ve serum nötralizasyon testi aşamalarında Ankara Şap Enstitüsü'nden temin edilen MA104/An1 devamlı hücre kültürü kullanıldı.

2.1.3. Hücre Çoğaltma Vasatı

MA104 hücre kültürünün çoğaltılması amacıyla hücre çoğaltma vasatı olarak %10 fötal dana serumu (Biological Industries, 04-007-1A, Israel) içeren antibiyotik-antimikotik (10 000 IU/ml penicilline, 10 mg/ml streptomisin, 0,025mg/ml amphotericin B, Biological Industries, Israel) katkılı Dulbecco's Minumum Essential Medium (DMEM, Biological Industries, Israel) kullanıldı.

2.1.4. Pankreatin Solüsyonu

Bovine Rotavirus B223 suşu ve Pendik BRV izolatının MA104 hücre kültürüne adaptasyonu ve enfektivitesinin arttırılması amacıyla DMEM içerisine pankreatin (Merck, F1481230 735, Germany) ilave edildi.

2.1.5. Solüsyonların Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinin çeşitli aşamalarında kullanılan sulandırma solüsyonu, yıkama solüsyonları, PBS ve diğer tampon çözeltilerin hazırlanmasında gerekli olan kimyasallar, Selçuk Üniversitesi (SÜ) Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalı (ABD) laboratuvarında hazırlandı. Virus süspansiyonlarının polietilen glikol (PEG-6000) ile konsantre edilmesi aşamasında elde edilen çöküntünün sulandırılması için, PBS ve TES buffer kullanıldı. PBS hazırlamak amacıyla NaCl (Merck, K29042800, Germany), KCl (Merck, TA838035, Germany), Na_2HPO_4-$7H_2O$ (disodyum hidrojen fosfat heptahydrate, Sigma, 431478, USA), KH_2PO_4 (potasyum dihidrojen fosfat, Sigma, P5655, USA), kullanıldı. TES buffer hazırlamak amacıyla 0,01 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Tris-HCL, Merck, 108219, Germany), 0,002 M Ethylenediaminetetraacetic Acid Trisodium Salt (EDTA, Merck, 324506, Germany) ve 0,15 M NaCl kullanıldı. Poliklonal ve monoklonal antikorların sulandırılması amacıyla kullanılan kaplama buffer hazırlamak için, Na_2CO_3 (Merck, A773998, Germany), $NaHCO_3$ (Merck, K2625823, Germany) kullanıldı. Yıkama solüsyonu hazırlamak amacıyla Tris (Merck, K2239987, Germany), NaCl ve Tween-20 (polyethylene glycol sorbitan monolaurate, Merck, 655205, Germany) kullanıldı. Antijen, dışkı örnekleri ve konjugatın sulandırılmasında ve bloklama amacıyla distile su ile %1 oranında sulandırılarak hazırlanan bovine serum albumin (BSA, Sigma, A703050-G, USA) içerisindeki 0,01 M Tris ve 0,15 M NaCl kullanıldı. Dot-ELISA sisteminde bloklama solüsyonu olarak distile su ile %3 oranında sulandırılarak hazırlanan yağsız süt tozu (endüstriyel) içerisindeki 0,01 M Tris ve 0,15 M NaCl kullanıldı. ELISA sisteminde substrat olarak mikropleyte özel 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma, T4444, USA), Dot-ELISA sisteminde substrat olarak membrana özel, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidine (Sigma, T0565, USA) kullanıldı. Stop solüsyonu olarak H_2SO_4 (Merck, K29655613, Germany) kullanıldı.

2.1.6. Polyethylene glycol (PEG)

ELISA ve Dot-ELISA sisteminde PEG ile konsantre edilen BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına ait hücre kültürü supernatantları kullanıldı. Bu amaçla ticari PEG (PEG-6000, Merck, 8.07491.1000, Germany) kullanıldı.

2.1.7. Protein Konsantrasyon Tespit Kiti

Çoğaltılan viruslara ait hücre kültürü süpernatantlarının PEG ile konsantre edilmeleri sonucunda protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla, S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan temin edilen total protein konsantrasyon belirleme kiti (Cromatest total protein tespit kiti, Linear Chemicals, 11934Xc, Spain) kullanıldı.

2.1.8. Deneme Hayvanları

Enzyme Linked Immunosorbent Assay ve Dot-ELISA sistemlerinde kullanılan antiserumun eldesinde, S.Ü. Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen 4 adet dişi, Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. Araştırmada kullanılan tavşanlar için etik kurallara uygunluk esası dikkate alınarak 2009/001 karar sayılı, 29.01.2009 tarihli Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul (SÜVFEK) toplantısı sonucunda projeye onay verildi. Tavşanların beslenmesi amacıyla, taze su ve pelet yem (Damızlık tavşan yemi, Optima Besin Maddeleri Sanayi ve Ticaret A.Ş.) kullanıldı.

2.1.9. Deney Hayvanı İmmunizasyonunda Kullanılan Adjuvantlar

İmmunizasyon işlemlerindeki farklılıklar nedeniyle 2'şerli iki gruba ayrılan tavşanlardan 2. gruba ait hayvanların immunizasyonunda, Freund'un tam (Sigma, F5881, USA) ve tam olmayan adjuvanları (Sigma, F5506, USA) kullanıldı (EK B).

2.1.10. Amonyum Sülfat

Bovine Rotavirus B223 suşu ve Pendik BRV izolatına özgü antiserum içeriğindeki poliklonal antikorların konsantre edilmesi amacıyla amonyum sülfat (Sigma, A2939, USA) ile hazırlanan çözelti kullanıldı.

2.1.11. Diyaliz Materyali

Elde edilen antiserumun amonyum sülfattan arındırılması için gerçekleştirilen diyaliz işleminde ticari olarak elde edilen steril diyaliz torbası (25 mm, Sigma, D6191, USA) kullanıldı.

2.1.12. Anti-BRV Poliklonal Antikoru

İki farklı immunizasyon işlemi sonunda elde edilen kan serumu örneklerine uygulanan amonyum sülfat ile çöktürme metodu ve diyaliz işlemi sonrasında, BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına özgü anti-BRV poliklonal antikorları elde edildi.

2.1.13. ELISA ve Dot-ELISA Sisteminde Kullanılan Materyaller

ELISA ve Dot-ELISA katı faz materyali

Enzyme Linked Immunosorbent Assay sisteminde BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına karşı SÜ Viroloji ABD laboratuvarında hazırlanan anti-BRV poliklonal antikora ve ticari olarak elde edilen monoklonal antikora ait optimizasyon aşamasında ve dışkı örnekleri ile test aşamasında 96 gözlü, düz tabanlı, antijen/antikor tutuculuğu yüksek özel mikropleytler (Greiner, Bio-one, 655061, Germany) kullanıldı. Dot-ELISA sisteminde ise BRV B223 suşu, Pendik BRV izolatı, anti-BRV poliklonal antikoru ve monoklonal antikora ait optimizasyon aşamasında ve dışkı örnekleri ile test aşamasında katı faz olarak 0,45 µm'lik nitroselülöz membran kağıdı (Sartorius, 11106-142-G, Germany) kullanıldı.

Konjugat

ELISA ve Dot-ELISA sistemlerine ait optimizasyon aşamalarında sekonder antikor olarak, rotavirusa özgü HRPO işaretli goat anti-bovine rotavirus konjugatı (ViroStat, 0504, USA) kullanıldı.

Monoklonal antikor

Araştırmada mikropleyt ve nitroselüloz membranların kaplanmasında tavşanlardan elde edilen poliklonal antikorların yanında, karşılaştırma amaçlı monoklonal antikorlarla da ELISA ve Dot-ELISA sistemleri geliştirildi. Bu sistemlerde, optimal antijen miktarının belirlenmesi ve dışkı örneklerinde BRV antijen varlığının tespiti amacıyla kullanılan anti-rotavirus monoklonal antikoru (Mab rotavirus from ascites, anti-major iner capsid protein VP6 antibody, clone 2B4, Abcam, ab43808, Portland, USA) üretici firmadan temin edildi.

Dışkı örnekleri

Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Dot-ELISA ve ticari ELISA sistemlerinde BRV antijen varlığı yönünden test edilecek dışkı örnekleri, S.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniği'ne getirilen ve diyare belirtisi gösteren 1 yaş altındaki 100 adet buzağıdan elde edildi. Dışkı örnekleri, önceden numaralandırılan, steril materyal toplama kaplarına (Isolab, Germany) aktarılarak laboratuvara nakli sağlandı. Elde edilen bu dışkı örnekleri, küçük hacimlerdeki steril ependorf tüplere (Isolab, Germany) paylaştırılarak -20^0C'de muhafaza edildi.

2.1.14. Ticari ELISA

Araştırmada geliştirilen test sistemlerini karşılaştırmak amacıyla üretici firmadan temin edilen ELISA BRV teşhis kiti (Bio-X veterinary diagnostics, Bio K067, Belgium) kullanıldı.

2.1.15. İstatistiksel Hesaplamalar

Bu çalışmada yapılan hesaplama ve analiz işlemlerinin tümü, özgün bir bilgisayar yazılımı (Minitab®, Minitab Inc, USA) ile gerçekleştirildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

MA104 hücre kültürü azot tankından çıkarılarak 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızla çözdürüldükten sonra, içerisinde %10 fötal dana serum, %1 antibiyotik-antimikotik (10 000 IU/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, 0,025mg/ml amfoterisin B) bulunan DMEM içerisinde süspanse edildi ve 37°C'de CO_2'li roller inkübatör (Pendik Veteriner Kontrol Araştırma laboratuarı) içerisindeki flasklarda (Cell master, Greiner, Bio-one, T-2702-4, Germany) monolayer halde üretildi. Hücre kültürü flasklarının inkübator içerisindeki dönüş hızı 12 dk'da 1 devir olarak ayarlandı. Ayrıca virus titresinin belirlenmesi ve serum nötralizasyon test aşamalarında kullanılmak üzere 24 gözlü hücre kültürü pleytlerinde (Corning inc, Costar, 3524, USA), 37°C'de CO_2'li etüvde, MA104 hücre kültürü monolayer olarak üretildi.

2.2.2. Virusların Hücre Kültürüne Adaptasyonu ve Çoğaltılması

Araştırmada kullanılan BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatının çoğaltılması amacıyla roller inkübatör içerisindeki flasklarda monolayer halde çoğaltılan MA104 devamlı hücre kültürüne virusların ekimi gerçekleştirildi. Bu amaçla hücre kültürü flasklarında %80-90 oranında monolayer halde üretilen hücrelerin idame vasatları döküldükten sonra, hücre yüzeyi phosphate buffer saline-minus (PBS-M) ile 3 kez yıkandı. İçerikleri döküldükten sonra flasklardan birine adsorbsiyona bağlı ekim tekniği ile 1 ml BRV B223 suşu, bir diğer flaska ise 1 ml Pendik BRV izolatı inokule edildi. Adsorbsiyon amacıyla etüvde 37^0C'de 1 saat bekletilen virus ekilmiş hücre kültürlerine %1 antibiyotik ve antimikotik içeren serumsuz DMEM içerisine distile su ile %0,1 oranında (10 µg/ml) saf pankreatin solüsyonu ilave edilerek hazırlanan virus çoğaltma vasatı ilave edildi. Virus ekilen hücre kültürleri, 37^0C'de CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Virus çoğaltılması, hücre kontrolleri ile birlikte yürütüldü. Bu amaçla ayrılan iki adet doku kültürü flaskına, 1'er ml pankreatin katkılı DMEM ilave edilerek 1 saat süreyle 37^0C'de CO_2'li etüvde inkübe edildi. Süre sonunda %1 oranında pankreatin içeren serumsuz DMEM ilavesi yapılan hücre kontrol flaskları 37^0C'de CO_2'li etüvde inkübasyona

bırakıldı. Virus ekimi gerçekleştirilen flasklar, 8-10 gün süreyle belirgin bir CPE görülünceye kadar doku kültürü mikroskobu (Olympus C-K, Tokyo, Japan) ile kontrol edildi. Virus ekimi yapılan hücre kültürlerine, her iki günde bir 10 µl pankreatin ilavesi gerçekleştirildi.

Bovine Rotavirus B223 suşu ve Pendik BRV izolatı ekimi yapılan MA104 hücre kültüründe %90 ve daha fazla oranda karakteristik CPE'lerin görülmesiyle birlikte hücre kültürü flaskları -20^{0}C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Flask içeriğindeki intraselüler olan virusun ekstraselüler duruma getirilmesi amacıyla 3 kez dondurulup 37^{0}C'ye ayarlı benmaride hızla çözdürülen virus süspansiyonları santrifüj tüplerine aktarılarak +4^{0}C'de 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen supernatantların tamamı mantar agar/kanlı agara ekim ile sterilite kontrolü yapıldıktan sonra steril hücre saklama tüplerine 1 ml'lik hacimler halinde paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -80^{0}C'de muhafaza edildi.

MA104 hücre kültüründe virus ekimi sonrasında CPE gözlemlenmesini takiben oluşan intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri Harris hematoksilen-eozin boyama metodu ile belirlendi.

2.2.3. Virusların Titrasyonu

Araştırmada kullanılan BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatının titresini (doku kültürü infektif doz 50-DKID$_{50}$) tespit etmek amacıyla, Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri ve Gülyaz ve ark (2005) tarafından modifiye edilen yöntemden yararlanıldı. Virus titresinin belirlenmesi amacıyla, monolayer halde MA104 hücre kültürü üretilmiş olan 24 gözlü pleytler kullanıldı. Hücrelerin üretildiği pleyt gözlerindeki vasat içerikleri boşaltıldı ve hücre yüzeyi pankreatin katkılı DMEM ile 3 kez yıkandı. Pankreatin katkılı DMEM (%1 antibiyotik ve antimikotik içeren serumsuz vasat) ilave edilen pleyt gözleri virus ekiminden önce 37^{0}C'ye ayarlı %5 CO_2'li etüvde 2-3 saat süre ile muhafaza edildi. BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatının pankreatin katkılı DMEM içinde logaritma 10 tabanına (log_{10}) göre 10 katlı dilusyonları hazırlandı. Hazırlanan her bir sulandırma basamağından pleytin bir sırasında bulunan dört gözüne 0,1'er ml konuldu. Virus kontrol amacıyla ayrılan dört göze 0,05 ml pankreatinli serumsuz DMEM ve 0,05 ml

saf virus konuldu. Hücre kontrol amacıyla ayrılan diğer dört göze ise 0,1 ml serumsuz DMEM konuldu. Titrasyon pleyti, inkübasyon amacıyla 1 saat 37^0C'lik CO_2'li etüve kaldırıldı. Süre sonunda pleyt gözlerindeki virus sulandırmaları ve kontrollerin üzerine 2 ml pankreatinli idame vasatından eklendi. Pleytler, 37^0C'lik %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde meydana gelen virus'a özgü CPE oluşumları 8-10 gün boyunca her gün düzenli olarak doku kültürü mikroskobu ile kontrol edildi. Belirgin bir CPE oluşuncaya kadar tüm pleyt gözlerine her iki günde bir 10 µl pankreatin solüsyonu ilave edildi ve 8. günün sonunda virus titreleri Kaerber metodu (Kaerber 1964)'na göre hesaplandı.

2.2.4. PEG-6000 Yöntemi ile Viral Proteinlerin Konsantre Edilmesi

Araştırmada hücre kültürü flaskları içerisinde çoğaltılan ve idame vasatı içeren virus süspansiyonlarının santrifüj edilmeleri ile elde edilen süpernatantların konsantre edilmesi amacıyla, Mahy ve Kangro (1996) tarafından bildirilen PEG-6000 çöktürme yöntemi uygulandı.

Polyethylen glikol ile viral proteinlerin çökeltilmesi işlemi öncesinde, her iki BRV suşuna ait viral süspansiyonlar derin dondurucudan çıkarılarak 3 kez dondurulup çözdürüldü ve daha sonra toplam hacmi 1500 ml olan flask içeriği, 15 ml lik santrifüj tüplerine doldurularak toplanan virus süspansiyonları santrifüj (Sigma, 3K-18, rotor no: 19777-H, USA) içerisine yerleştirilip 10 000 rpm, +3 ^{o}C de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar bir beher içerisine döküldü ve beher buz kovası içine alınarak manyetik karıştırıcı düzeneği kuruldu. Daha sonra final konsantrasyonu %2,3 olacak şekilde ayarlanan NaCl, beher içerisine azar azar eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde düşük devirde karıştırıldı. PEG-6000 final konsantrasyonu %7 olacak şekilde ayarlandı. Bu amaçla PEG, PBS içerisinde (1500 ml total virus hacmi için; 100 gr PEG: 150 ml PBS) ısıtılarak çözdürüldü ve erimiş PEG'in tamamı yavaşça bu karışıma ilave edildi. Karışımın bulunduğu beherin üzeri kapatıldıktan sonra 1 saat karışması sağlandı ve PEG'in tam olarak çözülmesi gerçekleştirildi. Süre sonunda buz banyosu içerisine alınan beher +4^{o}C buzdolabına kaldırılarak 1 gün boyunca bekletildi. İki farklı virus için ayrı ayrı düzenekler kurularak tamamlanan bu işlem sonucunda viral proteinlerin çökelmesi sağlandı. Viral proteinlerin çökeltilmesi için gerekli olan süre tamamlandıktan sonra,

santrifüj tüplerine aktarılan viral süspansiyonlar, 10 000 rpm +3^{o}C de 20 dk santrifüj edilerek gözle görülür belirgin bir çöküntü elde edildi. Tekrarlanan santrifüj işlemleri sonucunda üst kısımda toplanan sıvıdaki PEG'in ortamdan uzaklaşması sağlandı. Elde edilen çöküntü, tartımları yapılan kimyasalların (0,01 M Tris-HCL, 0,002 M EDTA, 0,15 M NaCl) az miktar ultra saf su (pH 8) ile çözdürülerek son pH'sı 7,2 olacak şekilde ayarlanması ile hazırlanan ve otoklavize edilerek sterilizasyonu sağlanan 0,5 ml TES buffer ilavesiyle süspanse edilerek karıştırıldı. Son olarak viral süspansiyonlar içerisinde bulunan PEG'i uzaklaştırmak amacıyla, üzerlerine 1 ml TES buffer daha ilave edilerek santrifüj tüplerine alındı ve 13 000 g'de 23^{o}C'de 4 dk süre ile tekrar santrifüj edildi. 1,5 ml hacim çizgisine kadar doldurulan steril ependorflar, santrifüj (Sigma 3-16, rotor no: 12131-H) içerisine yerleştirilerek, 10 800 rpm de (13 040 xg) 23 ^{o}C'de 4 dk santrifüj edildi. Mahy ve Kangro (1996) tarafından belirtilen metot ile elde edilen BRV süpernatantları, küçük hacimlere bölünerek -80^{o}C'de muhafaza edildi. Bu işlem sonucunda, santrifüj sonrası elde edilen izotonik buffer içerisindeki BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına ait hücre kültürü süpernatantının, yaklaşık olarak 100 kat konsantre virus ihtiva edebileceği bildirilmiştir (Mahy ve Kangro 1996).

2.2.5. Viral Protein Miktarının Belirlenmesi

Polyethylen glikol ile viral proteinlerin çökeltilmesi işlemi sonrasında kısmi olarak saflaştırılmış olan virus süspansiyonlarındaki protein miktarı, total protein konsantrasyon kiti ile tespit edildi. Test absorbans değerleri, spektrofotometre cihazı (UV2100/UV-VIS, Shimadzu CPS-260) 540 nm dalga boyuna ayarlanarak belirlendi.

2.2.6. Deney Hayvanları

Enzyme linked immunosorbent assay ve Dot-ELISA sistemlerinde anti-BRV poliklonal antikoru olarak kullanılan BRV B223 suşuna ve Pendik BRV izolatına özgü her bir antiserumun elde edilmesi amacıyla Yeni Zelanda ırkına ait ikişer adet tavşan kullanıldı. Tavşanların ilk 1 haftalık uyum süreci tamamlandığında davranış ve genel görünüş itibariyle sağlıklı görülen tavşanların kulakları alkolle temizlenip traşlandıktan sonra görünür hale getirilen kulak venasından intracet (canul, polymed)

yardımıyla serum tüplerine kan (10 ml/tavşan) alınarak elde edilen serumlar, 0,45 µm (Sartorius, 16555-K, Germany) ve 0,20 µm por çaplı membran filtrelerden (Sartorius, 16534-K, Germany) süzüldükten sonra kanlı agarda sterilite kontrolleri yapılarak -20^{0}C'ye kaldırıldı. Hayvanların BRV ile immunizasyonları öncesinde elde edilen serum örnekleri, serum nötralizasyon test aşamasında "negatif kontrol serumu" olarak kullanıldı.

2.2.7. Deney Hayvanlarının İmmunizasyonu

Antiserumun elde edilmesinde, Anand ve ark (2001) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek uygulandı. Gerekli sağlık kontrolleri yapılarak uyum süreci tamamlanan 4 adet tavşan ikişerli gruba ayrıldı ve her bir gruba uygulanacak immunizasyon tekniği ve süreci belirlendi. Tavşanlardan her biri iyice tespit edildikten sonra boyun ve sırt bölgesinde belirlenen enjeksiyon yerleri alkol ile temizlenerek deri altına enjeksiyon yapıldı.

Birinci grup tavşanların immunizasyonunda, bir tavşana BRV B223 suşu, diğer tavşana Pendik BRV izolatına ait hücre kültürü supernatantı ve PEG ile konsantre edilen virus süspansiyonları kullanıldı. İkinci grup tavşanların immunizasyonunda, bir tavşana BRV B223 suşu, diğer tavşana Pendik BRV izolatına ait hücre kültürü supernatantı ile Freund'un tam ve tam olmayan adjuvantı eşit hacimde karıştırıldıktan sonra hazırlanan emülsiyon kullanıldı (EK A., EK B.). İmmunizasyon sonrası elde edilen serumlar, ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinin optimizasyonu aşamalarında poliklonal antikor (yakalayıcı antikor) kaynağı olarak kullanıldı.

BRV B223 referens suşu ile immunizasyon

Bu amaçla 1. grup tavşanlardan bir tanesi, enjeksiyon için hazırlanan düzenek üzerinde sabitlendi. Steril bir enjektör içerisine alınan BRV B223 suşuna ait hücre kültürü supernatantı (5 ml) tavşanın dorsalinde belirlenen 5 bölgeden 1'er ml hacminde paylaştırılarak, 1'er gün arayla 1., 3., 5. günlerde deri altı yolla verildi, 7., 15. ve 21. günlerde ise toplam 2'şer ml daha PEG ile konsantre edilen BRV B223

suşu ile enjeksiyona devam edildi. En son olarak enjeksiyon tarihinden 1 ay sonra kulak venasından intracet yardımıyla toplanan kandan serum elde edildi.

İkinci grup tavşanlar arasından seçilen bir adet tavşana ise MA104 hücre kültürü ortamına adapte edilerek çoğaltılan, titresi belirlenmiş BRV B223 suşuna ait hücre kültürü supernatantı (0,5 ml) ile 0,5 ml Freund'un tam adjuvantı emülsiyon oluşturulacak şekilde iyice karıştırılarak hazırlanan antijen solüsyonu enjekte edildi. Virus suspansiyonuna ait toplam 1 ml'lik karışımın dört eşit hacime (250'şer µl) bölünerek, tavşanın dorsalinde belirlenen dört bölgeden deri altı yolla enjeksiyonu gerçekleştirildi. Buna göre, ilk immunizasyonu takiben 1 ay sonra Freund'un tam olmayan adjuvantı ile hazırlanan viral süspansiyon ile immunizasyon tekrarlandı. İmmunizasyondan bir hafta sonra fizyolojik tuzlu su solüsyonu içerisindeki BRV B223 suşuna ait hücre kültürü supernatantı (0,5 ml virus :0,5 ml PBS) kas içi yolla enjekte edildi. Son enjeksiyondan iki hafta sonra kulak venasından intracet yardımıyla alınan kandan serum elde edildi. Birinci ve ikinci grupta yer alan her iki tavşana ait BRV B223 suşu ile gerçekleştirilen immunizasyon süreci EK. A ve EK. B'de şematik olarak gösterildi.

Pendik BRV izolatı ile immunizasyon

Tavşanların Pendik BRV izolatı ile immunizasyonunda, BRV B223 referens suş için uygulanan metottan yararlanıldı (EK. A ve EK. B).

Her bir tavşanın BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatı ile immunizasyonu işlemi öncesinde (negatif serum) ve sonrasında hayvanların kulak venalarından alınan kanlar, steril santrifüj tüplerine paylaştırıldıktan sonra 3000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen serumlar, 0,2 µm'lik enjektör filtreden geçirilerek küçük hacimler halinde -20^{0}C'de saklandı.

2.2.8. Anti-BRV Poliklonal Antikorunun Hazırlanması

İmmunizasyon sonrasında BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına özgü serumların konsantre edilmesi ve diyalizi sonucu elde edilen anti-BRV poliklonal antikorları ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde yakalayıcı antikor (capture antibody)

olarak kullanıldı. BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına özgü her iki antiserum içeriğindeki poliklonal antikorların konsantre edilmesi ve diyalizi aşamalarında aşağıda belirtilen yöntemler kullanıldı.

Amonyum sülfat çökeltme metodu ile poliklonal antikorların konsantre edilmesi

Bovine Rotavirus B223 suşu ve Pendik BRV izolatına özgü antiserum içeriğindeki poliklonal antikorların konsantre edilmesi amacıyla, Arda ve Ertan (2004) tarafından belirtilen doymuş amonyum sülfat ile çöktürme yöntemi kullanıldı. Buna göre, antiserum içeren beherler manyetik karıştırıcı üzerindeki buz dolu bir kabın içine yerleştirildi. %70 doygunluk için 1 lt çözeltiye eklenecek amonyum sülfat miktarı belirlendi, havanda iyice toz haline getirilmiş amonyum sülfat antiserum ihtiva eden beherler içerisine azar azar ilave edildi. Amonyum sülfat ilavesi bittikten sonra 1 saat boyunca karıştırılmaya devam edildi. Antiserumlar farklı santrifüj tüplerine aktarıldı ve 10 000 g de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen üst sıvılar uzaklaştırıldı. Santrifüj tüplerinin dip kısmında kalan çöküntü, kendi hacminin 1-2 katı PBS tamponu içerisinde çözdürüldü. Amonyum sülfat tuzu ile çöktürme sonucu poliklonal antikor ihtiva eden antiserumlar, ayrı ayrı steril tüplere alındı ve diyaliz işlemi yapılıncaya kadar $+4^0$C'de muhafaza edildi.

Diyaliz düzeneğinin hazırlanması

Diyaliz işleminde, Arda ve Ertan (2004) tarafından belirtilen yöntem uygulandı. Her bir antiserum için farklı bir diyaliz düzeneği hazırlandı. Diyaliz tüpleri 500 ml distile su içerisindeki %2 sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) ve %0,05 EDTA (pH 8,0) solüsyonu içeren bir beherde 10 dk kaynatıldı. Süre sonunda bu solüsyon içerisinden çıkarılan diyaliz tüpleri, distile su içeren bir beherde 2 kez kaynatıldı. Diyaliz tüpleri temiz bir kağıt havlu üzerine alınarak kurutuldu ve 0,02 ml, 1mM EDTA içeren steril distile su içerisindeki behere konularak kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi. Diyaliz tüpleri kullanılmadan önce bidistile su ile yıkandı.

Diyaliz tüpünün bir ucu zedelenmeyecek şekilde bağlandı. Diyalize edilecek amonyum sülfat ile konsantre edilen antiserum örnekleri steril bir pipet yardımıyla

tüplere dolduruldu. Diyaliz tüpünün içindeki hava çıkarıldıktan sonra diğer ucu da bağlandı. Diyaliz tüpü en az 10 katı hacimde steril ultra saf su dolu olan manyetik karıştırıcı düzeneği üzerindeki bir beher içine alındı ve $+4^0$C'de 8 saat süre ile saf suya karşı diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz işlemi süresince diyaliz tüpünün bulunduğu beher içerisindeki saf su birkaç kez yenilendi. Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra tüpün bir ucu kesilerek içindeki örnek temiz bir cam tüpe aktarıldı. Poliklonal antikor ihtiva eden konsantre antiserumlar olası bir bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi amacıyla 0,20 µm'lik enjektör filtreden geçirildi ve 1 ml hacmindeki ependorflara paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -20^0C'de muhafaza edildi.

2.2.9. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon 50 (SN_{50}) Titrelerinin Belirlenmesi

Tavşanların immunizasyonu sonucunda elde edilen serumlarda, immunizasyonun başarılı olup olmadığını ortaya koymak amacıyla serum nötralizasyon testi yapıldı. Daha sonra pozitif kan serumlarındaki antikor titrelerinin (SN_{50} değeri) belirlenmesi amacıyla Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri ve Gülyaz ve ark (2005) tarafından modifiye edilen nötralizasyon testi uygulandı. Nötralizasyon testi öncesinde 24 gözlü pleytlerde MA104 hücre kültürü (300 000 hücre/ml) monolayer olarak çoğaltıldı. Derin dondurucudan çıkarılarak çözdürülen immunizasyon sonrası tavşan serumları 56^0C'lik benmaride 30 dk süre ile inaktive edildi. İnaktive edilen serum örneklerine ait iki katlı serum sulandırmalarının hazırlanması amacıyla steril boş bir 24 gözlü pleyt kullanılarak her bir sulandırma basamağı için birer göz seçildi. Bu amaçla ayrılan 9 adet pleyt gözünün her birine 500 µl pankreatin katkılı DMEM konuldu. Birinci sıradaki göze 500 µl serum örneği ilave edilerek pipete edildi. Bu şekilde bir önceki gözden bir alttaki göze 500 µl serum sulandırması aktarılarak karıştırılan serumlar 2'şer katlı sulandırıldı. Böylece 1/2'den 1/512 ye kadar 9 basamak serum sulandırılması hazırlandı. Daha sonra, tüm gözlere 500 µl 100DKID$_{50}$ oranında sulandırılan virus ilave edildi ve pleyt 1,5 saat süre ile 37^0C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlanmadan, daha önce gözleri MA104 hücre kültürü ile kaplanmış pleytler ekim için hazırlandı. Bu amaçla pleyt gözlerinde serum sulandırma basamakları, hücre kontrol ve virus kontrol için gerekli 2'şer göz belirlenip işaretlendikten sonra pleyt içeriğindeki tüm

hücre üretme vasatları pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı. Pleyt gözlerindeki hücrelerin yüzeyi, antibiyotik katkılı serumsuz DMEM ile 2 kez yıkanarak içeriğindeki sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. İnkübasyon süresi bitiminde her bir sulandırmadan ikişer göze olmak üzere 200 µl ilave edildi. Hücre kontrol için ayrılan göze 1 ml pankreatin katkılı serumsuz DMEM ilave edildi. Virus kontrol için ayrılan göze 100 µl 100DKID$_{50}$ oranındaki virus sulandırmasından ilave edildi ve 37^{0}C'de 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda pleyt gözlerindeki virus ihtiva eden karışımlar pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir pleyt gözünde bulunan hücre yüzeyleri 1'er ml pankreatinli vasat ile yıkandı. Tüm gözlere 1'er ml pankreatinli vasat ilave edildi. Test pleytleri %5 CO_2 içeren 37^{0}C'lik etüve kaldırıldı. Pleyt gözleri her gün doku kültürü mikroskobunda incelendi. Üçüncü ya da 4. günün sonunda tüm pleyt gözlerine 5-10 µl saf pankreatin ilavesi yapıldı ve sonuçlar 4. günden itibaren değerlendirmeye alındı.

2.2.10. ELISA Sisteminin Hazırlanması

Enzyme linked immunosorbent assay sisteminin hazırlanması sırasında, Al-Yousif ve ark (2000) tarafından bildirilen ELISA metodu modifiye edilerek uygulandı. ELISA'nın optimizasyonu aşamasında, pleyt gözlerini kaplamak için gerekli olan ticari monoklonal antikor ve her iki BRV suşuna özgü hazırlanan poliklonal antikor sulandırma oranları ve antijen titresinin belirlenmesi amacıyla Crowther (2009) tarafından bildirilen checkerboard (dama tahtası) titrasyon metodu uygulandı. Test aşamasında kullanılan antijen ve antikor miktarının belirlenmesi amacıyla poliklonal ve monoklonal antikor ile duyarlı hale getirilen her bir ELISA düzeneği ile antijen ve antikor sulandırma oranları karşılaştırılarak uygulanan dama tahtası metodu sonucunda minimum miktar ile maksimum değer oluşturan gözler değerlendirmeye alındı. Optimizasyon aşaması boyunca kullanılan her bir ELISA düzeneği, 3'er kez tekrar edildi. En uygun sulandırmaların tespitinde, OD değeri 1'e en yakın olan ve grafiğin (Grafik 3.1, Grafik 3.2) ani düşüş gösterdiği en son sulandırma oranları göz önüne alındı.

Testin optimizasyonu sürecinde farklı inkübasyon ısısı (20^{0}C-37^{0}C), inkübasyon süresi (1, 1.5, 2 ve 3 saat), farklı bloklama solüsyonu (BSA ve süt tozu) ve konsantrasyonları (%1-5 BSA, %3 süt tozu), farklı bloklama süresi (30 dk, 1-2

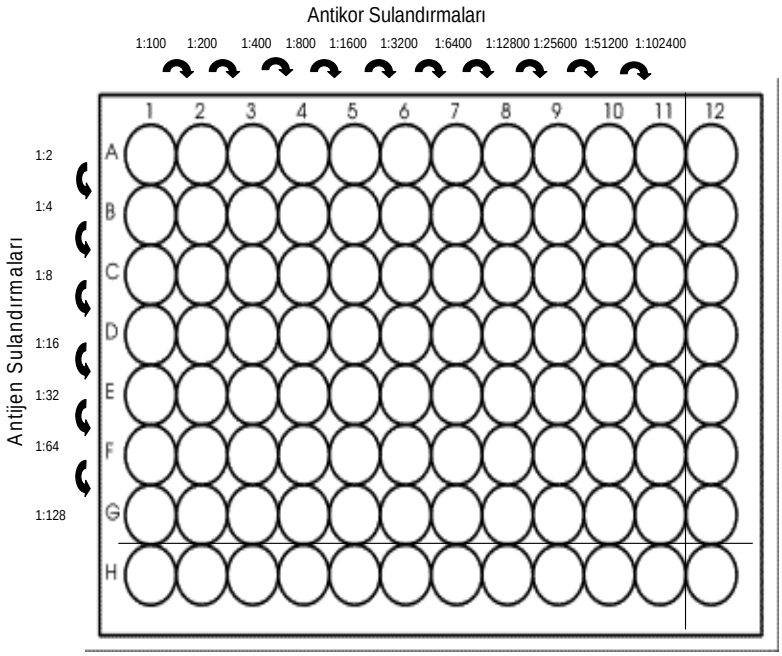
saat) ve yıkama sayısı (3-5 kez) değişikliği ile test tekrarına gidildi. İki farklı bloklama işlemi sonrasında dışkı örneklerine ait ELISA OD değerlerinin istatistiksel açıdan yorumlanabilmesi amacıyla %95 güven aralığında uygulanan t- testi (Minitab®, Minitab Inc, USA) ile elde edilen istatistik verileri kullanıldı.

Pleyt gözlerinin tavşan anti-BRV poliklonal antikoru ile kaplanması

Antikorların optimal sulandırma miktarlarının belirlenmesi amacıyla deney hayvanlarından elde edilen anti-BRV poliklonal antikorları (1:100-1:102 400 arasındaki sulandırmalar) ve daha önce konsantre edilen BRV B223 suşu ile Pendik BRV izolatına ait viral antijenler (1:2 - 1:128 arasındaki sulandırmalar) dama tahtası metoduna uygun bir şekilde sulandırılarak kullanıldı (Çizelge 2.1). Bu amaçla sulandırma solüsyonu olarak, tüm gözlere 50'şer µl karbonat-bikarbonat solüsyonu ilave edildi. Saflaştırılmış olan tavşan anti-BRV poliklonal antikorları 1:100 oranında kaplama bufferi ile sulandırılarak her pleyt gözü için 50'şer µl alınarak mikropleytin 1. sütunundaki tüm gözlere bırakıldı. Çok kanallı otomatik pipet yardımıyla ilk sütundaki 8 gözden alınan 50 µl antikor-kaplama solüsyonu karışımı 2. sütundaki 8 adet göze bırakıldı. Onbirinci sütunda bulunan gözlerdeki karışım alınarak dışarı atıldı. Pleyt 37^0C'de 2 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda daha önce hazırlanarak her bir göze ilave edilen 100 µl yıkama solüsyonu ile tüm gözler 3 kez yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, her bir göze ilave edilen 200 µl BSA solüsyonu ile bloklama yapılarak antikor ile kaplanmayan boşluklar kapatıldı. Bu amaçla pleyt 1 saat süre ile 37^oC'lik etüvde bekletildi. Süre sonunda yıkama işlemi tekrarlandı. Tüm gözlere sulandırma solüsyonu olarak kullanılan %1'lik BSA çözeltisinden 50'şer µl ilave edildi. Daha sonra A satırındaki tüm gözlere (A12 gözü de dahil) PEG ile konsantre edilmiş olan viral antijenden 50 µl ilave edildi (1:2 sulandırma). Çok kanallı otomatik pipet yardımıyla ilk satırdaki gözler pipete edilerek 50'şer µl içerik aşağıya doğru 2 katlı sulandırma gerçekleştirilecek biçimde tüm gözlerdeki solüsyonların karışımı sağlandı. En son G sırasına ait gözlerden alınan karışımlar uzaklaştırıldı. Mikropleyt, inkübasyon amacıyla 1 saat 37^oC'lik etüvde 1 saat boyunca bekletildi. Süre sonunda yıkama işlemi tekrar edildi. 1:500 oranında BSA solüsyonu ile sulandırılarak hazırlanan anti-rotavirus HRPO konjugatı 50'şer µl tüm gözlere ilave edildi. Pleyt 1 saat 37^oC'lik etüve kaldırıldı. Süre bitiminde, yıkama işlemi 4 kez tekrarlandı. Pleyt kağıt havlu

üzerine ters çevrilerek 1-2 defa hafifçe vurulmak suretiyle gözlerde kalan yıkama sıvısının uzaklaşması sağlandı. Mikropleyte özel TMB solüsyonundan pleytin her bir gözüne 50'şer µl ilave edilerek 5-15 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. Belirtilen süre sonunda tüm gözlere 50 µl H_2SO_4 solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu OD değerleri belirlendi.

Çizelge 2.1. Poliklonal antikorlar için dama tahtası (checkerboard) titrasyon metodu (Monoklonal antikorlar için "Antikor sulandırmaları" x100)



Pleyt gözlerinin monoklonal antikor ile kaplanması

Pleyt gözlerinin monoklonal antikorlar ile kaplanması, mikropleytlerin poliklonal antikorlar ile kaplama işlemi sırasında takip edilen yönteme göre gerçekleştirildi. Ancak sulandırma oranları, poliklonal antikorlar için 1:100-1:102 400 arasında hazırlanırken ticari monoklonal antikor için firma tarafından önerilen 1:10 000 optimum sulandırmadan başlamak kaydıyla 1:10 240 000 sulandırmaya kadar 2'şer katlı olarak yapıldı. Pleyt gözlerinin ticari monoklonal antikor ile kaplanmasıyla gerçekleştirilen dama tahtası titrasyonu işlemi, mikropleytlerin poliklonal antikorlar ile kaplama işlemi sırasında takip edilen yönteme göre yapıldı.

2.2.11. Dışkı Örneklerinde Antigen Capture ELISA ile BRV Varlığının Araştırılması

Ticari ELISA BRV teşhis kiti ile işleyiş benzerliğinin sağlanması amacıyla pleytlerin A, C, E ve G gözleri, araştırma sonuçlarına göre BRV suşları ile en iyi OD değeri veren poliklonal antikor sulandırması ile kaplandı. Ayrıca aynı işlem en iyi OD değeri verdiği belirlenen monoklonal antikor sulandırması ile de farklı pleytlerde gerçekleştirildi. Pleytlere ait B, D, F ve H gözleri ise sadece %1'lik BSA solüsyonu ile kaplandı. 37^0C'de 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda 3 kez yıkama işlemi yapılarak tüm gözlere 200 µl bloklama solüsyonu (%1 BSA) ilave edildi. 37^0C'de 1 saatlik bloklama işlemi sonucunda 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Böylece pleytler teste hazır hale getirildi. Dama tahtası titrasyonu sonucunda belirlenen optimal sulandırma oranında hazırlanan viral antijen (pozitif kontrol) ve test edilecek dışkı örnekleri önceden işaretlenerek belirlenen gözlere 50'şer µl ilave edildi. Buna göre, pozitif kontrol antijeni ya da test edilecek her bir dışkı örneği, önceden ayarlanan bir çift göze eşit hacimde ilave edildi. Oda sıcaklığında, 1 saat süre ile inkübasyon sonucunda 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkamayı takiben, tüm gözlere 50 µl antijene özgü anti-rotavirus konjugat ilavesi yapıldı ve pleyt karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Tamamlanan inkübasyon süresi sonunda 4 kez yıkama yapıldı ve fazla yıkama sıvısı kağıt havlu yardımıyla uzaklaştırıldı. Tüm gözlere 50 µl TMB kromojen solüsyonu bırakıldı. Enzim-substrat reaksiyonunun gerçekleşmesi amacıyla pleytler, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 10 dk süre ile bekletildi. Süre sonunda ELISA okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda pleyt gözlerine ait OD değerleri belirlenerek kayıt edildi.

2.2.12. ELISA Cut-off Değerinin Tespiti

Poliklonal ve monoklonal antikor ile duyarlı hale getirilen ELISA pleytleri ile BRV varlığı yönünden test edilen dışkı örneklerine ait OD değerlerinin yorumlanması amacıyla Frey ve ark (1998) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. Buna göre, test pleytine ait negatif kontrol OD değerlerinin ortalaması belirlendi ve elde edilen bu değer ile negatif kontrol (NK) OD değerlerine ait standart sapma (SS) değerinin 3 katının toplanması sonucunda cut-off değeri ($NK_{ortalama}$+3xSS) belirlendi. Dışkı örneklerine ait OD değerleri ve negatif kontrol OD değerleri arasındaki fark ($OD_{örnek}$- $OD_{örnek\ NK}$) alınarak elde edilen değerin, cut-off değeri ile

karşılaştırılması sonucunda pozitif ya da negatif olarak değerlendirme gerçekleştirildi. Elde edilen fark, belirlenen cut-off değerinden daha büyük ve eşit ise sonuç pozitif, daha küçük ise sonuç negatif olarak değerlendirildi.

2.2.13. Dot-ELISA Sisteminin Hazırlanması

Anand ve ark (2001) tarafından bildirilen Dot-ELISA tekniği modifiye edilerek uygulandı. Testin optimizasyon aşamasında, farklı inkübasyon ısıları (20^0C-37^0C), inkübasyon süreleri (1, 1.5, 2 ve 3 saat), farklı bloklama solüsyonu (BSA ve süt tozu) ve konsantrasyonları (%1-5 BSA, %3 süt tozu), farklı bloklama süreleri (30 dk, 1-2 saat), farklı yıkama solüsyonları (PBS-Tween 20, TBS-Tween 20) ve her bir inkübasyon periyodundan sonra yıkama sayısı (3 ve 5 kez) değiştirilerek test tekrarına gidildi. Bu amaçla taşıyıcı katı faz olarak 0,45 µm por çapına sahip nitroselüloz membran kağıtları kullanıldı. Membran kağıtları kullanılmadan önce, TBS içerisinde 2 dk süreyle ıslatıldı ve havada kurutuldu. Testin optimizasyonu aşamasında PEG ile konsantre viruslar antijen olarak kullanıldı. Optimal miktardaki antijen ve antikor miktarının belirlenebilmesi için yine dama tahtası titrasyon düzeneğinden yararlanıldı.

Membran yüzeyinin tavşan anti-BRV poliklonal antikoru ile kaplanması

Bovine Rotavirus B223 suşu ve Pendik BRV izolatı ile immunizasyon sonrasında amonyum sülfat çökeltme metodu ile konsantre edilen tavşan anti-BRV poliklonal antikorlarına ait optimal sulandırma oranları, dama tahtası titrasyonu ile belirlendi. Bu amaçla aralarında gerekli boşluk bırakılarak işaretlenen membran, TBS ile 2-3 dk ıslatıldı ve havada kurutuldu. Kaplama solüsyonu ile sulandırılarak hazırlanan poliklonal antikorlar, membran üzerinde işaretlenen yerlere 3'er µl damlatıldı. Damlatılan poliklonal antikorun kuruması için oda sıcaklığında 30 dk süre ile bekletildi. Süre sonunda katı fazda spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla tüm gözlere 10 µl %3'lük süt tozu, Tris ve NaCl içeren bloklama solüsyonu damlatılarak 2-3 dk süre ile kuruması için bekletildi. Bloklama solüsyonu içeren steril bir petri kabına daldırılan membran kağıt üzerindeki kaplanmayan boşlukların bloklanması için 37^oC'de 1 saat boyunca bekletildi. Süre sonunda petri içerisine alınan membran, bol miktardaki yıkama solüsyonu ile 3 kez (her bir yıkama 5'er dk)

yıkandı. Yıkama sonrasında membranda kalan Tween-20, hazırlanan TBS solüsyonu ile 2 kez durulama yapılmak suretiyle membrandan uzaklaştırıldı. Bloklama solüsyonu içerisinde 1/2-1/128 oranında sulandırılarak hazırlanan 1,5 µl pozitif kontrol antijeni membran kağıdı üzerindeki işaretlenen yerlere damlatıldı. Oda sıcaklığında 30 dk süre ile inkübasyonu sonucunda yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı. Üretici firma tarafından membran kağıdı için belirtilen oranda (1:500) yıkama solüsyonu ile sulandırılarak hazırlanan BRV antijenine özgü anti-rotavirus HRPO konjugatı 10'ar µl miktarında tüm yüzeylere damlatıldı. Membran kağıdı, inkübasyon amacıyla oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. İnkübasyon süresinin bitiminde 3 kez yıkanan membran kağıdı havada kurutuldu. Membran kağıdı üzerindeki işaretli yerlerin tümüne 2,5 µl TMB substrat solüsyonu damlatıldı ve karanlık ortamda 5 dk süre ile bekletildi. Süre sonunda membran kağıdı musluk suyuna tutularak reaksiyon durduruldu. Havada kurutulmaya bırakılan membran kağıdı 30 dk süre ile gözlendi. Test sonuçları, membran kağıt üzerinde meydana gelen renk oluşumlarına göre göz ile değerlendirildi.

Membran yüzeyinin monoklonal antikor ile kaplanması

PEG ile konsantre BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatı ile optimizasyon sürecinde ve dışkı örnekleri ile test aşamasında monoklonal antikor ile duyarlı hale getirilen membran kağıtları kullanıldı. Bu amaçla, yukarıda belirtilen poliklonal antikorlarla gerçekleştirilen yöntemin aynısı uygulandı. Membran kağıdı üzerine damlatılacak monoklonal antikor, üretici firmanın önerisi doğrultusunda kaplama solüsyonu ile sulandırılarak kullanıldı.

2.2.14. Dışkı Örneklerinde Dot-ELISA ile BRV Varlığının Araştırılması

Dot-ELISA ile dışkı örneklerinde BRV antijen tespiti amacıyla, dama tahtası titrasyonu sonucunda belirlenen optimal monoklonal ve poliklonal antikorlarla kaplanarak hazır hale getirilen membran kağıtları kullanıldı. Araştırmada hazırlanan ELISA pleytlerinde teste tabi tutulan 100 adet dışkı örneği Dot-ELISA ile de kontrol edildi.

2.2.15. Dışkı Örneklerinde Ticari ELISA ile BRV Varlığının Araştırılması

Ticari ELISA BRV teşhis kiti, üretici firma tarafından belirtilen yönerge doğrultusunda kullanıldı. Bu amaçla, test edilecek her bir dışkı örneği çift göz olarak çalışıldı. Derin dondurucudan alınarak oda ısısına getirilen dışkı örnekleri, 1:1 hacimde sulandırma solüsyonu ile sulandırılarak önceden işaretlenen bir çift göze 100'er µl ilave edildi. Pozitif kontrol için de bir çift göz ayrılarak 100 µl bırakıldı. Test pleyti oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hazırlanan yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı ve her bir yıkama aşamasında hafifçe çalkalanan pleyt içeriği boşaltıldı. Daha sonra pleyt bir kağıt havlu üzerine ters çevrilerek bağlanmayan test materyalinin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Konjugat, daha önce hazırlanan sulandırma solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırılarak her bir göze 100'er µl ilave edildi. Pleytler, oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 3 kez yıkama işlemi tekrarlandı. Kromojen solüsyonu, substrat ile 1:20 oranında sulandırılarak her bir göze 100'er µl ilave edildi. Test pleyti, oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 10 dk süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, her bir göze 50'şer µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyonun durdurulması sağlandı. ELISA okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda elde edilen OD değerleri kit prosedüründe bulunan formüle göre değerlendirilerek sonuçlar yorumlandı.

2.2.16. ELISA Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Araştırmada ELISA OD değerlerinin istatistiksel açıdan yorumlanabilmesi amacıyla %95 güven aralığında uygulanan t- testi (Minitab®, Minitab Inc, USA) ile elde edilen istatistik verileri kullanıldı.

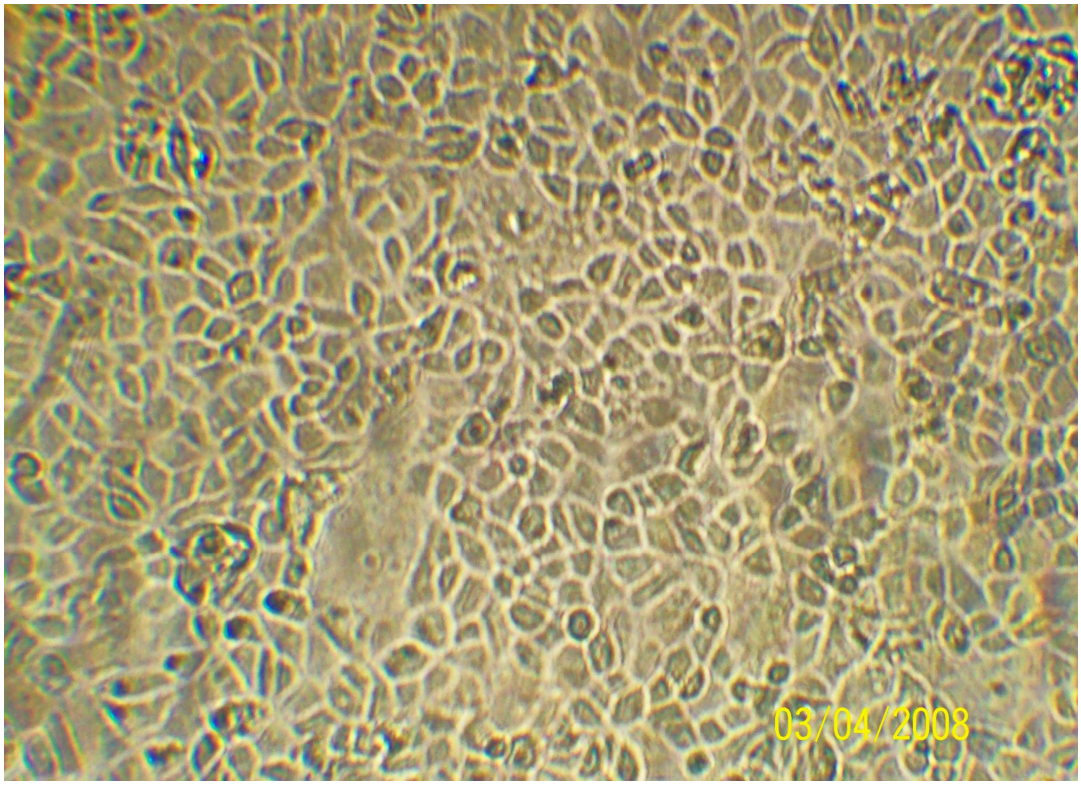
2.2.17. Testlerin Sensitivitesi ve Spesifitesi

Testlerin sensitivite, spesifite, doğruluk oranları ile pozitif ve negatif prediktif değerlerinin belirlenmesi amacıyla Martin ve ark (1994) tarafından bildirilen formüllerden yararlanıldı.

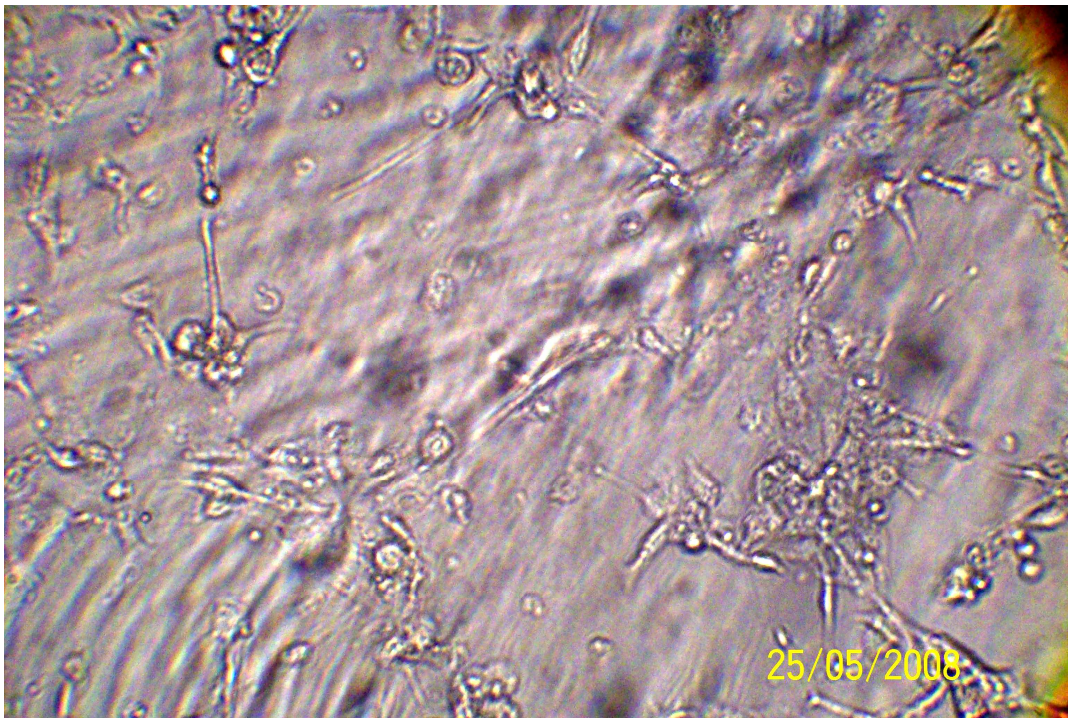
3. BULGULAR

3.1. Virus

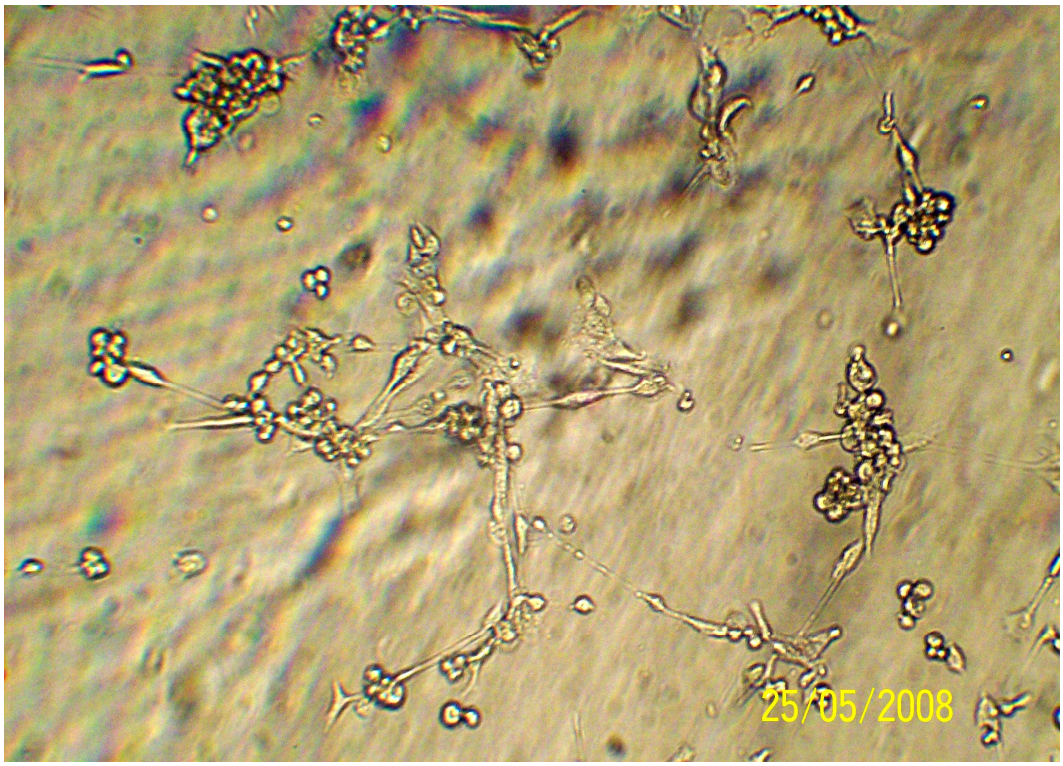
Bovine rotavirus B223 referens suşunun ve Pendik izolatının MA104 hücre kültürlerine (Resim 3.1) inokulasyonları sonucu karakteristik CPE oluşumu gözlendi. Virus ekimi yapılan tüm hücre kültürlerine 2. günden itibaren yapılan pankreatin ilavesinin virus enfektivitesini arttırdığı, kısa sürede CPE oluştuğu gözlemlendi. BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına ait CPE oluşum süreleri karşılaştırıldığında, Pendik BRV izolatı ile 4. günün sonunda CPE'ler net olarak oluşmaya başlarken, BRV B223 suşu ile bu sürenin 6. güne kadar uzayabildiği gözlendi. (Resim 3.2, 3.3). Virus inokulasyonu gerçekleştirilmeyen MA104 hücre kültürleri "hücre kontrol" olarak kullanıldı (Resim 3.1). Ayrıca BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatı inokule edilen MA104 hücre kültürlerinin Hematoksilen-Eosin (HE) yöntemi ile boyanmalarını takiben enfekte hücrelerde meydana gelen intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri belirgin olarak gözlendi (Resim 3.4).



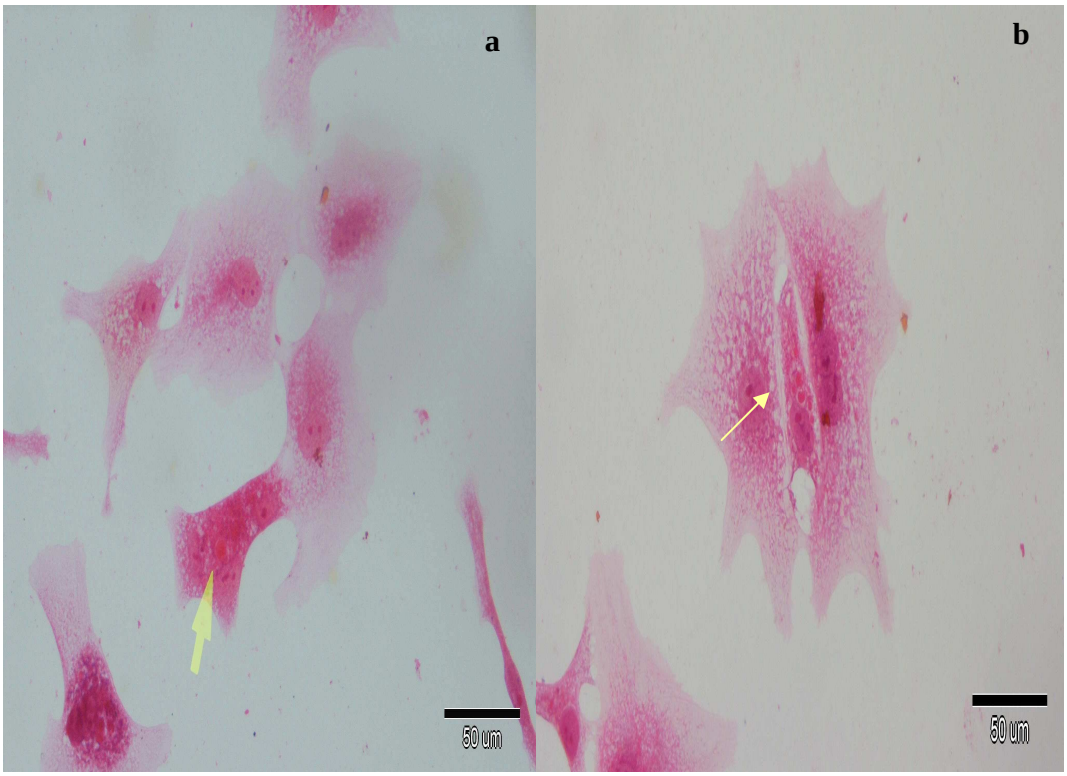
Resim 3.1. MA104 hücre kültürü kontrol (X40).



Resim 3.2. MA104 hücre kültüründe BRV B223 suşuna özgü CPE (6. gün).



Resim 3.3. MA104 hücre kültüründe Pendik BRV izolatına özgü CPE (5. gün).



Resim 3.4. İnklüzyon cisimciklerinin görünümü. a: BRV B223 suşuna özgü inklüzyon cisimcikleri. b: Pendik BRV izolatına özgü inklüzyon cisimcikleri.

3.2. Virusların Titresi

Sitopatolojik effekt yönünden 8-10 gün boyunca kontrolü yapılan 24 gözlü titrasyon pleytlerinde, 18. pasaj Pendik buzağı dışkı izolatı ve 25. pasaj BRV B223 suşu titreleri sırasıyla $DKID_{50} = 10^{-7}$ /0,2 ml ve $DKID_{50} = 10^{-6.5}$ /0,2 ml olarak tespit edildi.

3.3. Viral Antijen Protein Miktarı

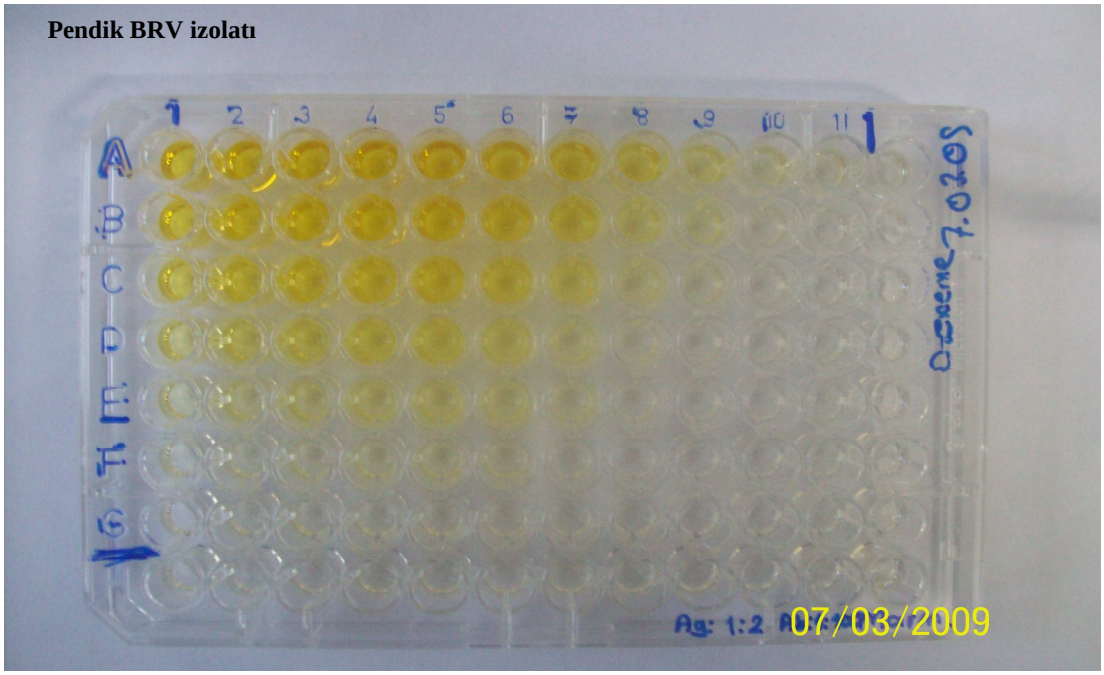
Virus inokulasyonu gerçekleştirilmiş olan hücre kültürü süpernatantlarındaki viral proteinlerin PEG ile konsantrasyonu sonucu elde edilen, ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde ve deneme hayvanlarının immunizasyon aşamalarında (EK.A) antijen olarak kullanılan solüsyonlarda, BRV B223 referens suşu için 2115 µg/ml, Pendik BRV izolatı için 1763 µg/ml miktarında viral protein belirlendi.

3.4. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon (SN_{50}) Test Sonuçları

Daha önce BRV'a karşı seronegatif olduğu belirlenen deneme hayvanlarının tümü, Pendik BRV izolatı ve BRV 223 suşu ile immunize edildikten sonra seropozitif olarak saptandı. Bu kan serumlarının, amonyum sülfat ile konsantre edilmeden önceki SN_{50} değeri dağılımları 1/11,2 -1/90 aralığında belirlendi.

3.5. ELISA ve Dot-ELISA Optimizasyon Sonuçları

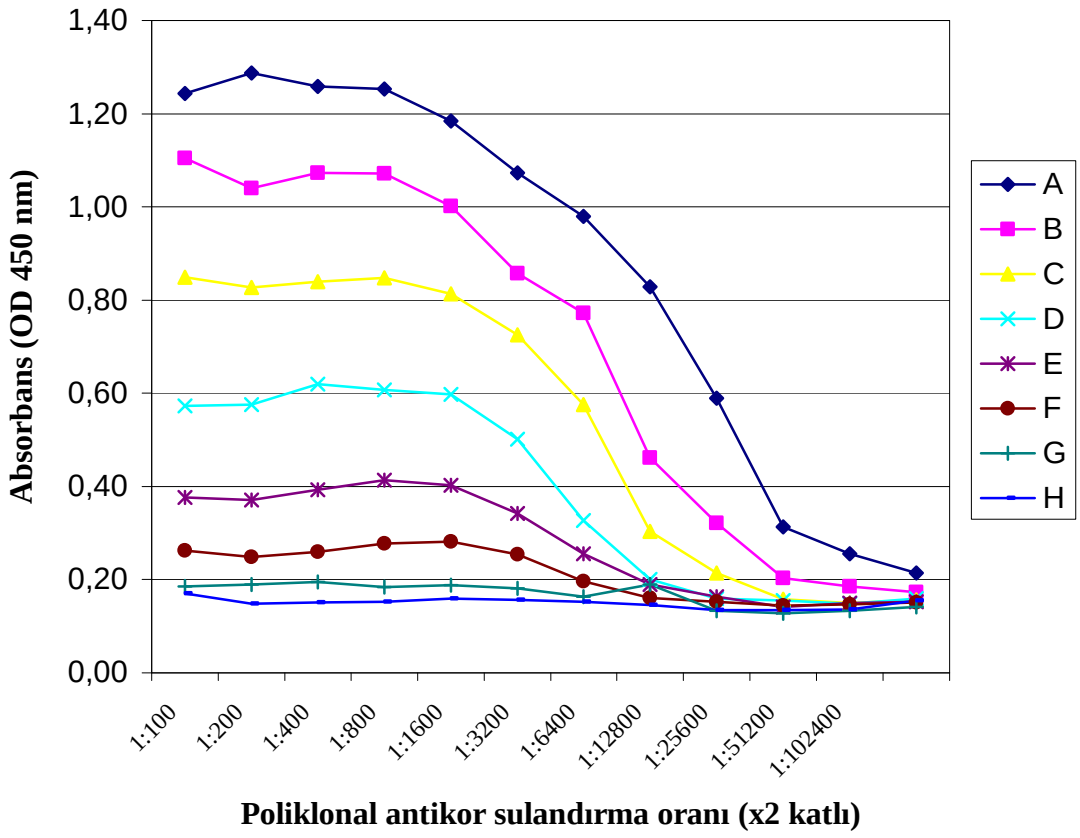
ELISA pleytlerini duyarlı hale getirmek (antikorlarla kaplamak) için kullanılacak olan optimal antikor sulandırma oranlarının; "Pendik BRV izolatına özgü adjuvantlı uygulama" (EK B) ile elde edilen poliklonal antikorlar için 1:800 (Resim 3.5, Çizelge 3.1, Grafik 3.1), monoklonal antikor için ise 1:10 000 (Çizelge 3.2, Grafik 3.2) olduğu belirlendi. Dot-ELISA membran kağıtlarını duyarlı hale getirmek için ise optimal antikor sulandırma oranlarının yine "Pendik BRV izolatına özgü adjuvantlı uygulama" (EK B) ile elde edilen poliklonal antikorlar için 1:100, monoklonal antikor için ise 1:8000 olduğu saptandı. Bu sulandırma oranlarının, test yöntemi içerisinde yapılan değişikliklere (inkübasyon süresi, bloklama solüsyon ve süresi vb) rağmen en iyi sonuçların elde edildiği sulandırmalar olduğu tespit edildi.



Resim 3.5. Poliklonal antikor kaplı mikropleytlerde Pendik BRV izolatına ait ELISA dama tahtası titrasyonu görünümü.

Çizelge 3.1. Poliklonal antikor kaplı mikropleytlerde Pendik BRV izolatına ait ELISA dama tahtası titrasyonu OD değerleri.

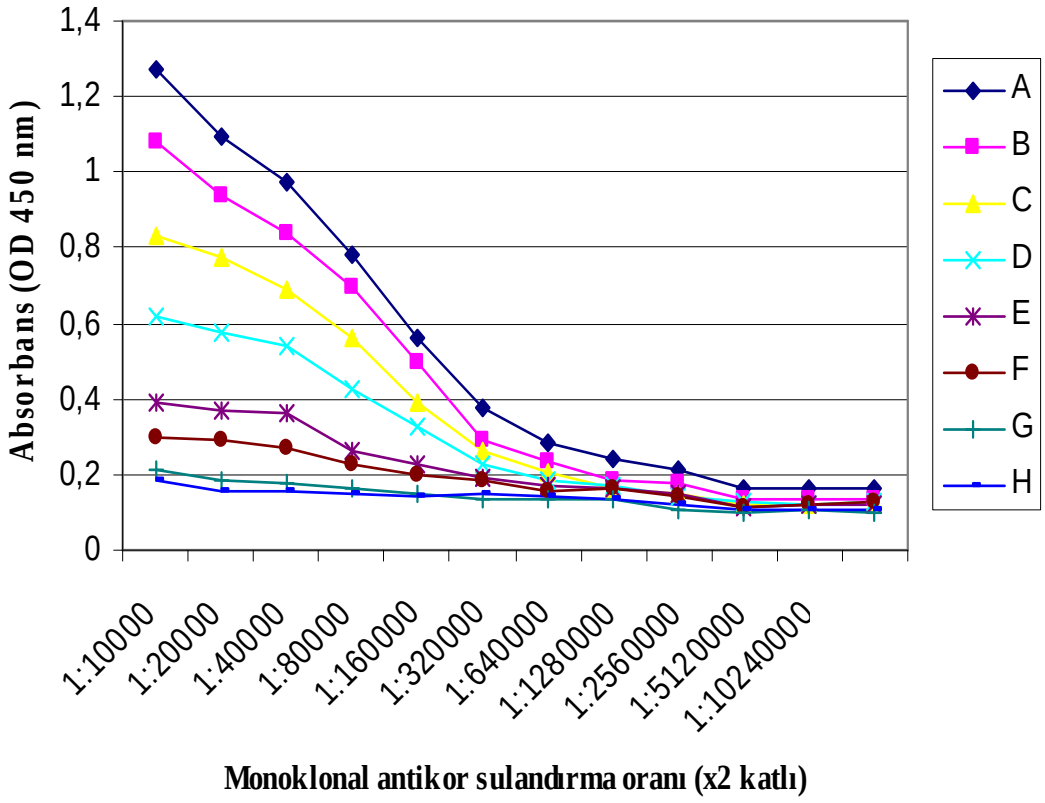
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,243	1,287	1,259	1,253	1,184	1,073	0,980	0,828	0,590	0,313	0,255	0,214
B	1,104	1,040	1,073	1,071	1,002	0,857	0,772	0,462	0,321	0,203	0,185	0,173
C	0,849	0,827	0,840	0,848	0,814	0,725	0,576	0,304	0,215	0,158	0,150	0,157
D	0,573	0,575	0,619	0,607	0,597	0,501	0,327	0,200	0,159	0,155	0,149	0,160
E	0,377	0,371	0,393	0,413	0,403	0,342	0,255	0,189	0,163	0,141	0,150	0,153
F	0,263	0,249	0,260	0,277	0,281	0,254	0,196	0,161	0,153	0,144	0,147	0,151
G	0,185	0,189	0,195	0,184	0,188	0,182	0,163	0,189	0,133	0,128	0,133	0,142
H	0,171	0,149	1,151	0,152	0,160	0,156	0,153	0,145	0,135	0,135	0,136	0,155 Blank



Grafik 3.1. Poliklonal antikor kaplı mikropleytlerde Pendik BRV izolatı OD değerleri.

Çizelge 3.2. Pendik BRV izolatı ve monoklonal antikor titrasyonuna ait OD değerleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,275	1,097	0,971	0,779	0,563	0,375	0,281	0,244	0,213	0,167	0,164	0,160
B	1,081	0,935	0,841	0,700	0,498	0,293	0,234	0,187	0,175	0,135	0,135	0,136
C	0,830	0,773	0,689	0,560	0,389	0,262	0,203	0,165	0,148	0,121	0,121	0,126
D	0,615	0,579	0,541	0,426	0,325	0,224	0,188	0,170	0,143	0,129	0,119	0,129
E	0,390	0,371	0,359	0,261	0,227	0,193	0,169	0,165	0,147	0,112	0,120	0,124
F	0,302	0,291	0,269	0,229	0,197	0,183	0,159	0,161	0,145	0,116	0,118	0,131
G	0,212	0,188	0,181	0,166	0,146	0,135	0,135	0,134	0,110	0,098	0,108	0,098
H	0,182	0,157	0,159	0,147	0,145	0,151	0,140	0,134	0,120	0,107	0,110	0,108 Blank



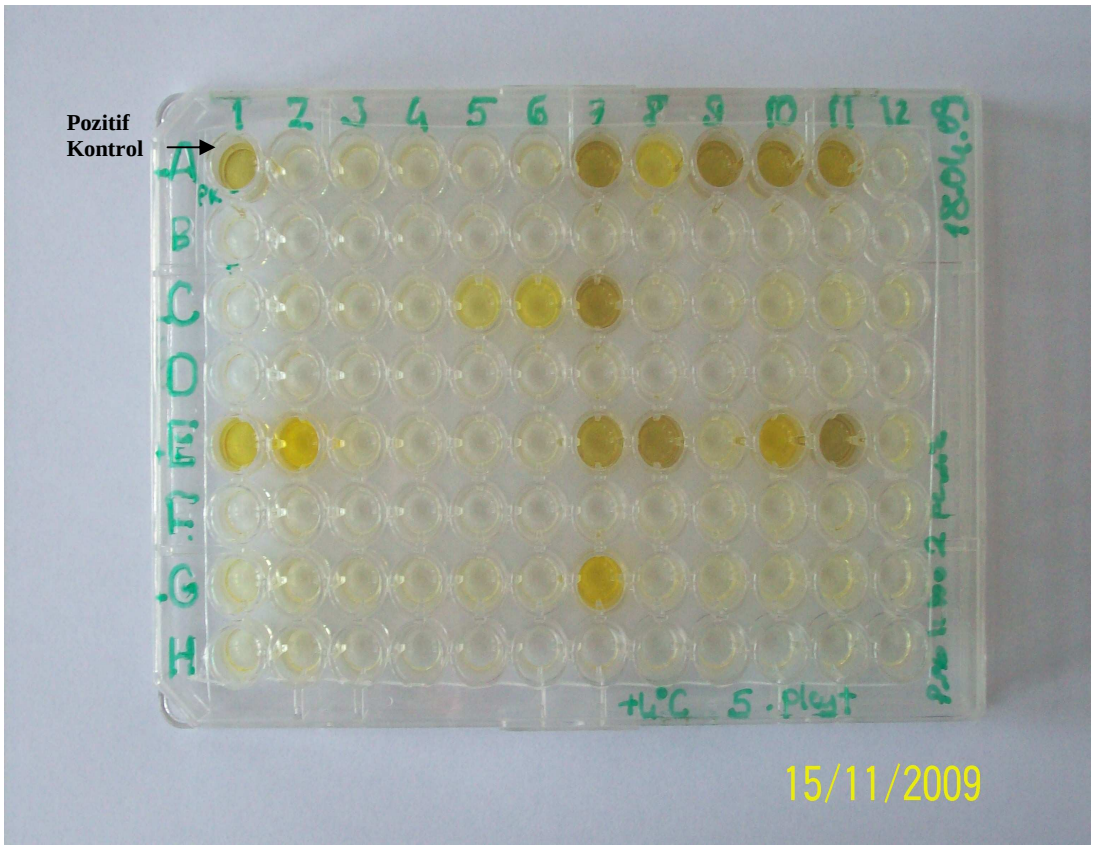
Grafik 3.2. Pendik BRV izolatı ve monoklonal antikor OD değerleri.

3.6. ELISA Sonuçları

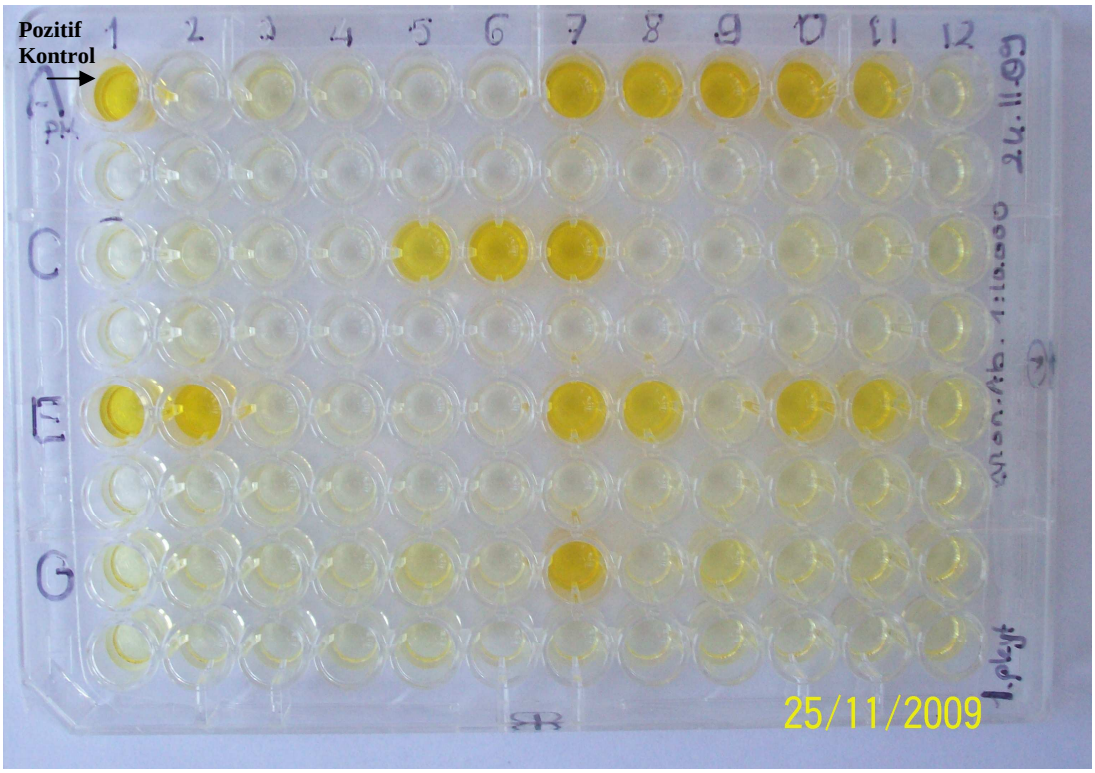
Optimizasyon sonucu en iyi sonuç alınan poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA ile BRV antijeni yönünden test edilen 100 adet dışkı örneğinden 24'ü (%24) pozitif; 76'sı (%76) negatif olarak değerlendirildi (Resim 3.6). Monoklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA ile test edilen 100 adet dışkı örneğinin 25'i (%25) pozitif; 75'i (%75) negatif olarak değerlendirildi (Resim 3.7).

3.7. Dot-ELISA Sonuçları

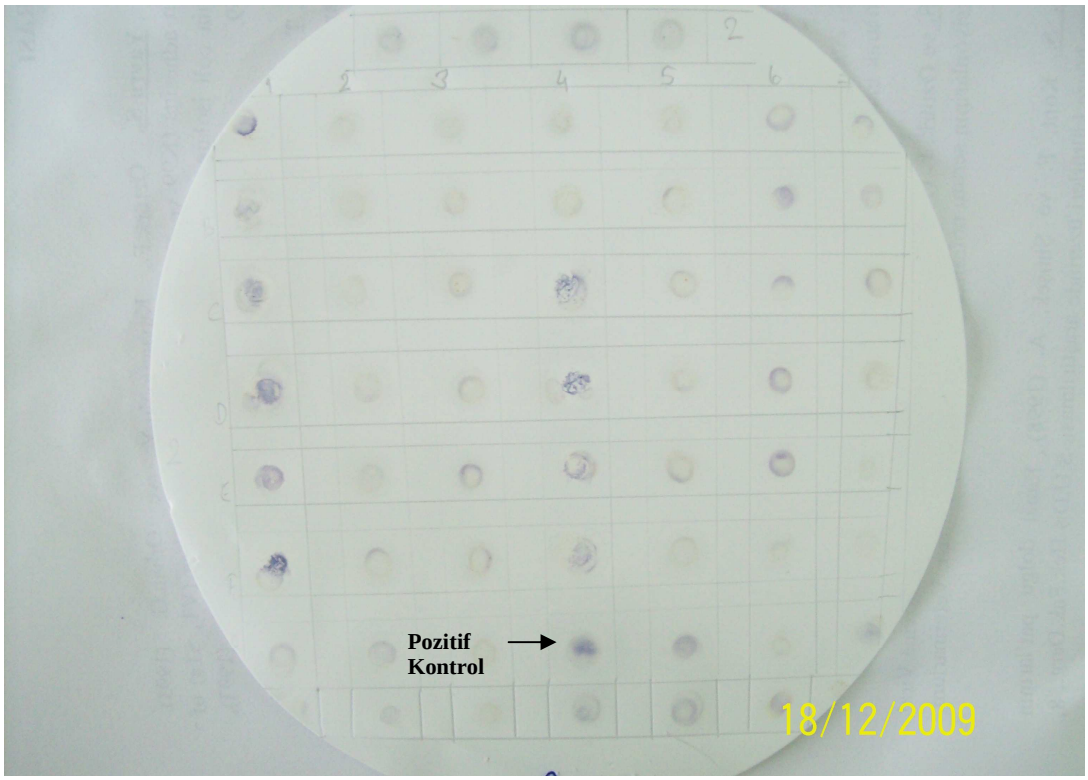
Poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile BRV antijen varlığı yönünden test edilen 100 adet dışkı örneğinin 21'i (%21) pozitif; 79'u (%79) negatif olarak belirlendi (Resim 3.8). Monoklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile test edilen 100 adet dışkı örneğinin ise 32'si (%32) pozitif; 68'i (%68) negatif olarak belirlendi (Resim 3.9).



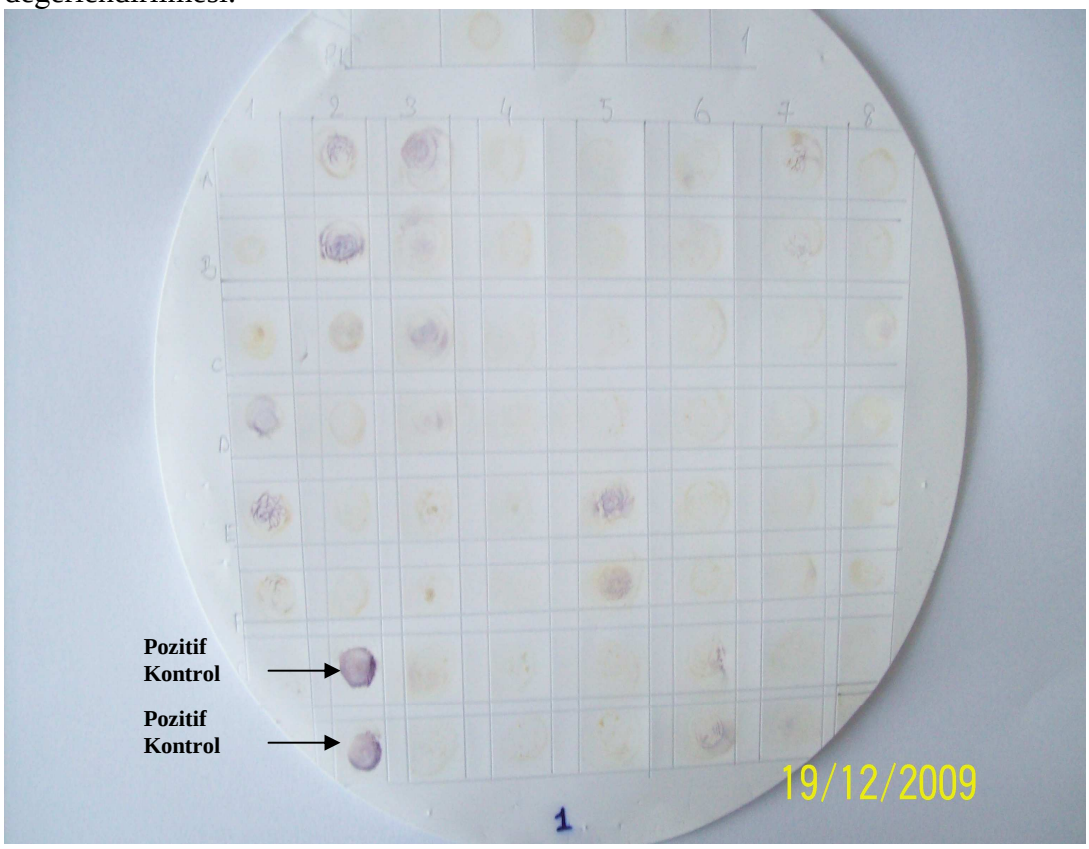
Resim 3.6. Poliklonal antikor (1:800 sulandırma) ELISA ile dışkı örneklerinin (1:4 sulandırma) değerlendirilmesi.



Resim 3.7. Monoklonal antikor (1:10 000 sulandırma) ELISA ile dışkı örneklerinin (1:4 sulandırma) değerlendirilmesi.



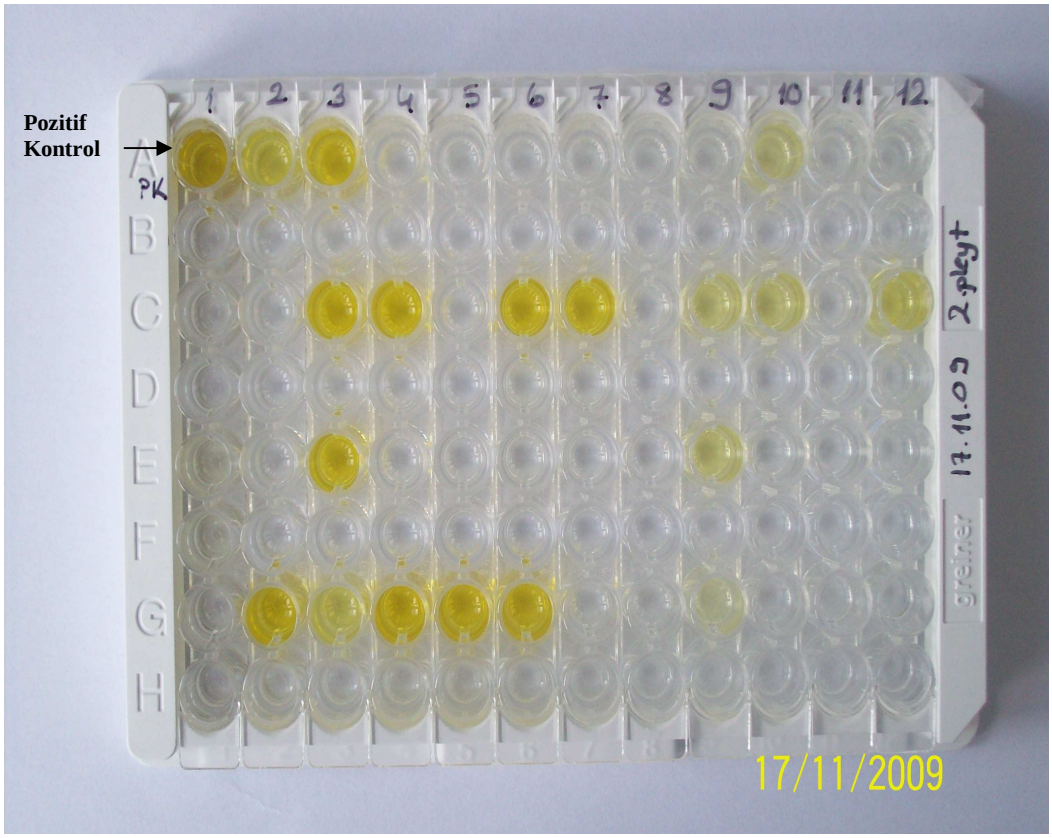
Resim 3.8. Poliklonal antikor (1:100 sulandırma) ile duyarlı hale getirilen nitroselüloz membranda (Dot-ELISA) dışkı örneklerinin (1:2 sulandırma) değerlendirilmesi.



Resim 3.9. Monoklonal antikor (1:8000 sulandırma) ile duyarlı hale getirilen nitroselüloz membranda (Dot-ELISA) dışkı örneklerinin (1:2 sulandırma) değerlendirilmesi.

3.8. Ticari ELISA Sonuçları

Ticari ELISA ile BRV varlığı yönünden test edilen 100 adet dışkı örneğinin 24'ü (%24) pozitif; 76'sı (%76) negatif olarak değerlendirildi (Resim 3.10).



Resim 3.10. Ticari ELISA ile test edilen dışkı örnekleri.

3.9. Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

ELISA, Dot-ELISA ve ticari ELISA teşhis kitine ait değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak test edilen 100 adet dışkı örneği ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3.'de özetlendi.

Çizelge 3.3. ELISA, Dot-ELISA ve ticari ELISA ile elde edilen test sonuçları.

Örnek no	ELISA (Monoklonal antikor ile duyarlı)	ELISA (Poliklonal antikor ile duyarlı)	Ticari ELISA	Dot-ELISA (Monoklonal antikor ile duyarlı)	Dot-ELISA (Poliklonal antikor ile duyarlı)
1	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	+	-
6	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	+
9	-	-	-	+	+
10	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	+	+
20	-	-	-	-	+
21	+	+	+	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+
26	+	+	+	-	-
27	+	+	+	-	-
28	+	+	+	-	-
29	-	-	-	-	-
30	+	+	+	-	-
31	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	-
33	-	-	-	+	-
34	-	-	-	+	-
35	-	-	-	+	+
36	+	+	+	+	+
37	-	-	-	+	+
38	+	+	+	-	+
39	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	-
41	-	-	-	-	-
42	+	+	+	-	-
43	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-

Çizelge 3.3 (Devam). ELISA, Dot-ELISA ve ticari ELISA ile elde edilen test sonuçları.

46	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	+
49	-	-	-	+	-
50	-	+	+	+	+
51	+	+	+	+	-
52	+	-	+	-	-
53	-	+	+	-	-
54	+	+	+	-	+
55	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-
61	-	-	-	+	-
62	+	+	+	+	-
63	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-
65	-	-	-	+	-
66	-	-	-	+	-
67	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-
70	-	-	-	+	-
71	-	-	-	-	-
72	+	+	+	+	+
73	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-
82	+	+	+	+	+
83	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	+
85	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-
87	+	-	-	-	-
88	-	-	-	+	+
89	-	-	-	+	-
90	-	-	-	+	-
91	+	-	-	-	-
92	-	-	-	+	-
93	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-
97	+	+	+	-	-
98	+	+	-	-	-
99	-	-	-	+	-
100	-	-	-	-	-

3.10. Testlerin Sensitivitesi ve Spesifisitesi

Araştırmada kullanılan tüm testlerin sensitivite ve spesifiteleri toplu olarak Çizelge 3.4. de özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Ticari ELISA referans alınarak yapılan karşılaştırma ile elde edilen toplu sensitivite ve spesifite sonuçları.

Sonuçlar	**ELISA** (Monoklonal antikor ile duyarlı)	**ELISA** (Poliklonal antikor ile duyarlı)	**Dot-ELISA** (Monoklonal antikor ile duyarlı)	**Dot-ELISA** (Poliklonal antikor ile duyarlı)
Pozitif	25	24	32	21
Gerçek pozitif	22	23	12	11
Gerçek negatif	73	75	56	66
Hatalı pozitif	3	1	20	10
Hatalı negatif	2	1	12	13
Sensitivite (%)	92	96	50	46
Spesifisite (%)	96	99	73	87
Pozitif prediktif değer (%)	88	96	37	52
Negatif prediktif değer (%)	97	99	82	83
Doğruluk (%)	95	98	68	77

4. TARTIŞMA

Gelişmiş ve gelişmekte olan pek çok ülkede sığır işletmelerine ait sürülerde özellikle yenidoğan hayvanlarda hastalığın kontrolü ve eradikasyonu açısından BRV enfeksiyonunun hızlı ve doğru teşhisi büyük önem taşımaktadır. Bugün ülkemizde ve dünya üzerindeki pek çok araştırma laboratuvarında, sahadan elde edilen diyare semptomlu buzağı dışkı örneklerinde BRV teşhisine yönelik olarak uygulanan ELISA ve Dot-ELISA sistemleri ile etkenin identifikasyonu gerçekleştirilmektedir (Hawkes 1986, Hammami ve ark 1989, Yazıcı 1992, Burgu ve ark 1995, Burgu ve ark 1999, Anand ve ark 2001, Ekik 2002, Maes ve ark 2003, Şahna ve Alkan 2003, Kelkar ve ark 2004).

Türkiye'de diyare semptomlu buzağılara ait dışkı örneklerinde hücre kültüründe BRV izolasyonu ve rotavirusun identifikasyonu, virusun hücre kültürüne olan adaptasyon zorluğu nedeniyle rutin teşhis amacıyla kullanılmayan fakat uluslararası standartlara sahip bir metottur. Ülkemizde BRV varlığı ve epidemiyolojisinin araştırılması amacıyla günümüze kadar yapılan araştırmalarda (Alkan ve ark 1992, Yazıcı 1992, Burgu ve ark 1995, Çabalar ve ark 2001, Ekik 2002, Özkul ve ark 2002, Şahna 2002, Şahna ve Alkan 2003, Tan ve ark 2007, Yavru ve ark 2008) daha çok EM, ELISA, PAGE, reverse pasif hemaglütinasyon (RPHA), floresan antikor test (FAT) metotları uygulanmıştır.

Bovine Rotavirus'un halen altın standart olarak kabul edilen hücre kültürüne ekimi ile çoğaltılması uzun bir süreç olup çeşitli sindirim enzimlerinin (pankreatin, tripsin) kültür vasatına ilavesi sonucunda virusun enfektivitesi arttırılarak gerçekleştirilmektedir. Rotavirusun hücre kültür ortamına adaptasyon güçlüğü bilinmekte olup, çeşitli araştırmacılar (Babiuk ve ark 1977, Bohl ve ark 1984, Kohno ve ark 2000, Villegas ve ark 2002, Rodriguez ve ark 2004, Fontes ve ark 2005, Gülyaz ve ark 2005) tarafından vasat ortamına ilave edilen tripsin ya da pankreatin gibi sindirim enzimleri ile BRV çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Bohl ve ark (1984) diyare semptomlu domuz yavrularından elde edilen dışkı örneklerinden rotavirus izolasyonu amacıyla MA104 ve domuz böbrek hücre kültürü (PK 15) ortamına pankreatin enzimi ilavesi ile virus'u çoğaltmışlardır. Araştırmacılar (1984) MA104 hücre kültürüne rotavirus ekimini takiben inkübasyon süresinin 2. gününde yapılan

pankreatin enzimi ilavesinin virus enfektivitesinin arttırılmasında daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada virus enfektivitesinin arttırılması amacıyla virus ekimi gerçekleştirilen MA104 hücre kültürü ortamınına her iki günde bir ayrıca pankreatin solüsyonu ilave edilmiştir. Kohno ve ark (2000), insan dışkı örneklerinden izole ettikleri rotavirusun çoğaltılması amacıyla MA104 hücre kültürü içerisindeki Eagle's minimal essential medium (MEM) ortamına 10 µg/ml tripsin enzimi ilavesi yaparak inkübasyon gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada virus çoğaltma vasatına ilave edilen pankreatin miktarı (10 µg/ml) diğer çalışmalarda ilave edilen miktarlara uygun olarak seçilmiştir. Villegas ve ark (2002) grup A UK rotavirus suşunun MA104 hücre kültürüne adaptasyonu amacıyla kullandıkları MEM (MEM) ortamına 5 µg/ml tripsin enzimi ilavesi yaparak spesifik CPE oluşumunu belirlemişlerdir. Gülyaz ve ark (2005) Trakya bölgesinde halk elinde bulunan, 0-1 aylık, diyare semptomu gösteren buzağılardan elde ettikleri dışkı örneklerinde BRV izolasyonu amacıyla virus ekimi yapılan MA104 hücre kültüründe, inkübasyonun 2. gününde yapılan 10 µg/ml pankreatin enzimi ilavesinin virusun çoğalması ve CPE odaklarının net olarak görülmesinde etkili olduğunu belirleyerek, Türkiye'de diyare semptomlu buzağı dışkısından ilk rotavirus izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar (2005), rotavirus izolasyonunda pankreatin ve tripsin enzimi içeren MA104 hücre kültürü ile yapılan kontrollü çalışmalarda, pankreatin enzimi ilavesinin tripsin enzimine göre daha güvenilir bir metot olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada, BRV B223 suşunun ve Pendik BRV izolatının çoğaltılması amacıyla, pankreatin (10 µg/ml) katkılı DMEM kullanılarak yeterli miktarda virus süspansiyonu elde edilmiştir. Bu çalışmada da birçok araştırmacının (Bohl ve ark 1984, Tsunemitsu ve ark 1991, Arias ve ark 1996, Gülyaz ve ark 2005) ortaya koyduğu gibi MA104 hücre kültürüne yapılan pankreatin enzimi ilavesinin virus enfektivitesini ve CPE oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir.

Virolojik tanı amaçlı kullanılan virus izolasyonu ve serolojik testlerden sonuç alındığı durumlarda, virus enfeksiyonu çoğunlukla klinik seyrini tamamlamış ya da iyileşme evresine (konvelesan) girmiştir (Durmaz 2001). Bu nedenle lokal bir enfeksiyon sonucunda akut seyirli bir hastalık tablosu oluşturan ve diyare sonucunda dışkı ile yüksek miktarlarda etrafa saçılan bulaşma kabiliyeti yüksek BRV etkeninin ELISA gibi hızlı ve duyarlı bir teşhis metodu ile en kısa sürede tanımlanması önemlidir. BRV'ye özgü bu lokal enfeksiyon sırasında serolojik teşhis metotları ile

antikorların tespit edilemeyecek kadar az olabileceği ve kan dolaşımında uzun süre sirküle olamayacağı da göz önünde bulundurulduğundan, indirekt teşhiste BRV'ye karşı antikor tespiti amacıyla kullanılan ELISA sistemlerinin direkt teşhiste antijen tespiti amacıyla kullanılan ELISA sistemlerine göre neden daha az kullanıldığını açıklamaktadır.

Enzyme linked immunosorbent assay, insan ve hayvanlara ait dışkı örneklerindeki rotavirus antijen varlığının tespitinde yaygın olarak kullanılan bir test tekniğidir (Yolken ve ark 1977, Gerna ve ark 1987, Iwona ve ark 1996). Ülkemizde diyare semptomlu buzağı/sığırlardan sağlanan dışkı örneklerinde BRV identifikasyonu amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda (Yazıcı 1992, Burgu ve ark 1995, Burgu ve ark 1999, Ekik 2002, Şahna ve Alkan 2003), ticari ELISA BRV teşhis kitlerinin kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmada, buzağılara ait dışkı örneklerinde BRV etkeninin teşhisinde kullanılabilen, hızlı, etkili ve ekonomik ELISA ve Dot- ELISA tekniklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu araştırmada hücre kültüründe çoğaltılarak titresi belirlenen ve PEG ile konsantre edilen viral antijenler, hem deney hayvanlarının immunizasyonunda immunojen olarak, hem de dama tahtası titrasyon testi ile yapılan değerlendirme sonucunda ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde antijen miktarının optimizasyonunda ve dışkı örneklerinin BRV varlığı yönünden test edilmesi aşamasında pozitif kontrol antijeni olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan her iki rotavirus suşuna ait yapılan titrasyon testi (Kaerber 1964) sonucunda, Pendik BRV izolatı ve BRV B223 suşu titreleri sırasıyla $DKID_{50}$ 10^{-7} /0,2 ml ve $DKID_{50}$ $10^{-6.5}$ /0,2 ml olarak belirlenmiştir. Villegas ve ark (2002) grup A UK rotavirus suşu titresini $5x10^{-7}$ $DKID_{50}$/ml olarak tespit etmişlerdir. Fontes ve ark (2005), BRV-NCDV suşu titresini $2{,}2.10^{-7}$ $DKID_{50}$/ml olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada Pendik BRV izolatı titresinin, Gülyaz ve ark (2005)'nın çalışmasında kullanılan dışkı örneklerine ait çeşitli BRV izolatlarının titrasyon değerleri ($10^{-6,25}$ $DKID_{50}$/0,2 ml, $10^{-7,0}$ $DKID_{50}$/0,2 ml, $10^{-5,5}$ $DKID_{50}$/0,2 ml, $10^{-5,75}$ $DKID_{50}$/0,2 ml, 10^{-6} $DKID_{50}$/0,2 ml) ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Bu araştırmada ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde capture (yakalayıcı) antikor olarak kullanılan poliklonal antikorları içeren antiserumlar, Yeni Zelanda ırkı tavşanların BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatı ile immunizasyonu sonrasında

elde edilmiştir. Araştırma bu yönüyle grup A, BRV UK sığır rotavirus suşuna, grup A, SA11 rotavirusa ve BRV-NCDV'ye özgü antiserum eldesi amacıyla Yeni Zelanda ırkı tavşan immunizasyonunun gerçekleştirildiği diğer çalışmalar (Anand ve ark 2001, Villegas ve ark 2002) ile benzerlik göstermektedir.

Monoklonal (Al-Yousif ve ark 2000, Fontes ve ark 2005) ve poliklonal antikor (Villegas ve ark 2002, Fontes ve ark 2005) eldesi amacıyla deney hayvanlarının immunizasyonunda immunojen olarak farklı metotlar ile konsantre edilen ya da saflaştırılan BRV-NCDV (Fontes ve ark 2005, Tsunemitsu ve ark 1990), grup A sığır UK rotavirus suşu (Villegas ve ark 2002), insan rotavirus izolatı (Kohno ve ark 2000) gibi suşlar kullanılmıştır. Bu amaçla PEG-8000 presipitasyonu ile virusun konsantre edilmesi (Al-Yousif ve ark 2000, Villegas ve ark 2002, Fontes ve ark 2005), ultrasantrifüj ile virusların çöktürülmesi (Fontes ve ark 2005), ultrasantrifüj sonrası sezyum klorür (CsCl) gradient uygulaması (Kohno ve ark 2000, Villegas ve ark 2002) ile virusun saflaştırılması ve sükroz gradient uygulaması (Anand ve ark 2001, Tsunemitsu ve ark 1990) gibi çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Villegas ve ark (2002) virus'un konsantrasyonu amacıyla kullanılan bu metotlardan PEG ile presipitasyon işleminin ultrasantrifüj ve CsCl gradient uygulamasına göre daha ekonomik olduğu ve daha hızlı sonuç alındığı belirterek, ultrasantrifüj ve CsCl gradient uygulamalarının virus partiküllerinde kayıplara ve viral enfektivitenin azalmasına neden olduğunu vurgulamışlardır. Fontes ve ark (2005) ELISA sisteminde capture antikor olarak kullanılmak üzere BRV'ye özgü monoklonal ve poliklonal antikor eldesi amacıyla PEG 8000 ile konsantre edilmesi yöntemi ve pürifikasyon yöntemini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar (2005), pürifikasyon işleminin PEG presipitasyonuna göre zaman alıcı olduğunu ve virusun yapısal bütünlüğünün bozulduğunu ve ayrıca virus enfektivitesinde kayıplar görüldüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca PEG ile viral proteinlerin presipitasyonu yönteminin pürifikasyona alternatif bir metot olarak kullanılabileceği ve PEG ile konsantre edilen viral partiküllerin poliklonal antikor ve monoklonal üretiminde dahi başarılı bir şekilde kullanılabildiği vurgulanmıştır. Bu araştırmada, ELISA ve Dot-ELISA sisteminde capture antikor olarak kullanılmak üzere hazırlanan poliklonal antikorların elde edilmesi sürecinde PEG presipitasyon yöntemi, ucuz ve pratik olmasının yanında güvenilir bir yöntem olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Poliethylen glikol presipitasyonu ile viral protein hacminin daraltılarak süspansiyondaki protein miktarının azaldığı fakat toplam aktivitenin arttırıldığı bilinmektedir (Villegas ve ark 2002). PEG presipitasyonu sonrasında konsantre edilen viral süspansiyonlardaki protein miktarındaki değişimin belirlenmesinin amacıyla farklı protein miktarı belirleme yöntemleri uygulanmıştır. ELISA sistemlerinde viral antijen olarak kullanılmak üzere MA104 hücre kültüründe çoğaltılan rotavirus stoklarına ve PEG presipitasyonu sonrasında konsantre edilen virus süspansiyonlarına ait protein konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla, bradford metodu (Villegas ve ark 2002), Lowry metodu (Kelkar ve ark 2004, Tsunemitsu ve ark 1990), ticari protein tespit kiti (Fontes ve ark 2005), biüret reaksiyonu (Lopez ve ark 1988) gibi yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmada PEG presipitasyonu sonrasında konsantre edilen viruslara ait protein miktarındaki değişimin belirlenmesi amacıyla biüret reaksiyonu ile sonuç veren ticari protein tespit kiti kullanılarak elde edilen viral protein miktarları belirlenmiştir.

Bovine Rotavirus'a özgü poliklonal ya da monoklonal antikor elde edilmesi aşamasında bu güne kadar farklı immunizasyon metotları uygulanmıştır (Gary ve ark 1982, Greenberg ve ark 1983a, 1983b, Sonza ve ark 1983, Kang ve Saif 1991, Cornaglia ve ark 1993, Giammarioli ve ark 1996, Al-Yousif ve ark 2000, Villegas ve ark 2002, Fontes ve ark 2005). Anand ve ark (2001) tarafından, SA-11 rotavirus suşuna özgü antiserum eldesi amacıyla Yeni Zelanda ırkı tavşanlara yapılan immunizasyon aşamasında, ilk enjeksiyonda pürifiye edilen virus ve Freund'un tam adjuvantı karışımı subkutan yoldan inokule edilmiş, 1 ay sonra Freund'un tam olmayan adjuvant ve virus karışımını subkutan yoldan enjekte edilmiştir. Bir hafta sonra PBS içerisindeki virus kas içi yoldan uygulanmış ve son uygulamadan 14 gün sonra kan alınarak serum elde edilmiştir. Villegas ve ark (2002) grup A sığır UK rotavirus suşuna özgü antiserum eldesi amacıyla Yeni Zelanda ırkı tavşanların immunizasyonunda, ilk enjeksiyonda pürifiye edilen virus (50 µg/kg) ve Freund'un tam adjuvantı karışımını subkutan yoldan inokule etmişlerdir. İlk enjeksiyondan 25 gün sonra Freund'un tam olmayan adjuvant ve virus karışımını subkutan olarak inokule etmişlerdir ve bu uygulama 15 gün aralıklarla, 2 kez tekrar edilmiş ve sonrasında kan alınarak serum elde edilmiştir. Fontes ve ark (2005) BRV-NCDV suşuna özgü poliklonal antikor eldesi amacıyla dişi Yeni Zelanda tavşanlarına BRV ile Freund'un adjuvant karışımını deri altı enjekte ederek 20 gün sonra Freund'un

tam olmayan adjuvantı ile immunizasyon tekrarı gerçekleştirmişlerdir ve bu uygulamayı 20 gün aralıklar ile 2 kez tekrar ederek tavşanlardan kan alımını gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, spesifik antikor elde etmek amacıyla iki gruba ayrılan tavşanlardan 1. grup tavşanların immunizasyonunda immunojen olarak MA104 hücre kültüründe çoğaltılan rotavirus hücre süspansiyonları ve ayrıca PEG presipitasyonu ile konsantre edilen viruslar kullanılmıştır. İkinci grup tavşanların immunizasyonunda, MA104 hücre kültüründe çoğaltılan rotavirus süspansiyonları ile Freund'un tam ve tam olmayan adjuvantlarına ait karışım uygulanmıştır. Araştırmada, tüm immunizasyonlar subkutan yoldan enjeksiyon yöntemiyle uygulanmıştır. Belirtilen uygulamalarda elde edilen serumlardaki rotavirus'a spesifik antikor etkinliğinin araştırılması amacıyla, Ouchterlony çift diffüzyon testi (Anand ve ark 2001), ELISA (Al-Yousif ve ark 2000, Villegas ve ark 2002, Fontes ve ark 2005), serum nötralizasyon testi (Fontes ve ark 2005), plak redüksiyon nötralizasyon testi (Villegas ve ark 2002), western blot analizi (Villegas ve ark 2002, Fontes ve ark 2005) gibi yöntemler uygulanmıştır. Bu çalışmada immunizasyon sonrasında tavşanlardan alınan kan serumlarındaki BRV spesifik antikorların etkinliğinin araştırılması amacıyla, immunizasyon sonrasındaki pozitif serum örneklerine serum nötralizasyon testi (SN_{50} testi) uygulanmıştır. SN_{50} testi sonucunda Pendik BRV izolatına özgü serum antikor düzeyi 1/11,2, BRV B223 suşuna özgü serum antikor düzeyi 1/90 olarak saptanmıştır. Bu araştırmada, Pendik BRV izolatına özgü serum antikor düzeyinin BRV B223 suşuna özgü antikor düzeyinden daha düşük bir seviyede olduğu tespit edilmiştir. Nötralizasyon testi ile elde edilen bu sonuç, BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına özgü poliklonal antikorlar ile duyarlı hale getirilerek uygulanan ELISA ile dama tahtası titrasyon testleri ile elde edilen antikor sulandırma değerleri ile paralellik göstermektedir. BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatına özgü poliklonal antikora ait sulandırma oranının (1:1600), Pendik BRV izolatına özgü poliklonal antikor sulandırma oranına (1:800) göre daha yüksek bir seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Brandt ve ark'na (1981) göre, ELISA sensitivitesi kullanılan poliklonal antikorların kalitesine ve özgüllüğüne bağlıdır. İmmunizasyon sonrasında elde edilen serumdan rotavirus'a özgü poliklonal antikor eldesi amacıyla amonyum sülfat presipitasyonu (Habeeb ve Francis 1976, Anand ve ark 2001, Tsunemitsu ve ark 1990), diyaliz (Anand ve ark 2001), affinite kromotografi ile antiserum içeriğindeki

IgG fraksiyonlarının saflaştırılması (Villegas ve ark 2002) gibi uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Konsantre edilen antikorlar ya da pürifiye anti-rotavirus immunglobulinleri (IgG), rotavirus teşhisi amacıyla geliştirilen çeşitli ELISA (Villegas ve ark 2002, Tsunemitsu ve ark 1990) ve Dot-ELISA (Anand ve ark 2001) sistemlerinde primer (Anand ve ark 2001) ya da capture antikor (Villegas ve ark 2002, Tsunemitsu ve ark 1990) olarak kullanılmıştır. Anand ve ark (2001) SA-11 rotavirus suşuna özgü antiserum eldesi amacıyla Yeni Zelanda ırkı tavşanlara yapılan immunizasyon sonrasında elde ettikleri hiperimmun seruma, doymuş amonyum sülfat (%50) solüsyonu ile presipitasyon ve diyaliz işlemi uyguladıktan sonra selülöz kolona yükleyerek antikorları saflaştırmışlardır. Saf hale getirilen antikorlar, nitroselüloz membran üzerine damlatılan dışkı örneklerinde rotavirus varlığının tespiti amacıyla geliştirilen Dot-ELISA sisteminde primer antikor olarak kullanılmıştır. Bu araştırmada, BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatı ile tavşan immunizasyonu sonucunda elde edilen ve geliştirilen ELISA sistemlerinde capture antikor olarak kullanılan poliklonal antikor içeren antiserumlar amonyum sülfat presipitasyon metodu ile konsantre edilerek diyaliz işlemi uygulanmıştır.

Laboratuvarda geliştirilen çeşitli ELISA sistemleri ile BRV teşhisinin gerçekleştirildiği çalışmalarda (Hammami ve ark 1989, Anand ve ark 2001, Kelkar ve ark 2004) ortaya konulan sonuçlara göre test sistemlerinde kullanılan katı fazın seçimi ve uygun reagent seçiminin önemli olduğu belirtilmiştir. ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde antijen veya antikoru katı faza bağlamak için polistrin, propilen, polivinil ve nitroselüloz membran kağıdı gibi çeşitli taşıyıcı yüzeylerin kullanıldığı bilinmektedir. Polistrin ELISA mikropleytlerinin polivinil pleytlere göre daha duyarlı olduğu, polivinil pleytlerin göz ile yapılan değerlendirmelerde yüksek background oluşumundan dolayı uygun olmadığı tespit edilmiştir (Voller ve ark 1979). Bugüne kadar yapılan çeşitli araştırmalarda (Ellens ve Leeuw 1977, Hammami ve ark 1989, Al-Yousif ve ark 2000, Anand ve ark 2001) dışkı örneklerinde rotavirus teşhisi amacıyla, BRV'ye spesifik poliklonal/monoklonal antikorlar ya da rotavirus antijeni ile duyarlı hale getirilen polystren mikropleyt ya da nitroselüloz membranlar kullanılmıştır. Bu araştırmada, dışkı örneklerinde BRV teşhisi amacıyla monoklonal ve poliklonal antikorlar ile duyarlı hale getirilen ELISA sisteminde katı faz olarak yüksek bağlanma kapasitesine sahip polistrin mikropleyt

ve Dot-ELISA sisteminde ise 0,45 µm por çapına sahip nitroselüloz membran kağıtları tercih edilmiştir.

Bu araştırmada buzağı dışkı örneklerinde BRV tespiti amacıyla geliştirilen ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinin standardizasyonu için gerekli olan optimizasyon sürecinde, test sisteminde kullanılacak antikor ve antijene ait optimal miktarın belirlenmesi amacıyla pleyt/membran kağıtlarının farklı antikor sulandırmaları ile duyarlı hale getirilmesi prensibine dayalı Crowther (2009) tarafından önerilen dama tahtası titrasyonu uygulanmıştır. Bu çalışmada, ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde capture antikor olarak kullanılan antiserumun seçimi dama tahtası titrasyon testi ile belirlenerek yapılan değerlendirme sonucunda, 2. grup tavşan immunizasyonu sonucunda elde edilen Pendik BRV izolatına özgü poliklonal antikorları içeren antiserumlar, dışkı örneklerinin BRV antijenleri yönünden test edilmeleri için tercih edilmiştir. Araştırmada PEG presipitasyonu ile konsantre edilerek dama tahtası titrasyon testi yapılan değerlendirme sonucunda belirlenen Pendik BRV izolatı, dışkı örneklerinde BRV teşhisi amacıyla geliştirilen ELISA ve Dot-ELISA sisteminde pozitif kontrol antijeni olarak kullanılmıştır.

Enzyme linked immunosorbent assay sistemlerinde alkaline phosphatase (AP), β-galactosidase, urease ve (HRPO) enzimleri ve bu enzimlere ait para-nitro phenylphosphate, ortho-nitro phenyl β-galactosidase ve bromocresol purple kromojen/substrat sistemlerinden oluşan konjugatların kullanıldığı bilinmektedir (Crowther 2009). Bu çalışmada BRV teşhisi amacıyla geliştirilen her iki ELISA sisteminde ticari olarak sağlanan HRPO işaretli goat anti-BRV konjugatı kullanılmıştır. ELISA sistemlerine ait dama tahtası titrasyon testi aşamalarında, monoklonal antikor ve deney hayvanlarından elde edilen poliklonal antikor ile reaksiyon verebilen iki farklı BRV antijeninin belirlenmesi amacıyla kullanılan ticari konjugatlar üretici firma tarafından belirtilen oranlarda sulandırılarak kullanılmıştır. Crowther (2009) tarafından HRPO için kullanılması önerilen substratlar; Ortho-phenylenediamine (OPD), 2,2'-Azino diethylbenzothiazoline sulfonic acid (ABTS), 5-aminosalicylic acid (5-AS), tetramethyl benzidine (TMB)'dir. ABTS için kullanılması önerilen optimal dalgaboyu 415 nm; OPD için kullanılması önerilen dalgaboyu stop reaksiyonundan sonra 492 nm ve stop reaksiyonundan önce 420 nm; 5-AS için kullanılması önerilen dalgaboyu 492 nm; TMB için kullanılması önerilen

dalga boyu stop reaksiyonundan önce 655 nm ve stop reaksiyonundan sonra 450 nm olarak belirtilmiştir (Crowther 2009). Bu araştırmada ELISA sistemlerinde substrat olarak kullanılan TMB'nin HRPO varlığında çözünebilir mavi bir ürün oluşturduğu bilinmektedir ve bu kolorimetrik reaksiyonun göz ile değerlendirilmesi mümkündür (Crowther 2009). Bu bilgiler dikkate alınarak yapılan bu çalışmada ELISA sistemindeki reaksiyon sonucu ortaya çıkan OD değerleri, ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okutulduktan sonra değerlendirmeye alınmıştır. Dot-ELISA sistemindeki reaksiyon oluşumu göz ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada testlerin optimizasyonu sırasında gerçekleştirilen dama tahtası titrasyonu işlemi sonrasında mikropleyt gözlerinde takip edilen reagent sıralaması, insan rotavirus ve BRV teşhisi amacıyla geliştirilen monoklonal ya da poliklonal antikor ile duyarlı ELISA sisteminin uygulandığı diğer çalışmalar ile işleyiş benzerliği göstermektedir (James ve ark 1998, Kelkar ve ark 2004).

James ve ark (1998) insekt hücrelerinde çoğaltılan rekombinant VP6'yı insana ait grup C rotavirus tespiti amacıyla geliştirdikleri ELISA sisteminde viral antijen olarak kullanmışlardır. James ve ark (1998) tarafından geliştirilen ELISA sistemindeki spesifik olmayan bağlanmaların azaltılması amacıyla iki farklı deney hayvanı immunizasyonu sonucunda elde edilen antikorlar kullanılmıştır ve bu antikorlardan ilki virus yakalayıcı (capture), diğeri ise detektör (tespit edici, belirleyici) antikor rolü üstlenmektedir. Belirtilen ELISA sisteminde pleyt gözlerinin duyarlı hale getirilmesi amacıyla yakalayıcı antikor kaynağı olarak tavşan immunizasyonu sonucunda elde edilen serumlar kullanılmıştır. Aynı çalışmada, tavuklarının immunizasyonu ile yumurta sarısında yüksek miktarlarda üretilen poliklonal antikorlar da detektör antikor olarak kullanılmıştır. Bu araştırmada geliştirilen ELISA ve Dot-ELISA sisteminde pleyt gözlerinin ve membranın duyarlı hale getirilmesi amacıyla capture antikor kaynağı olarak 2. grup tavşan immunizasyonu sonucunda elde edilen serumların konsantre edilmesi sonucunda elde edilen Pendik BRV izolatına özgü poliklonal antikorlar ya da ticari VP6'ya spesifik monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Araştırmada detektör antikor olarak HRPO ile işaretli ticari goat anti-BRV-Nebraska Calf Diarrhea Virus (NCDV) poliklonal antikorları kullanılmıştır. Kelkar ve ark (2004) SA11 rotavirus suşu ile tavşan immunizasyonu öncesi ve sonrasında elde ettikleri pozitif ve negatif serum

numunelerini akut diyare belirtisi olan insanlara ait dışkı örneklerinde rotavirus tespiti amacıyla geliştirdikleri ELISA sisteminde pleyt gözlerinin duyarlı hale getirilmesinde kullanmışlardır. Belirtilen araştırmada, standart SA11 rotavirus suşu ile immunizasyon sonrasında seruma ait titrasyon değerini 1:10 000 olarak belirlemişler ve ELISA sisteminde belirtilen oranda sulandırılan pozitif ve negatif serum numuneleri kullanılmıştır. Araştırmacılar (2004), elde ettikleri pozitif ve negatif serum numuneleri (100 µl) ile duyarlı hale getirdikleri bir çift mikropleyt gözünü $+4^0$C'de bir gece boyunca inkube etmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda pleyt gözleri yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandıktan sonra tüm gözlere yıkama solüsyonu ile sulandırılarak hazırlanan %1,2 BSA ilave edilerek $+4^0$C'de 4 saat süre ile bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda 5 kez yıkanan pleytler kullanılıncaya kadar -70^0C'de muhafaza edilmiştir. Araştırmacılar (2004), pleytlerin bu haliyle 2 ay süre ile kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Test edilen dışkı örnekleri ve pozitif kontrol antjeni bir çift göze ilave edilerek inkübe edildikten sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir ekipman gerektirmeden test edilen örnekler üzerinde göz ile kantitatif bir değerlendirme yapılabilen Dot-ELISA membranlarının poşetlenerek oda sıcaklığında 1 ay kadar bekletildiğinde aktivitelerinde çok az bir kayıp olduğu, yine aynı membranların $+4^0$C'de ya da -20^0C'de bekletildiğinde bile değişiklik göstermediği üstelik bu durumun membrana ait raf ömrünün artmasını sağladığı bilinmektedir (Heberling ve Kalter 1986). Bu çalışmada monoklonal ya da poliklonal antikor ile duyarlı hale getirilen Dot-ELISA membranı raf ömrünün belirlenmesine yönelik bir araştırma gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca Dot-ELISA membran kağıtlarının bloklanması amacıyla BSA yerine daha ekonomik olan %3 süt tozu kullanılarak sonuç alınabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmada geliştirilen ELISA ile Kelkar ve ark (2004)'nın geliştirmiş olduğu ELISA karşılaştırıldığında, dışkı örneklerinde rotavirus teşhisi amacıyla geliştirilen bu iki test sisteminin, reagent sıralaması ve kullanılan bloklama solüsyonu (BSA) açısından benzer çalışma sistemi ile çalıştıkları görülmektedir. Kelkar ve ark (2004)'nın uyguladıkları ELISA inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, kullanılan reagent miktarı, yıkama işleminin tekrar sayısı, bloklanarak kullanıma hazır hale getirilen pleytlerin saklanma koşulları bakımından karşılaştırma

yapıldığında; bu çalışmada geliştirilen ELISA'nın daha hızlı tamamlanabilen ve daha ekonomik yöntemler olduğu görülmektedir. Ayrıca bu araştırmada hazırlanan pleytlerin raf ömrünün belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen testlerde, $+4^0$C'de, 10 ay süre ile muhafaza edilmeleri durumunda aktivitelerinde herhangi bir bozulma gözlenmediği saptanmıştır.

Monoklonal ve poliklonal antikorlar ile hazırlanmış ELISA uygulamalarının değerlendirilmesi aşamasında uygulanan, minimum pozitif OD değerinin belirlenmesi için elde edilen absorbans değerlerinin standardize edilmesi gerektiği bilinmektedir (Crowther 2009). Bu amaçla çalışmada, Hammami ve ark (1989), Frey ve ark (1998), James ve ark (1998) geliştirdikleri ELISA sistemlerine ait cut-off değerinin belirlenmesi aşamasındaki uygulamalarına uyumlu olarak, test edilen dışkı örneklerine ait negatif kontrol OD değer ortalamalarına negatif kontrol OD standart sapmalarının 3 katının ilave edilmesi ile elde edilen standart bir değerlendirme kriteri kullanılmıştır ve dışkı örneklerinin test edilmeleri sonucunda elde edilen değerin hesaplanan değerden daha büyük olduğu durumlarda örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Dot-ELISA uygulamasının değerlendirilmesi aşamasında dışkı örneklerinin test edildiği monoklonal ya da poliklonal antikor ile duyarlı membran gözlerinde reaksiyon sonucu oluşan renk değişikliği, pozitif kontrol antijeni bulanan göze ait reaksiyon sonucu oluşan renk ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

Dışkı örneklerinde BRV ya da rotavirus antijen tespiti amacıyla poliklonal ve monoklonal antikorlar ile duyarlı ELISA sistemlerinin geliştirildiği araştırmalarda (Christy ve ark 1990, James ve ark 1998, Al-Yousif ve ark 2000, Anand ve ark 2001, Kelkar ve ark 2004, Villegas ve ark 2002) test sonucunda elde edilen sensitivite ve spesifisitesinin belirlenmesi amacıyla çeşitli referans testler uygulanmıştır. Christy ve ark (1990) 100 adet insan dışkı örneğinde rotavirus varlığının araştırılması amacıyla monoklonal antikor temelli farklı ticari ELISA ile elde edilen sonuçları, doku kültüründe (African green monkey kidney) virus izolasyonu metodu ile elde edilen sonuçlar ile sensitivite ve spesifite bakımından değerlendirmişlerdir. Doku kültüründe virus izolasyonu metodu referans alınarak yapılan karşılaştırmanın sonucunda, monoklonal antikor temelli ticari ELISA ile %94 sensitivite ve %95 spesifite oranı tespit etmişlerdir. Christy ve ark (1990)'na göre, yenidoğanlar ve genç çocuklara ait rotavirus etkeninin tespiti amacıyla kullanılan doku kültürü izolasyonu

metodu tanı amacıyla tek başına kullanılabilecek bir teşhis metodu olmayıp, enfekte hücre kültüründe çok düşük oranda bir CPE'nin gözlemlendiği hücrelerdeki virus çoğalmasını tespit edebilecek ELISA gibi etkili yardımcı bir teşhis metodunun uygulanması gerekmektedir. James ve ark (1998) tarafından insana ait grup C rotavirus tespiti amacıyla geliştirdikleri ELISA, EM metodu ile karşılaştırılmış ve ELISA'nın 10 kat daha fazla duyarlı olduğu vurgulanmıştır. Kelkar ve ark (2004) tarafından geliştirilen ELISA ile %100 oranında spesifisite ve %100 oranında sensitivite tespit edilmiştir. Al-Yousif ve ark (2000) rotavirus'a karşı iki farklı klona (2B11 ve 8B4) özgü monoklonal antikorların üretimini gerçekleştirerek, sığır dışkı örneklerindeki rotavirus antijenini tespit edebilecek capture ELISA geliştirmişlerdir. ELISA ile test edilen 20 adet örneğin 18 adedi ticari antijen teşhis kiti ile BRV yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile ticari ELISA referans alınarak yapılan karşılaştırma sonucunda BRV'ye özgü monoklonal antikor 2B11 ve 8B4 klonları ile yapılan ELISA ile sırasıyla %85 ve %39 oranında sensitivite ve her iki monoklonal antikor klonu ile %100 spesifisite oranı tespit edilmiştir. Anand ve ark (2001)'nın Dot-ELISA ve RNA-PAGE tekniklerini kullanarak 396 adet insan dışkı örneğinde rotavirus varlığının araştırılması amacıyla yaptıkları değerlendirmenin sonucunda, Dot-ELISA ile test edilen örneklerin 60'ında (%15,15) RNA-PAGE ile test edilen örneklerin 65'inde (%16,41) rotavirus antijen varlığı bildirmişlerdir. RNA-PAGE tekniği referans alınarak yapılan karşılaştırmanın sonucunda, Dot-ELISA ile %92,30 sensitivite ve %98,73 spesifite oranı bildirilmiştir. Araştırmanın (2001) sonucunda ekonomik ve kolay bir test tekniği olarak değerlendirilen Dot-ELISA ile elde edilen yüksek spesifisite ve sensitivite oranları ile Dot-ELISA'nın sahada rotavirusun teşhisinde kullanılabilecek alternatif bir test tekniği olduğu belirtilmiştir. Villegas ve ark (2002), grup A UK rotavirus suşuna ait pürifiye virus partiküllerini kullanarak akut diyare belirtisi gösteren 500 adet çocuğa ait dışkı örneğinde rotavirus tespiti amacıyla geliştirdikleri çift antikor sandwich ELISA sonuçlarını RT-PCR referans alınarak yapılan karşılaştırma ile değerlendirmişlerdir ve yapılan değerlendirmenin sonucunda, geliştirilen ELISA ile %98,4 sensitivite oranı, %100 spesifite oranı, %100 pozitif prediktif değeri ve %97,3 negatif prediktif değeri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, test sonucunda elde edilen sensitivite ve spesifisitenin belirlenmesi amacıyla ticari ELISA referans alınarak yapılan değerlendirmenin

sonucunda, monoklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA ile %92 sensitivite oranı, %96 spesifisite oranı, %88 pozitif prediktif değeri ve %97 negatif prediktif değeri; poliklonal antikor ile duyarlı ELISA ile %96 sensitivite oranı, %99 spesifisite oranı, % 96 pozitif prediktif değeri ve %99 negatif prediktif değeri; monoklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile %50 sensitivite oranı, %73 spesifisite oranı, %37 pozitif prediktif değeri ve %82 negatif prediktif değeri; poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile %46 sensitivite oranı, %87 spesifisite oranı, %52 pozitif prediktif değeri ve %83 negatif prediktif değeri tespit edilmiştir. Bu araştırmada testler arasındaki ikili karşılaştırmalar sonucunda elde edilen doğruluk oranlarına bakıldığında, monoklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA ile %95; poliklonal antikor ile duyarlı ELISA ile %98; monoklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile %68; poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile %77 oranında bir uyum olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmada değerlendirilen test sistemleri arasında ticari ELISA ile elde edilen sonuç bakımından en yüksek uyum gösteren testin sensitivite ve spesifite oranları bakımından da yüksek değerlere sahip poliklonal antikor ile duyarlı ELISA ile belirlendiği tespit edilmiştir. Bu araştırmada monoklonal antikor ile duyarlı ELISA ile elde edilen sensitivite (%92) ve spesifisite (%96) oranları; Al-Yousif ve ark (2000) tarafından BRV'ye özgü monoklonal antikor 2B11 ve 8B4 klonları ile yapılan ELISA sonucunda elde edilen sensitivite (%85) ve spesifisite (%39) oranlarından belirgin bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Dot-ELISA'nın, BRV teşhisi amacıyla kullanılan diğer test tekniklerine göre daha ekonomik ve saha koşullarında bile BRV teşhisi amacıyla kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Hawkes 1986). Beards ve ark (1984) Dot-ELISA ile incelenen dışkılardaki rotavirus grup antijenlerinin sadece yüksek titrelerdeki poliklonal antikor varlığı ile tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada Beards ve ark (1984)'nın bulgularına uyumlu olarak, ticari ELISA sonucunda yüksek OD değerleri veren bazı dışkı örneklerinin Dot-ELISA ile zayıf reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Araştırmada monoklonal ve poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA ile belirlenen hatalı pozitif değer oranları sırasıyla %3 ve %1 düzeyinde iken; monoklonal ve poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile belirlenen hatalı pozitif değer oranları sırasıyla %10 ve %20 olarak tespit edilmiştir. Bu araştırmada Dot-ELISA ile elde edilen hatalı pozitiflik oranları,

Brandt ve ark (1981) ve Anand ve ark (2001) tarafından ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde elde edilen %73 ve %0,75 oranında hatalı pozitif reaksiyon bulgularına ait değerler ile paralellik göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada Dot-ELISA'nın sahada kullanılabilecek pratik bir test olmasına rağmen, diğer testlere göre hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuç verme olasılığının oldukça yüksek olduğu, sensitivite ve spesifisitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bovine Rotavirus'un hızlı teşhisine yönelik olarak hazırlanmış ELISA kitleri ve teknolojiye uyumlu yüksek duyarlılığa sahip pek çok test metodu vardır fakat pek az test tekniği uygulama kolaylığı, duyarlılık, özgüllük, hız ve ekonomi şartlarının tümünü birden sağlayabilmektedir.

Bu çalışmada uluslararası standart bir metot olan hücre kültüründe adaptasyon zorluğu bilinen BRV, inokule edildiği pankreatinli vasat ortamında başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Hücre kültüründe çoğaltılması sağlanan BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatı içeren hücre kültürü supernatantları antiserum eldesi amacıyla tavşan immunizasyonunda kullanılmıştır.

Hücre kültüründe çoğaltılan BRV B223 suşu ve Pendik BRV izolatı PEG presipitasyonu sonucunda konsantre edilerek poliklonal antikor eldesi amacıyla tavşan immunizasyonunda ve dama tahtası titrasyonu sonucunda optimum sulandırma oranları belirlendikten sonra ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde pozitif kontrol antijeni olarak kullanılmıştır.

Deney hayvanı immunizasyonu sonucunda elde edilen antiserumlar, amonyum sülfat presipitasyonu ve diyaliz işlemleri ile konsantre edilmiştir. Elde edilen poliklonal antikorlar ve ticari olarak sağlanan anti-VP6 monoklonal antikor ile dama tahtası titrasyonu uygulaması sonucunda optimum sulandırma oranları belirlendikten sonra, ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinde pleyt ya da membran gözlerinin duyarlı hale getirilmesinde capture antikor olarak kullanılmıştır.

Araştırmada hazırlanan ELISA sistemlerinin ticari ELISA referans alınarak yapılan karşılaştırmaları sonucunda testlere ait sensitivite, spesifisite, uyum, pozitif ve negatif prediktif değerleri belirlenmiştir. Özellikle monoklonal ve poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA ve ticari ELISA arasında sırasıyla, %95 ve %98 gibi yüksek bir oranda uyum tespit edilmiştir. Monoklonal ve poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ve ticari ELISA arasında ise %77 ve %68 gibi daha düşük oranda bir uyum tespit edilmiştir. Testlere ait hatalı pozitiflik oranları incelendiğinde, monoklonal ve poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA ile sırasıyla, %3 ve %1; monoklonal ve poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan Dot-ELISA ile sırasıyla, %20 ve %10 oranları belirlenmiştir.

Bu çalışmada poliklonal antikor kullanılarak hazırlanan ELISA'nın %98 uyum ve %1 oranında hatalı pozitiflik değeri ile ticari ELISA BRV teşhis kitine alternatif olarak kullanılabilecek bir test sistemi olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu araştırmanın başlangıcında arzu edilen özgüllük ve hassasiyette, tekrarlanabilir, standardize edilmiş bir ELISA sistemi geliştirilmiştir. Yurt dışında gerçekleştirilen çalışmalarda buzağı/sığır dışkı örneklerinde BRV etkeninin direkt teşhisi amacıyla farklı ELISA ve Dot-ELISA teknikleri geliştirilmiş olup, ülkemizdeki BRV teşhisine yönelik araştırmalarda uygulanan ticari ELISA teknikleri göz önünde bulundurulduğunda bu çalışma ile benzer nitelikte bir araştırma bulunmamaktadır.

BRV teşhisi amacıyla sahadan elde edilen dışkı örneklerine uygulanabilecek daha kapsamlı moleküler çalışmalar ile örneklere ait serotip ve genotip belirlemesi sonucunda geliştirilen ELISA sistemlerinin daha hassas ve etkili olacağı düşünülmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bovine Rotavirus Enfeksiyonlarının Çabuk Teşhisinde Kullanılmak Üzere ELISA ve Dot-ELISA Sistemlerinin Geliştirilmesi

Serpil YANBAKAN

Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2010

En önemli viral gastroenterit etkenlerinden BRV, sığırlarda ekonomik kayıplara neden olan dünya üzerinde yaygın bir viral etkendir bu nedenle yenidoğan buzağı yaşamının ilk gününden itibaren hızlı test tekniklerinin uygulanması önemlidir. Bu araştırmada diyare semptomlu buzağı dışkı örneklerinde BRV antijenlerinin tespiti amacıyla monoklonal ve poliklonal antikor ile duyarlı ELISA ve Dot-ELISA geliştirilmesi hedeflenmiştir. PEG ile konsantre edilen BRV izolatı ELISA sistemlerinde pozitif kontrol antijeni olarak kullanılmıştır. Amonyum sülfat presipitasyonu ve dialize edilen tavşan antiserumu (anti-BRV poliklonal antikoru) ve ticari olarak sağlanan anti- VP6 monoklonal antikoru, ELISA sistemlerinde 100 adet dışkı örneğinin BRV antijen varlığı yönünden test edilmesi aşamasında capture antikor olarak kullanılmıştır. ELISA ve Dot-ELISA sonuçları ticari ELISA sonuçları ile sensitivite ve spesifite bakımından karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; monoklonal ve poliklonal antikor ile duyarlı ELISA ile %92 ve %96 sensitivite; monoklonal ve poliklonal antikor ile duyarlı ELISA ile %96 ve %99 spesifisite elde edilmiştir. Poliklonal antikor ile duyarlı ELISA sensitivite ve spesifisitesinin monoklonal antikor ile duyarlı ELISA sensitivite ve spesifisitesinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Poliklonal antikor ile duyarlı ELISA pozitif (%96) ve negatif (%99) prediktif değerlerinin, monoklonal antikor ile duyarlı ELISA pozitif (%88) ve negatif (%97) prediktif değerlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Monoklonal ve poliklonal antikor ile duyarlı Dot-ELISA ile %50 ve %46 sensitivite; monoklonal ve poliklonal antikor ile duyarlı ELISA ile %73 ve %87 spesifisite elde edilmiştir. Poliklonal antikor ile duyarlı Dot-ELISA pozitif (%52) ve negatif (%83) prediktif değerlerinin, monoklonal antikor ile elde edilen pozitif (%37) ve negatif (%82) prediktif değerlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Dot-ELISA sensitivite, spesifisite, pozitif ve negatif prediktif değerlerinin ELISA ile elde edilen değerlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, BRV teşhisi amacıyla geliştirilen monoklonal ve poliklonal antikor ile duyarlı ELISA tekniğinin etkili, basit, ekonomik, hızlı, %95 ve %98 oranında doğruluk oranına sahip bir test tekniği olduğu belirlenmiştir. Araştırma, diyare semptomlu buzağılarda BRV enfeksiyon tespiti amacıyla ELISA ve Dot-ELISA sistemlerinin geliştirilmesine dair Türkiye'deki ilk çalışmadır.

Anahtar sözcükler: BRV; Dot-ELISA; ELISA; PEG; poliklonal antikor.

7. SUMMARY

Development of ELISA and Dot-ELISA Systems for the Rapid Diagnosis of Bovine Rotavirus Infections

BRV is the most important cause of viral gastroenteritis because of significant economic losses in cattle worldwide so the rapid test techniques should be delivered as early as the first few days of newborn life. The main goal of this research was to develop polyclonal and monoclonal antibody based antigen capture ELISA and Dot-ELISA for detecting BRV antigens in stool sample of diarrhoeatic calves. PEG concentrated BRV isolate was used as positive control antigen in ELISA systems. The ammonium sulphate precipatiated and dialysed rabbit antiserum (anti-BRV polyclonal antibody) and commercially available anti-VP6 monoclonal antibody was used as capture antibody in ELISA systems for detection of BRV antigen in 100 stool samples. The results were also screened by a commercial ELISA to determine the sensitivity and specificity of antigen capture ELISA and Dot-ELISA. It was evaluated that monoclonal and polyclonal antibody based antigen capture ELISA presented 92% and 96% sensitivity; monoclonal and polyclonal antibody based ELISA presented 96% and 99% specificity, respectively. The polyclonal antibody based antigen capture ELISA sensitivity and specificity were slightly superior to monoclonal antibody based antigen capture ELISA. The positive predictive (96%) and negative predictive (99%) values of the polyclonal antibody based antigen capture ELISA were slightly higher than the positive (88%) and negative predictive (97%) values of the monoclonal antibody based antigen capture ELISA. Monoclonal and polyclonal antibody based Dot-ELISA presented 50% and 46% sensitivity, respectively; monoclonal and polyclonal antibody based Dot-ELISA presented 73% and 87% specificity, respectively. The positive (52%) and negative predictive (83%) values of the polyclonal antibody based Dot-ELISA were slightly higher than the positive (37%) and negative predictive (82%) values of the monoclonal antibody based Dot-ELISA. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the Dot-ELISA was slightly lower than the antigen capture ELISA.

As a result, it is concluded that an effective, simple, economic and rapid monoclonal and polyclonal antibody based ELISA technique was developed for diagnosis of BRV with a 95% and 98% accuracy rates in any research laboratory. This is the first report of developed ELISA and Dot-ELISA systems to detect of BRV infection in diarrhetic calves in Turkey.

Key words: BRV; Dot-ELISA; ELISA; PEG; polyclonal antibody.

8. KAYNAKLAR

1. Acres SD, Saunders JR, Radostits OM. Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: the prevalence of enterotoxigenic E. coli, reo-like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds. Can Vet J. 1977;18:113-121.

2. Adah MI, Nagashima S, Wakuda M, Taniguchi K. Close Relationship between G8-Serotype Bovine and Human Rotaviruses Isolated in Nigeria. J Clin Microbiol. 2003;41:3945–3950.

3. Ahmed R, Stevens IG. Viral persistence. In: Fields BN ve ark. (2. ed) Virology. New York: Raven Press. 1990;1:241-265.

4. Akatani K, Ikegami N. Typing of fecal rotavirus specimens by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. Clin Virol. 1987;15:61–68.

5. Albert JM, Unicomb LE, Tzipori SR, Bishop RF. Isolation and serotyping of animal rotaviruses and antigenic comparison with human rotaviruses. Arch Virol. 1987;93:123-130.

6. Alkan F, Pulat H, Yazıcı Z, Burgu İ. Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon (RPHA) testi ile ishalli buzağıların gaitalarında rotavirusların tespiti. AÜ Vet Fak Derg. 1992;39:238-246.

7. Alkan F. Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. AÜ Vet Fak Derg. 1998;45:29-37.

8. Alkan F, Dağalp SB, Oğuzoğlu Ç, Yeşilbağ K. Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde erişkin sığırların rolü. AÜ Vet Fak Derg. 1999;46:85-92.

9. Alkan F, Burgu İ, Şahna KC, Çokçalışkan C. Yenidoğan buzağı ishallerine karşı ticari aşı ile aşılanan sığırlardan doğan yavrularda pasif bağışıklık düzeyi. AÜ Vet Fak Derg. 2004;51:47-53.

10. Almeida JD, Hall T, Batnavala JE, Toterdell BM, Chrystie IL. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. J Gen Virol. 1978;40:213–218.

11. Al-Yousif Y, Majhdi F, Bergstrom CC, Anderson J, Kapil S. Development, characterization, and diagnostic applications of monoclonal antibodies against bovine rotavirus. Clin Diagn Lab Immunol. 2000;7:288-292.

12. Anand T, Raju T A, Vishnu C, Rao L V, Sharma G. Development of dot-ELISA for the detection of human antivirus antigen and comparison with RNA-PAGE. Lett Appl Microbiol. 2001;32:176-180.

13. Andrews AH, Read DJ. Disease levels in calves up to fıve weeks old kept under commercial conditions and different management systems. British Cattle Veterinary Association Proceedings for 1983-1984, 1984;99-108.

14. Anthony ID, Bullivant S, Dayal S, Bellamy AR, Berriman JA. Rotavirus spike structure and polypeptide composition. J Virol. 1991;65:4334-4340.

15. Arda M. Neonatal buzağılarda ishaller ve neonatal bağışıklık. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 1988;6:143-169.

16. Arda N, Ertan H. Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması, In: Arda N, Temizkan G, editors, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. baskı, Nobel tıp kitapevi. 2004;183-193.

17. Argenzio RA. Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1985;1:461-469.

18. Arias CF, Romero P, Virginia A, Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. J Virol. 1996;70:5832–5839.

19. Aytuğ CN. Buzağılarda neonatal dönemde rastlanan paraziter hastalıkların tedavisi ve profilaksisi. Neonatal Buzağı Kayıpları Sempozyumu. SÜ Veteriner Fakültesi, Konya. 1986;75.

20. Azevedo Yuan AS, Jeong L, Gonza´lez KI, Nguyen TV, Pouly S, Gochnauer M, Zhang W, Azevedo A, Saif LJ. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. J Virol. 2005;79:5428–5436.

21. Babiuk LA, Mohammed KA, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. J Clin Microbiol. 1977;6:610–617.

22. Bachmann PA, Hess RG. Routine isolation and cultivation of bovine rotaviruses in cell culture. J Vet Res. 1981;42:2149-2150.

23. Bachmann PA, Hess R G. Local immunity in rotaviral infection. Annual Rech Vet. 1983;14:502-506.

24. Battilani M, Murgia MV, Lavazza A, Cecchinato M, Catelli E. Molecular characterization of rotavirus found during outbreaks of transmissible enteritis in grey partridge (Perdix perdix): preliminary results. Large Anim. Rev. 2003;9:111-112.

25. Baumeister BM, Castro AE, McGuire-Rodgers SJ, Ramsay EC. Detection and control of rotavirus infections in zoo animals. Dec J Am Vet Med Assoc. 1983;183:1252-4.

26. Beards GM, Pilfold JC, Thouless ME, Flewett TH. Rotavirus serotypes by serum neutralisation. J Med Virol. 1980;5:231-237.

27. Beards GM, Campbell AD, Cottrell NR. Enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. J Clin Microbiol. 1984;19:248-254.

28. Benfield DA, Stotz I, Moore R, Mc Adaragh JP. Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing. J Clin Microbiol. 1982;16:186-190.

29. Benkaddour M, Tache S, Labie C, Bodin G, Eeckhoutte M. Influence of temperature, acidity and lactic acid bacteria on the stability of rotavirus and coronavirus in milk. Review Medicine Veterinaire. 1993;144:709-716.

30. Besser TE, Gay CC, McGuire TC, Evermann JF. Passive Immunity to Bovine Rotavirus Infection Associated with Transfer of Serum Antibody into the Intestinal Lumen. J Virol. 1988;62:2238-2242.

31. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet. 1973;2:1281–1283.

32. Björkman C, Svensson C, Christensson B, de Verdier K. Cryptosporidium parvum and Giardia intestinalis in Calf Diarrhoea in Sweden. Acta Vet Scand. 2003;44:145-152.

33. Blackhall J, Bellinzoni R, Mattion N, Estes MK, La Torre JL, Magnusson G. A bovine rotavirus serotype 1: serologic characterization of the virus and nucleotide sequence determination of the structural glycoprotein VP7 gene. Virology. 1992;189(2):833–837.

34. Blood DC, Radostits OM, Handerson JA. Veterinary Medicine. Sixth Edition, Baillere, Tindal, London, UK, 1983.

35. Blowey RW. A Veterinary Book for Dairy Farmers. 2nd ed. Farming Press Ltd. Great Britain, 1993;15-77.

36. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, Bok K, Bishop RF, Conner ME. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? Lancet. 2003;362:1445–49.

37. Bohl EH, Theil KW, Saif LJ. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. J Clin Microbiol. 1984;19:105-111.

38. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastro-enteritis viruses in children. J Clin Microbiol. 1981;13:976-981.

39. Bridger JC, Woode GN. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. Br Vet J. 1975;131:528-535.

40. Bridger JC, Pedley S, McCrae MA. Group C rotaviruses in humans. J Clin Microbiol. 1986;23:760-763.

41. Bridger JC, Hall GA, Parsons KR. A study of basis of virulence variation of bovine rotavirus. Vet Microbiol. 1992;33:169-174.

42. Bridger JC. A definition of bovine rotavirus virulence. J Gen Virol. 1994;75:2807-2812.

43. Brown DWG, Beards GM, Guang-Mu C, Flewett TH. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotaviruses in humans and animals. J Clin Microbiol. 1987;25:316-319.

44. Brown DWG, Mathan MM, Mathew M, Martin R, Beards GM, Mathan VI. Rotavirus epidemiology in Vellore, South India: group, subgroup, serotype, and electropherotype. J Clin Microbiol. 1988;26:2410-2414.

45. Brunner R. Serologische Untersuchungen über das vorkommen von rota- virusinfektionen bein rind in bayem. Inaug Diss Münehen. 1978.

46. Brüssow H, Bruttin A, Marc-Martin S. Polypeptide composition of rotavirus empty capsids and their possible use as a unit vaccine. J Virol. 1990;64:3635-3642.

47. Brüssow H, Nakagomi O, Gerna G, Eichhorn W. Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. J Clin Microbiol. 1992a;30:67–73.

48. Brüssow H, Nakagomi O, Minamoto N, Eichhorn W. Rotavirus 993/83, isolated from calf faeces, closely resembles an avian rotavirus. J Gen Virol. 1992b;73:1873–1875.

49. Burgu İ, Akça Y. Sığırlarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerine çalışmalar. AÜ Vet Fak Derg. 1983;30:35-44.

50. Burgu İ, Öztürk F. Neonatal dönemdeki buzağıların viral hastalıkları, Neonatal Buzağı Kayıpları Sempozyumu. SÜ Veteriner Fakültesi, Konya. 1986;50-59.

51. Burgu İ. Özel viroloji teksiri. Ankara Üniversitesi. 1988;4.

52. Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu T. Yenidoğan ishalli buzağılarda rotavirusların EM, ELISA ve PAGE teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karekterizasyonu. AÜ Vet Fak Derg. 1995;42:491- 498.

53. Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu T, Yeşilbağ K, Oğuzoğlu Ç, Dağalp SB, Tan MT. Klinik olarak sağlıklı veya diyare semptomlu koyunlarda rotavirus enfeksiyonunun ELISA ve PAGE teknikleri ile araştırılması. AÜ Vet Fak Derg. 1999;46:143-147.

54. Burns JW, Wan Welch SK, Nakata S, Estes MK. Characterization of monoclonal antibodies to human group B rotavirus and their use in an antigen detection enzyme linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1989;27:245-250.

55. Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse RV, Anderson LJ, Greenberg HB. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. Virology. 1995;207:143–153.

56. Butler DG, Clarke RC. Diarrhoea and dysentery in calves. In: Gyles CL (ed), Escherichia coli in domestic animals and humans. CAB International, Oxon. 1994;91-116.

57. Castrucci G, Ferrari F, Frigeri F, Cilli V, Caleffi F, Aldrovani V, Rampichini L, Tangucci F. Experimental infection and cross protection in calves with cythopatic strains of bovine rotavirus. Comp Immun Microbiol Infect. 1983;6:321-322.

58. Castrucci G. Studies on neonatal calf diarrhea due to rotavirus. Selezione Veterinaira. 1988;29:861-881.

59. Chasey D, Banks J. The commonest rotavirus from neonatal lamb diarrhoea in England and Wales have atypical electropherotypes. Vet Rec. 1984;115:326-327.

60. Chauhan RS, Singh NP. Assessment of intestinal damage in rotavirus infected calves by D-xylose malabsorption test. Indian Journal of Veterinary Pathology. 1992, 16, 13–16.

61. Chauhan RS, Singh NP. Epidemiology of rotavirus infection in calves in India. Int J Anim Sci. 1996;11:221-223.

62. Christy C, Vosefski D, Madore P. Comparison of three enzyme immunoassays to tissue culture for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis in infants and young children. J Clin Microbiol. 1990;28:1428-1430.

63. Christensen ML. Human viral gastroenteritis. Clin Microbiol Rev. 1989;2:51-89.

64. Ciarlet M, Estes MK, Barone C, Ramig RF, Conner ME. Analysis of host range restriction determinants in the rabbit model: comparison of homologous and heterologous rotavirus infections. J Virol. 1998a;72:2341– 2351.

65. Ciarlet M, Crawford SE, Barone C, Bertolotti-Ciarlet A, Ramig RF, Estes MK, Conner ME. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. J Virol. 1998b;72:9233– 9246.

66. Ciarlet M, Gilger MA, Barone C, McArthur M, Estes MK, Conner ME. Rotavirus disease, but not infection and development of intestinal histophatological lesions, is age-restricted in rabbits. Virology. 1998c;251:343–360.

67. Ciarlet M, Estes MK, Conner ME. Simian rhesus rotavirus (RRV) is a unique heterologous (non-lapine) rotavirus strain capable of productive replication and horizontal transmission in rabbits. J Gen Virol. 2000;81:1237–1249.

68. Ciarlet M, Conner ME. Evaluation of rotavirus vaccines in small animal models. Methods Mol Med. 2000;34:147–187.

69. Ciarlet M, Conner M E, Finegold MJ, Estes MK. Group A Rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. J Virol. 2002;76:41–57.

70. Cilla G, Perez-Trallero E, Lopez-Lopategui MC, Gilsetas A, Gomariz M. Incidence, seosanality and serotypes of rotavirus in Gipuzkoa (Bsaque Country), Spain. A 14-year study. Epidemiol Infect. 2000;125:677-683.

71. Clark SM, Barnett BB, Spendlove RS. Production of high-titer bovine rotavirus with trypsin. J Clin Microbiol. 1979;9:413–417.

72. Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB., Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. J Virol. 1981;39:816–822.

73. Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherer R. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. Arch Virology. 1979;60:177-186.

74. Collery P, Bradley J, Fagan J, Jones P, Redehan E, Weavers E. Causes of perinatal calf mortality in the republic of Ireland. Irish Vet J. 1996;49:491-496.

75. Collins JE, Benfield DA, Duimstra JR. Comparative virulence of two porcine group-A rotavirus isolates in gnotobiotic pigs. Am J Vet Res. 1989;50:827-835.

76. Conner ME, Estes MK, Graham DY. Rabbit model of rotavirus infection. J Virol. 1988;62:1625–1633.

77. Conner ME, Gilger MA, Estes MK Graham DY. Serologic and mucosal immune response to rotavirus infection in the rabbit model. J Virol. 1991;65:2562–2571.

78. Conner ME, Crawford SE, Barone C, Estes MK. Rotavirus vaccine administered parenterally induces protective immunity. J Virol. 1993;67:6633–6641.

79. Conner ME, Ramig RF. Enteric diseases. In: Nathanson N, Ahmed R, Gonza´lez-Scarano F, Griffin DE, Homes KV, Murphy FA, Robinson HL editors. Viral pathogenesis. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996;713–743.

80. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Prasad BV. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. J Virol. 2001; 75:6052–6061.

81. Crawford SE, Dinesh G, Patel EC, Berkova Z, Joseph M, Hyser MC, Milton J, Finegold ME, Estes MK. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. Journal of Virology. 2006;80:4820–4832 10

82. Crouch FC, Acres SD. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. Can J Comp Med. 1984;48:340-342.

83. Crowther JR. Methods in moleculer biology. The ELISA guidebook. Second edition. International Atomic Energy Agency, Animal Production, Health Section, Vienna, Austria. 2009;516:1-574.

84. Cukor G, Blacklow NR. Human viral gastroenteritis. Microbiol Rev. 1984;48:157-179.

85. Çabalar M, Voyvoda H, Sekin S. İshalli buzağılarda rotavirusların latex aglutinasyon (LA) ve polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) teknikleri ile tanısı. 3. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 23-25 Eylül 1998, Bursa, Türkiye.

86. Çabalar M, Voyvoda H, Sekin S. Virological and serological examinations for Rotaviruses in diarrhoeic calves. YYÜ Vet Fak Derg. 2000;11:18-21.

87. Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin İH. Prevalence of rotavirus, Escherichia coli K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in Van, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2001;25:191-196.

88. Çabalar M. Van yöresindeki bazı süt sığırcılığı işletmelerinde rotavirus enfeksiyonunun serolojik araştırılması. YYÜ Vet Fak Derg. 2004;15:33-35.

89. Davidson GP, Butler DG, Hamilton JR. Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. J Clin Invest. 1977;60:1402-1409.

90. Dea S, Begin ME, Archambault D, Elazhary MAS, Roy YR. Distinct rotaviruses isolated from asymptomatic calves. Cornell Vet. 1985;75:307-318.

91. Derbyshire JB, Woode GN. Classification of rotaviruses: report from the World Health Organization/Food and Agriculture Organization Comparative Virology Program. J Am Vet Med Assoc. 1978;173:519-521.

92. Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SVS. Rotavirus diarrhea and other domestic animals. Vet res Commun. 2009, 33, 1-23.

93. Diker KS, İstanbulluoğlu E. Sağlıklı ve sürgünlü hayvanlardan C. fetus subsup. Jejuni izolasyonu üzerine çalışmalar. AÜ Vet Fak Derg. 1983;30:28- 34.

94. Dodet B, Heseltine E**,** Mary C, Saliou P**.** Rotaviruses in human and veterinary medicine. J Ark Med Soc. 1997;79**:**163-166**.**

95. Donovan GA, Dohoo LR, Montgomery DM, Bennett FL. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. Preventive Veterinary Medicine. 1998;34:31-46.

96. Durmaz R. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji. Nobel tıp kitapevi. 2001;83-95.

97. Dutil L, Fecteau G, Bouchard E, Dutremblay D, Pare J. A questionnaire on the health, management, and performence of cow-calf herds in Quebec. Canadian Vet J. 1999;40:649-656.

98. Dyall-Smith ML, Holmes IH. Sequence homology between human and animal rotavirus serotype-specific glycoproteins. Nucleic Acids Res. 1984;12:3973-3982.

99. Eiden JF, Vonderfecht S, Yolken RH. Evidence that a novel rotavirus-like agent of rats caused gastroenteritis in man. Lancet. 1985;2:8-11.

100. Eiden J, Vonderfecht S, Theil K, Torres-Medina A, Yolken RH. Genetic and antigenic relatedness of human and animal strains of antigenically distinct rotaviruses. J Infect Dis. 1986;154:972-982.

101. Ekik M. Konya Bölgesinde yenidoğan ishalli buzağılardan rotavirus antijenlerinin ELISA testi ile belirlenmesi ve annelerinden rotavirus antikorlarının tespiti. Doktora tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya. 2002.

102. Ellens D, Leeuw PW. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. J Clin Microbiol. 1977;6:530-532.

103. Elschner M, Prudlo J, Hotzel H, Otto P, Sachse K. Nested reverse transcriptase–polymerase chain reaction for detection of group A rotaviruses. J Vet Med. 2002;49:77-81.

104. Emre Z, Fidancı H. Prevalence of mix infections of Crytosporidium spp. Eschricia coli K99 and Rotavirus in the faeces of diarrhoeic and healty cattle in Ankara Turkey and in vitro resistance of Escherichia coli K99 to antimicrobial agents. Turk J Vet Anim Sci. 1998; 22:175-180.

105. Erdoğan H, Ünver A, Güneş V, Çitil M. Frequency of rotavirus and coronavirus in neonatal calves in Kars district. Kafkas Üniversitesi Vet Fak Derg. 2003;9:65-68.

106. Ernst J, Ciordia H, Stuedemann J. Coccidia in cows and calves on pasture in North Georgia (U.S.A.). Veterinary Parasitology. 1985;15:213-221.

107. Eskiizmirliler SN, Öncel T, Beyazıt A, Mısırlıoğlu ÖZ. Türkiye'nin değişik illerindeki ishalli buzağılarda rotavirus, coronavirus ve cryptosporidiosisin yayılışı. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi. 2001;1:35-42.

108. Espejo RT, Arias SC. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. J Virol. 1981;37:156–160.

109. Estes MK, Graham DY, Smith EM, Gerba CP. Rotavirus stability and inactivation. J General Virol. 1979;43:403-409.

110. Estes MK, Graham DY, Mason BB. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. J Virol. 1981;39:879–888.

111. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev. 1989;53:410-449.

112. Fenner F, Bachmann AP, Gibbs JPB, Murphy AF, Studdert JM. Veterinary virology. Academic press, Orlando, Florida, USA. 1987.

113. Feng N, Burns JW, Bracey L, Greenberg HB. Comparisons of the mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with homologous or heterologous rotaviruses. J Virol. 1994;68:7766–7773.

114. Fernandez FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, Estes MK, Saif LJ. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. Vaccine. 1998;16:507-515.

115. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fundamental virology, Third edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, USA. 1996; 1557-1565.

116. Fijtman NL, Barrandeguy ME, Cornaglia EM, Schudel AA. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. Arch Virol. 1987;96:275-281.

117. Fleming S. Enterotoxemia in neonatal calves. The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 1994;10:509-514.

118. Flewett TH, Bryden AS, Woode G N, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet. 1974a;2:61-63.

119. Flewett TH, Davies H, Bryden AS, Robertson MJ. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. J Clin Pathol. 1974b;27:608-614.

120. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. Lancet. 1975;1:4-5.

121. Flewett TH, Woode GN. The rotaviruses. Arch Virol. 1978;57:1-23.

122. Flores J, Taniguchi K, Green K, Perez-Schael I, Garcia D, Sears J, Urasawa S, Kapikian AZ. Relative frequencies of rotavirus serotypes 1, 2, 3, and 4 in Venezuelan infants with gastroenteritis. J Clin Microbiol. 1988;26:2092-2095.

123. Fontes LVQ, Campos GS, Beck PA, Camila FLB, Sardi SI. Precipitation of bovine rotavirus by polyethylen glycol (PEG) and its application to produce polyclonal and monoclonal antibodies. J Virol Methods. 2005;123:147-153.

124. Freitag H, Wetzel H, Espenkotter H. Zur prophlaxie der rota/coronavirus bedingten kalberdiarrhoea. Tierarztl Umsch. 1984;39:39-40.

125. French NP, Tyrer I, Hirst WM**.** Snallholder dairy farming in the Chikwaka communal land, Zimbabwe:birth, death and demographic trend. Preventive Veterinary Medicine. 2001;48:101-112.

126. Frey HR, Liess B. Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der mikrotiter-methode. Zbl Vet B. 1971;18:61-71.

127. Frey A, Canzio JD, Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays, J Immun Methods. 1998;221:35–41.

128. Fulton RW, Johnson CA, Pearson NJ, Woode GN. Isolation of a rotavirus from a newborn dog with diarrhea. Am J Vet Res. 1981;42:841-843.

129. Gaul SK, Simpson TF, Woode GN, Fulton RF. Antigenic relationships among some animal rotaviruses: virus neutralization in vitro and cross-protection in piglets. J Clin Microbiol. 1982;16:495-503.

130. Garcia A, Ruiz-Santa Q, Orden JA, Cid D, Sanz R, Gómez-Bautista M, de la Fuente R. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2000;23:175-183.

131. Garcia-Sanchez J, Corral C, Halaihel NG, Simn MC, Alonso JL, Muzquiz JL, Ortega C, Girones O. Survey of rotavirus infection in a dairy herd: comparison between polyacrilamide gel electrophoresis and two commercial test. Vet Microbiol. 1993;34:321-332.

132. Gerna G, Passarani N, Battaglia M, Percivalle E. Rapid serotyping of human rotavirus strains by solid-phase immune electron microscopy. J Clin Microbiol. 1984;19:273–278.

133. Gerna G, Sarasini A, Parea M, Arista S, Miranda P, Brussow H, Hoshino Y, Flores J. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. J Clin Microbiol. 1992;30:9-16.

134. Gitau GK, McDermott JJ, Waltner-Toew D, Lissemore KD, Osuma JM, Muriuki D. Factors Influencing calf morbidity and mortality in smallholder dairy farms in Kambu district of Kenya. Preventive Veterinary Medicine. 1994;21:167–177.

135. Glass RI, Keith J, Nakogomi T, Nakagomi O, Aska J, Kapikian AZ, Chanok RM, Flores J. Nucleotid sequence of structural glycoprotein, VP7 gene of nebraska calf diarrhea virus: comparison with homologous genes from four strain of human and animal rotaviruses. Virology. 1985;141:292-298.

136. Goto Y, Maga A, McCrae MA, Bataillon G. Sequential isolation of rotavirus from individual calves. Vet Microbiol. 1986;11:177-184.

137. Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Brengel-Pesce K, Soule H, Innocenti-Francillard P, Bost M, Gofti L, Zmirou D, Seigneurin JM. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. Appl Environ Microbiol. 2000;66:2690-2692.

138. Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. Infect Immun. 1983a;39:91-99.

139. Greenberg HB, Valdesuso J, Wyke K, van Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. J Virol. 1983b;47:267-275.

140. Greenberg HB, Vo PT, Jones R. Cultivation and characterization of three strains of murine rotavirus. J Virol. 1986;57:585-590.

141.Gulati BR, Nakagomi O, Koshimura Y, Nakagomi T, Pandey R. Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from Indian diarrheic cow and buffalo calves. J Clin Microbiol. 1999;37:2074-2076.

142.Gülyaz V, Hasöksüz M, Özkul A. Türkiye'de yenidoğan ishalli buzağılarda ilk rotavirus izolasyonu. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Derg. 2005;36:1-2.

143.Habeeb AF, Francis RD. Preparation of human immunoglobulin by ammonium sulfate precipitation. Vox Sanguinis. 1976;31:423-434.

144.Hafez SM, Lange S, Niebuhr L, Liess B. Serological survey for the prevalence of antibody to rotavirus bovine leukemia virus amongst buffaloes and cattle in Egypt. Bull off Inst Epiz. 1980;92:1193-1203.

145.Hammami S, Sawyer MM, Castro AE, Holmberg CA, Osbum BI. Detection of rotavirus in fecal samples from calves by a cell culture indirect immunofluorescence, an Ag-capture ELISA, a tissue culture ELISA and a commercial Ag-capture ELISA. J Vet Diagn Invest. 1989;1:72-73.

146.Hawkes R. The Dot immunobinding assay. In: Methods in Enzimology. Longone JJ, Vunakis HV, Harcourt B editors, Academic press. 1986;121:484-491.

147.Heberling RL, Kalter SS. Rapid dot-immunobinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. J Clin Microbiol. 1986;23:109-113.

148.Holland RE. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. Clin Microbiol Reviews. 1990;3:345-375.

149.Holmes IH. Viral gastroenteritis. Prog Med Virol. 1979;25:1-36.

150.Hongou K, Konishi T, Yagi S, Araki K, Miyawaki T. Rotavirus encephalitis mimicking afebrile benign convulsions in infants. Pediatr Neurol. 1998;18:354–357.

151.Hoshino Y, Baldwin CA, Scott FW. Isolation and characterization of feline rotavirus. J Gen Virol. 1981;54:313-323.

152.Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Kalica AR, Flores J, Kapikian AZ. Isolation and characterization of an equine rotavirus. J Clin Microbiol. 1983;18:585-591.

153.Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Flores J, Kapikian AZ. Serotypic similarity and diversity of rotavirus of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. J Infect Dis. 1984;149:694-702.

154.Hoshino Y, Gorziglia M, Valdesuso J, Askaa J, Glass RI, Kapikian AZ. An equine rotavirus (FI-14 strain) which bears both subgroup I and subgroup II specificities on its VP6. Virology. 1987;157:488-496.

155.Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ. Infection immunity of piglets to either vp3 or vp7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. J Virol. 1988;62:744-748.

156.Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus antigens. Curr Top Microbiol Immunol. 1994;185:179–227.

157.Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes:classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. J Health Popul Nutr. 2000;18:5-14.

158.House JA. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. J Am Vet Med Assoc. 1978;173:573-576.

159.Hurtado O, Parwani AV, Tineo A, Lucchelli A, Saif LJ. Serotypic analysis of group A bovine rotavirus field specimens using G1-, G2-, and G3-specific monoclonal antibodies in ELISA. J Vet Diagn Investig. 1995; 7:251–254.

160.Hussein AH, Cornaglia E, Saber MS, el-Azhary Y. Prevalence of serotypes G6 and G10 group A rotaviruses in dairy calves in Quebec. Can J Vet Res. 1995;59:235-237.

161.Ishizaki H, Ohta C, Shirahata T, Goto H, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. Persistence of asingle 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.

162.Ito H, Minamoto N, Hiraga S, Sugiyama M. Sequence analysis of the VP6 gene in group A turkey and chicken rotaviruses. Virus Res. 1997;47:79–83.

163.Iturriza GM, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation, J Virol. 2002;76:6596–6601

164.Iturriza GM, Desselberger U, Gray J. Molecular epidemiology of rotaviruses: genetic mechanisms associated, with diversity. In: Viral gastroenteritis. Edited by Desselberger U, Gray J. Amsterdam: Elsevier Science. 2003;317–344.

165.Iwona MD, Winiarcyzk S, Gradzki Z, Pejsak Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. Comp Immunology Microbiol and Infectious Diseases. 1996;19:219-232.

166.Jaimes MC, Feng N, Greenberg HB. Characterization of homologous and heterologous rotavirus-specific T-cell responses in infant and adult mice. J Virol. 2005;79:4568–4579.

167.James VLA, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on recombinant human group C Rotavirus inner capsid protein (VP6) to detect human group C rotaviruses in fecal samples. J Clin Microbiol. 1998;36:3178–3181.

168.Jones RC, Hughes CS, Henry RR. Rotavirus infection in commercial laying hens. Vet Rec. 1979.

169.Kaerber G. In diagnostic procedures for virus and ricettsial diseases, Public Health Ass, New York. 1964;3:48-50.

170.Kalica AR, Wyatt RC, Kapikian AZ. Detection of differences among human and animal rotaviruses, using analysis of viral RNA. J Am Vet Med Assoc. 1978;173:531-537.

171.Kalica AR, Greenberg HB, Wyatt RG, Flores JM, Sereno M, Kapikian AZ, Chanock RM. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. Virology. 1981;112:385-390.

172.Kalica AR, Flores J, Greenberg HB. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. Virology. 1983;125:194-205.

173.Kaneene JB, Hurd HS. The National Animal Health monitoring system in Michigan. I. Design, data frequencies of selected dairy cattle diseases. Prev Vet Med. 1990;8: 103–114.

174.Kantharidis P, Michael L Dyall-Smith, Tregear GW, Holmes Ian H. Nucleotide sequence of uk bovine rotavirus segment 4: Possible host restriction of VP3 genes. Virology. 1988;166: 308-315

175.Kapikian ZA, Cline WL, Mebus CA, Wyatt RG, Kalica AR, James HD, Vankirk D, Chanock RM, Kim HW. New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Lancet. 1975;1:1056-1061.

176.Kapikian ZA, Cline WL, Kim HW, Kalica AR, Wyatt RG, Vankirk DH, Chanock RM, Vaughn JA. Antigenic relationships among five reovirus-like (RVL) agents by complement fixation (CF) and development of new substitute CF antigens for the human RVL agent of infantile gastroenteritis. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1976;52:535-539.

177.Kapikian ZA, Cline WL, Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica AR, Banks CE, James HD, Flores J, Chanock RM. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. Infect Immun. 1981;33:415-425.

178.Kapikian ZA, Flores J, Hoshino Y, Glass RI, Midthun K, Gorziglia M, Chanock RM. Rotavirus: the major etiological agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination. J Infect Dis. 1986;153:815-822.

179.Kapikian ZA, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN. ve ark, 2. edition, Virology. New York: Raven Press. 1990;2:1353-1387.

180.Kelkar SD, Bhide VS, Ranshing SS, Bedekar SS. Rapid ELISA for the diagnosis of rotavirus. Indian J Med Res. 2004;11: 60-65.

181.Kim A, Nielsen PR, Hodgins D, Chang KO, Saif LJ. Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. Vaccine. 2002;20:1248-1258.

182.Kodituwakku SN, Harbour DA. Persistent excretion of rotavirus by pregnant cows. Vet Rec. 1990;126:547-549.

183.Kohara J, Hirai T, Mori K, Ishizaki H, Tsunemitsu H. Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. J Vet Med Sci. 1997;59:1023-1025.

184.Kohara J, Tsunemitsu H. Correlation between maternal serum antibodies and protection against bovine rotavirus diarrhea in calves. J Vet Med Sci. 2000;62:219-221.

185.Kohno H, Akihara S, Nishio O, Ushijima H. Development of a simple and rapid latex test for rotavirus in stool samples. Pediatrs Intern. 2000;42:395-400.

186.Kurtz JB, Lee TW, Parsons AJ. The action of alchols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. J Hosp Infect. 1980;1:321-325.

187.Lee C N, Wang Y L, Kao CL, Zao CL, Lee CY, Chen HN. NSP4 Gene Analysis of Rotaviruses Recovered from Infected Children with and without Diarrhea Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38:4471-4477.

188.Legrottaglie R, Rizzi V, Agrimi P. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1997;20:205–210.

189.Li N, Yao Y, Ou Q. Preliminary investigation of the relationship between liver lesion and relevant factors in young children with rotavirus diarrhea. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 2001;1:51–54.

190.Liu S, Offit PA, Estes MK. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. Virology. 1988;163:26-32.

191.Logan EF, Pearson GR, McNulty MS. Quantitative observations on experimental reo-like virus (rotavirus) infection in colostrum-deprived calves. Vet Record. 1979;104:206-209.

192.Lopez JW, Stanley DA, Mitchell J, Quinn M. Rotavirus and Cryptosporidium shedding in dairy calf feces and its relationship to colostrum immune transfer. J Dairy Sci. 1988;71:1288-1294.

193.Lorenz I. Diarhoea of young calf: an update. In: Proceeding of XXIVth World Buiatrics Congress, Nice, France. 2006; 130-138.

194.Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. Microbes Infect. 2001;3:1145–1156.

195.Lynch M, Lee B, Azimi P, Gentsch J, Glaser C, Gilliam S, Chang HG, Ward R, Glass RI. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. Clin Infect Dis. 2001;33:932–938.

196.Lucchelli A, Kang SY, Jayasekera MK, Parwani AV, Zeman DH, Saif LJ. A survey of G6 and G10 serotypes of group a Bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. J Vet Diagn Invest. 1994;6:175-181.

197.Maes RK, Grooms DL, Wise AG, Han C, Ciesicki V, Hanson L, Vickers ML, Kanitz C, Holland R. Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. J Clin Microbiol. 2003;41:290–294.

198.Mahy BWJ, Kangro HO. Virology methods manual. Academic press, San Diego. 1996;74-78.

199.Manteca C, Daube G, Pirson V, Limbourg B, Kaeckenbeeck A, Mainil G. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. Vet Microbiol. 2001;81:21-32.

200.Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. Vet Microbiol. 2009;4556:1-10.

201.Martin SW, Meek AH, Willeberg P. Veterinary Epidemiology. Iowa State University Pres. Third edition. Ames, 1994.

202.Matsui SM, Offit PA, Vo PT, Mackow ER, Benfield DA, Shaw RD, Padilla-Noriega L, Greenberg HB. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. J Clin Microbiol. 1989;27:780-782.

203.Matsuda Y, Nakagomi Y, Offit PA. Presence of three P types (VP4 types) and two G types (VP7 types) among Bovine rotavirus strains. Arch Virol. 1990;115:199-207.

204.Matsuno S, Inouye S, Kono R. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. J Clin Microbiol. 1977;5:1–4.

205.Matsuno S, Hasegawa A, Mukoyama A, Inouye S. A candidate for a new serotype of human rotavirus. J Virol. 1985;54:623-624.

206.Mattion NM, Bellinzoni RC, Blackhall JO, La Torre JL, Scodeller EA. Antigenic characterization of swine rotaviruses in Argentina. J Clin Microbiol. 1989;27:795-798.

207.Mattion NM, Cohen J, Estes MK. The rotavirus proteins. In: Kapikian AZ, ed. Viral Infections of the Gastrointestinal Tract, New York: Marcel Dekker, Inc. 1994.

208.McNulty MS, Allan GM, McFerran JB. Cell culture studies with a cytopathic bovine rotavirus. Arch Virology. 1977;54:201-209.

209.McNulty MS, Allan GM, Todd D, Mc Ferran JB. Isolation and cell culture propagation of rotavirus from turkeys and chickens. Arch Virol. 1979;61:13-21.

210.McNulty MS, Allan GM, Todd D, McFerran JB, McKillop ER, Collins DS, McCracken RM. Isolation of rotaviruses from turkeys and chickens: demonstration of distinct serotypes and RNA electropherotypes. Avian Pathol. 1980;9:363-375.

211.McNulty MS, Logan EF. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. Vet Rec. 1983;113:333-335.

212.Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. Univ Nebr Res Bull. 1969;233:2-15.

213.Mebus CA, Stair EL, Underdahl NR, Twiehaus MJ. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a reo-like virus. Vet Pathol. 1971a;8:490-505.

214.Mebus CA, Kono M, Underdahl NR, Twiehaus MJ. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. Can Vet J. 1971b;12:69-72.

215.Mebus CA, White RG, Bass EB, Twiehaus MJ. Immunity to neonatal calf diarrhea virus. J Am Vet Med Assoc. 1973;163:880-883.

216.Mebus CA, Wyatt RG, Sharpee RL, Sereno MM, Kalica AR, Kapikian AZ, Twiehaus MJ. Diarrhea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Infect Immun. 1976;14:471-474.

217.Mebus CA,. Wyatt RG, Kapikian AZ. Intestinal lesions induced in gnotobiotic calves by the virus of human infantile gastroenteritis. Vet Pathol. 1977;14:273-282.

218.Midthun K, Valdesuso J, Kapikian AZ, Hoshino Y, Green KY. Identification of serotype 9 human rotavirus by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1989;27:2112-2114.

219.Mickelsen WD, Evermann IF. In utero infection responsible for abortion, stillbirth, and birth of weak calves in beef cows, The Veterinary Clinics ofNorth America- Food Animal Practice. 1994;10:1-14.

220.Minamoto N, Oki K, Tomita M, Kinjo T, Suzuki Y. Isolation and characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures. Epidemiol Infect. 1988;100:481-492.

221.Mohammed KA, Saunders JR. Propagation of the rotavirus of neonatal calf diarrhea in fetal intestinal cell cultures. Can J Comp Med. 1977;41:226-229.

222.Moon HW. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. J Am Vet Med Assoc. 1978;172:443-448.

223.Mulherin E, Bryan J, Beltman M, O'Grady L, Pidgeon E, Garon L, Lloyd A, Bainbridge J, O'Shea H, Whyte P, Fanning S. Molecular characterisation of a bovine-like rotavirus detected from a giraffe. BMC Vet Res. 2008;4:46.

224.Muniiappa L, Georgiev GK, Kharalambiev KHE. Rotavirus enteritis in buffaloes. Vet Med Nauki. 1987;24:10-4.

225.Murakami T, Hirano N, Chitose K, Tsuchiya K, Ono K, Sato F, Suziki Y, Murakami Y. A survey on bovine rotavirus type-1 associated neonatal calf diarrhea in a beef herd. Jpn Vet Sci. 1987;49:23-30.

226.Murakami Y, Nishioka N, Nashiguchi Y, Kniyasu C. Primary isolation of cythopathic bovine rotaviruses in fetal monkey kidney cells. Vet Microbiol. 1981;8:135-139.

227.Murphy FA, Gibbs JEP, Horzineck CM, Studdent MJ. Veterinary virology. 3. Edition. 1999; 62-64.

228.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.

229.Nagesha HS, Holmes IH. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. J Clin Microbiol. 1988;26:171-174.

230.Nagesha HS, Holmes IH. VP4 relationships between porcine and other rotavirus serotypes. Arch Virol. 1991;116:107-118.

231.Nakagomi T, Nakagomi O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. J Virol. 1989;63:1431-1434.

232.Nakagomi O, Ohshima A, Aboudy Y, Shif I, Mochizuki M, Nakagomi T, Gottleib-Stematsky T. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. J Clin Microbiol. 1990;28:1198-1203.

233.Nava P, López S, Arias CF, Islas S, González-Mariscal L. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. J Cell Sci. 2004; 117:5509-19.

234.Nishimura S, Ushijima H, Nishimura S. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. Brain Dev. 1993;15:457–59.

235.Offit PA, Clark HF, Kornstein MJ, Plotkin SA. A murine model for oral infection with a primate rotavirus (Simian SA11). J Virol. 1984;51:233-236.

236.Offit PA, Blavat G, Greenberg HB, Clarke HF. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. J Virol. 1986;57:46-49.

237.Offit PA, Dudzik KI. Noninfectious rotavirus (strain RRV) induces an immune response in mice which protects against rotavirus challenge. J Clin Microbiol. 1989;27:885-888.

238.Ojeh CK, Snodgrass DR, Herring AJ. Evidence for serotypic variation among bovine rotaviruses. Arch Virol. 1984; 79:161-171.

239.Özkul A, Yeşilbağ K, Karaoğlu T, Burgu İ. Electrophoretyes of bovine rotaviruses detected in Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2002;26:359-362.

240.Pager C, Steele D, Gwamanda P, Driessen MA. Neonatal death associated with rotavirus infection-detection of rotavirus dsRNA in the cerebrospinal fluid. S Afr Med J. 2000;90:364-365.

241.Parwani AV, Hussein HA, Rosen BI, Luchelli A, Navarro L, Saif LJ. Characterization of field isolates of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probe. J Clin Microbiol. 1993;31:2010-2015.

242.Pedley S, Bridger JC Brown JF, McCrae MA. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. J Gen Virol. 1983;64:2093-2101.

243.Pedley S, Bridger JC, Chasey D, McCrae MA. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. J Gen Virol. 1986;67:131-137.

244.Penaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P, Taylor DN, Likanonsakul S, Saif L, Glass RI. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. J Infect Dis. 1989;160:392-397.

245.Pensaert M, Callebaut P, Cox E. Enteric coronaviruses of animals. In: Kapikian AZ. editors. Viral infections of the gastrointestinal tract. New York: Marcel-Dekker. 1994;627-696.

246.Puntel M, Fondevila NA, Blanco VJ, O'Donnell VK, Marcovecchio JF, Carrillo BJ, Schudel AA. Serological survey of viral antibodies in llamas (Lama glama) in Argentina. J Vet Med. 2002;46:157-162.

247. Radostits OM, Acres SD. The control of acute undifferentiated diarrhea of newborn beef calves. Vet Clin North Am Large Anim Pract. 1983;5:143-155.

248. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Veterinary Medicine. 8th ed. Bailliare Tindall, London. U.K. 1994;1016-1094.

249. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Tenth edition, Saunders elsevier. 2007;1294-1297.

250. Ramig RF. Genetics of the rotaviruses. Ann Rev Microbiol. 1997;51:225-255.

251. Ramos Dores AP, Stefanelli CC, Linhares REC, Brito BG, Nozawa CM. The infectivity of pig rotavirus in stools. Braz J Vet Res Anim Sci. 1998;35:84-87.

252. Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JE, Debney TG, Bunch KJ. Microbiology of calf diarrhoea in southem Britain. Veterinary Record. 1986;119:34-39.

253. Rodák L, Valicek L, Smíd B, Nevorankova Z. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces. Vet Microbiol. 2005;105:9-17.

254. Rodger SM, Holmes IH. Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. J Virol. 1979;30:839-846.

255. Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. J Clin Microbiol. 1982;16:724-726.

256. Rodgers S, Baldwin CA. Comparison of a commercial visible reaction disc enzyme immunoassay to a commercial spectrophotometric bead enzyme immunoassay and electron microscopy for the diagnosis of rotavirus in bovines. Brief Communications, J Vet Diagn Invest. 1991;3:342-343.

257. Rohwedder A, Hotop H, Minamoto N, Ito H, Nakagomi O, Brüssow H. Bovine rotavirus 993/83 shows a third subtype of avian VP7 protein. Virus Genes. 1997;14:147-151.

258. Rosales MJ, Rnedo AT, Mascaro C. Ultrastructural Details of Cryptosporidium parvum development in calf intestine. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1998;93:847-850.

259. Rossmann M G. The canyon hypothesis. Viral Immunology. 1989;2:143-161

260. Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. Role of Ca2+ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. Cell Calcium. 2000; 8:137-149.

261. Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus like particles associated with diarrhea in young pigs. J Clin Microbiol. 1980;12:105-111.

262. Saif LJ, Redman DR, Smith KL, Theil KW. Passive immunity to Bovine Rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows, Infection and Immunity. 1983;41:1118-1131.

263. Saif LF, Theil KW. Antigenically distinct rotaviruses of human and animal origin, In: Tzipori S editor, Infectious diarrhoea in the young. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands. 1985;208-214

264. Saif LJ, Terrett LA, Miller KL, Cross RF. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. J Clin Microbiol. 1988;26:1277-1282.

265. Saif LJ, Theil KW. Viral diarrheas of man and animals. CRC press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, 1990.

266. Saif LJ, Rosen BI, Parwani AV. Bovine rotavirus. In: Kapikian AZ (ed), Viral infections of the gastrointestinal tract. 2nd ed. Marcel Dekker Inc, New York. 1994;279-368.

267. Saravanan M, Parthiban M, Wilson A. Isolation of bovine rotavirus in cell culture from neonatal calves with diarrhoea. Tamilnadu J Vet Anim Sci. 2007; 3:10.

268. Sato K, Tokuhisa S, Inaba Y. Effect of enzymes on the growth of human and animal rotaviruses. J Vet Med Sci. 1995;57:569-570.

269. Schlafer DH, Scott FW. Prevalence of neutralizing antibody to the calf rotavirus in New York cattle. Cornell Vet. 1979;69:262-271.

270. Sezen İY. Buzağılarda Bakteriyel Enfeksiyonlar, Neonatal Buzağı Kayıpları Sempozyumu, S.Ü. Veteriner Fakültesi, Konya. 1986;69-75.

271. Shaw RD, Stoner-Ma DL, Estes MK, Greenberg HB. Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. J Clin Microbiol. 1985;22:286-291.

272. Sivula NI, Ames TR, Marsh WE, Werdin RE. Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. Preventive Vet Med. 1996;27:155-171.

273. Snodgrass DR, Herring JA. The action of disinfectants on lamb rotavirus. Vet Rec. 1977;101:81-82.

274. Snodgrass DR, Wells PW. The immunoprophylaxis of rotavirus infections in labs. Vet Rec. 1978;102:146-148.

275. Snodgrass DR, Fahey KJ, Wells PW, Campbell I, Whitelaw A. Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk. Infection and Immunity. 1980;28:344-349.

276. Snodgrass DR. Diarrhoea in dairy calves reduced by feeding colostrum from cows vaccinated with rotavirus. Res Vet Sci. 1982;32:70-73.

277. Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, Ojeh I. Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization, J Clin Microbiol. 1984;20:342-346.

278. Snodgrass DR. Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Synge BA. Aetiology of diarrhoea in young calves. Vet Rec. 1986;119:31-34.

279. Spendlove RS, Schaffer FL. Enzymatic enhancement of infectivity of reovirus. J Bacteriol. 1965;89:597-602.

280. Spendlove RS, McClain ME, Lennette EH. Enhancement of reovirus infectivity by extracellular removal or alteration of the virus capsid by proteolytic enzymes. J Gen Virol. 1970;8:83-94.

281. Steele AD, Geyer A, Gerdes GH. Rotavirus infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. Infectious diseases of Livestock, Oxford University Press, 2004, p. 1256–64.

282. Steiner L, Busato A, Burnens A, Gaillard C. Haufigkeiten und Ursachen von Kalberverlusten und Kalberkrankheitin in Mutterkuhbetrieben. 2. Mikrobiologische und parasitologische Diagnosen bei Kalbern mit Durchfall. Dtsch Tierzarztl Wschr. 1997;104:169-173.

283. Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Human MJ. Porcine and bovine rotaviruses in Slovenia:evidence of interspecies transmission and genome reassortment. J Gen Virol. 2008;89:1690-1698.

284.Suzuki H, Kitaoka S, Konno T, Sato T, Ishida N. Two modes of human rotavirus entry into MA104 cells. Arch Virol. 1985;85:25-34.

285.Svensson C, Lundborg K, Emanuelson U, Olsson SO. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-Ievel risk factors for infectious diseases. Preventive Vet Med. 2003;58:179-197.

286.Şahna KC. Sığırlarda rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde gebeliğin ve maternal antikorların rolü, AÜ Sağ Bil Ens Doktora tezi. 2002.

287.Şahna KC, Alkan F. Sığırlarda rotavirus epidemiyolojisinde gebeliğin rolü. FÜ Sağlık Bil Derg. 2003;17:203-209.

288.Takehara K, Kiuchi H, Kuwahara M, Yanagisawa F, Mizukami M, Matsuda H, Yoshimura M. Identification and characterization of a plaque forming avian rotavirus isolated from a wild bird in Japan. J Vet Med Sci. 1991;53:479–486.

289.Tan MT, Gür S, Yıldırım Y, Özgünlük İ. Aydın Yöresinde Bovine Rotavirusun Enfeksiyonunun Seroprevalansı ve Spesifik Antikorların Yaş Gruplarına Göre Dağılımı. Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg. 2007;29:1-4.

290.Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, Greenberg HB, Urasawa S. Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. J Infect Dis. 1987;155:1159-1166.

291.Theil KW, Bohl EH, Agnes A G. Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent). Am J Vet Res. 1977;38:1765-1768.

292.Theil KW, Bohl EH, Saif LJ. Techniques for rotaviral propagation. J Am Vet Med Assoc. 1978;173:548-551.

293.Theil KW, Saif LJ, Moorehead PD, Whitmoyer RE. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. J Clin Microbiol. 1985;21:340-345.

294.Theil KH, McCloskey CM. Molecular epidemiology and subgroup determination of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in dairy and beef calves. J Clin Microbiol. 1989;27:126-131.

295.Thiel E. Kinetik der hamaglutininbildung und gewinnung hlimagglutinierender prea parate zur verwendung im hlimagglutintionshemmungstest mit feldseren von schweinen und rindern. Inaug Diss Hannover. 1980.

296.Thouless ME, Bryden AS, Flewett TH, Woode GN, Bridger JC, Snodgrass DR, Herring JA. Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement-fixation and neutralization. Arch Virol. 1977;53:287-294.

297.Thurber ET, Bass EP, Beckenhauer WH. Field trial evaluation of a reo-coronavirus calf diarrhea vaccine. Can J Comp Med. 1977;41:131-136.

298.Toombs RE, Wikse SE, Kasari TR. The incidence, causes, and financial impact of perinatal mortality in North American beef herds. The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 1994;10:137-147.

299.Torres-Medina A, Schlafer DH, Mebus CA. Rotaviral and coronaviral diarrhea. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1985;1:471-493.

300.Tsunemitsu H, Shimizu M, Hirai T, Yhonemichi H, Kudo T, Mori K, Onoe S. Protection against bovine rotaviruses in newborn calves by continuous feeding of immune colostrum. Jpn J Vet Sci. 1989;51:300-308.

301.Tsunemitsu H, Hirai T, Yonemichi H, Kudo T, Mori K, Onoe S. Enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibody for detection of bovine rotavirus. 1990;17:33-40.

302.Tsunemitsu HL, Saif LJ, Jiang B, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, Ishiyama T, Hirai T. Isolation, characterization and serial propagation of a bovine group C Rotavirus in a Monkey Kidney Cell Line (MA104). J Clin Microbiol. 1991;29:2609-2613.

303.Twist ME, Kolonich K, Rubin DH. Propagation of rotaviruses in the presence of chicken serum. J Gen Virol. 1984;65:1207-1210.

304.Tzipori SR, Makin TJ, Smith ML. The clinical response of gnotobiotic calves, pigs and lambs to inoculation with human, calf, pig and foal rotavirus isolates. Aust J Exp Biol Med Sci. 1980;58:309-318.

305.Tzipori S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. Vet. Rec. 1981;108: 510–514.

306.Urasawa S, Urasawa T, Taniguchi T, Wakasugi F, Kobayashi N, Chiba S, Sakurada N, Morita M, Morita O, Tokieda M,. Kawamoto H, Minekawa Y, Ohseto M. Survey of human rotavirus serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. J Infect Dis. 1989;160:44-51.

307.Ushijima H, Xin KQ, Nishimura S, Morikawa S, Abe T. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR. J Clin Microbiol. 1994;32:2893–97.

308.Ustaçelebi Ş, Us AD. Genel Viroloji. 2. baskı, Pelikan yayınları. 2008;239-255.

309.Villegas GA, Argüelles MH, Castello AA, Mas NJ, Glikmann G. A rapid method to produce high yields of purified rotavirus particles. J Virol Methods. 2002;104:9-19.

310.Virtala A, Mechor GD, Grohn YT, Erb HN. Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life. J Am Vet Med Assoc. 1996;12:2043-2046.

311.Voller A, Bidwell DE, Barlett A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A quide with abstracts of microplate applications. Dynatech Laboratories Inc., Alexandria. 1979;1-57.

312.Vonderfecht SL, Miskuff RL, Wee SB. Protease inhibitors suppress the in vitro and in vivo replication of rotavirus. J Clin Invest. 1988;82:201-2016.

313.Vonderfecht SL, Lindsay DA, Eiden JJ. Detection of rat, porcine, and bovine group B rotavirus in fecal specimens by solid-phase enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1994;32:1107-1108.

314.Walsh DS, Kappes JC, Duell GA, Tsuchiya Y, Nutini LG. In vitro suppression of rotavirus replication using a purified fraction of bovine lecithin. IRCS Med Sci. 1985;13:595-596.

315.Wani SA, Bhat MA, Ishaq SM, Ashrafi MA. Determination of bovine rotavirus G genotypes in Kashmir, India. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2004;23:931-936.

316.Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. J Virol. 1990;64:5070–5075.

317.Ward RL, MM McNeal, Sheridan JF. Evidence that active protection following oral immunization of mice with live rotavirus is not dependent on neutralizing antibody. Virology. 1992;188:57-66.

318.Ward RL, Jiang X, Farkas T, Bass D M. Cross-Species Rotavirus Transmission Mucosal Immunology and Virology Stephen K. Tyring (Ed.) Virology of the Gastrointestinal Tract. Springer-Verlag, New York. 2006;1-9.

319. Wieda H, Bengelsdorff HJ, Bernhardt D, Hungere KH. Antibody levels in milk of vaccinated and unvaccinated cows against organisms of neonatal diarrhoea. J Vet Med B. 1987;34:495-503.

320. Wikse SE, Kinsel ML, Field RW, Holland PS. Investigating perinatal calf mortality in beef herds. The Veterinary Clinics of North America- Food Animal Practice. 1994;147-167.

321. Woode GN, Bridger JC, Hall G, Dennis MJ. The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum-deprived calves in Great Britain. Res Vet Sci. 1974;16:102-105.

322. Woode GN, Bridger JC. Viral enteritis of calves. Vet Rec. 1975;25:85-88.

323. Woode GN, Jones JM, Bridger JC. Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhea virus. Vet Rec. 1975;97:148-149

324. Woode GN, Bridger JC, Jones JM, Elewett TH, Bryden AS, Davies HA, White GB. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. Infection and Immunity. 1976;14:804-8I0.

325. Woode GN. Epizootiology of bovine rotavirus infection. Vet Rec. 1978;103:44-46.

326. Woode GN, Smith C, Dennis MJ. Intestinal damage in rotavirus infected calves assessed by D-xylose malabsorption. Vet Rec. 1978;102:340-341.

327. Woode GN, Crouch CF. Naturally occurring and experimentally induced rotaviral infections of domestic and laboratory animals. J Am Vet Med Assoc. 1978;173, 522-526.

328. Woode GN, Kelso NE, Simpson TF, Gaul SK, Evans LE, Babiuk L. Antigenic relationships among some bovine rotaviruses:serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. J Clin Microbiol. 1983;18:358-364.

329. Wudu T, Kelay B, Mekonnen HM Tesfu K. Calf morbidity and mortality in smallholder dairy farms in Ada'a Liben district of Oromia, Ethiopia Tropical Animal Health and Production. 2008;40:369-376.

330. Wyatt RG, Sly DL, London WT, Palmer AE, Kalica AR, Van Kirk DH, Chanock RM, Kapikian AZ. Induction of diarrhea in colostrum-deprived newborn rhesus monkeys with the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Arch Virol. 1976;50:17-27.

331. Wyatt RG, Greenberg HB, James WD, Pittmah AL, Kalica AR, Flores J, Chaflock RM, Kapikian AZ. Definition of human rotavirus serotypes by plaque reduction assay. Infec Immun. 1982;37:110-115.

332. Wyatt RG, James HD, Pittman AL, Hoshino Y, Greenberg HB, Kalica AR, Flores J, Kapikian AZ. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. J Clin Microbiol. 1983;18:310-317.

333. Yason CV, Schat KA. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: clinical signs and virology. Am J Vet Res. 1987;48:977–983.

334. Yavru S, Bulut O, Şahinduran Ş, Kale M, Yapıcı O, Avcı O, Albay MK, Pehlivanoğlu F. Serological, virological and haematological examination of rotavirus infection in calves with diarrhea and their dams. In Oral and Poster Abstracts 15th Jubilee World Buiatrics Congress. Budapest, Hungary, pp. 172. 2008.

335. Yazıcı Z. Buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiyolojisi ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu, Doktora tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 1992.

336. Yazıcı Z, Akça Y. Yeni doğmuş buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiyolojisi ve ELISA testi rotavirus antijenlerinin identifikasyonu. AÜ Vet Fak Derg. 1993;40:231-240.

337. Yıldırım Y, Dağalp SB, Tan MT, Kalaycıoğlu AT. Seroprevalence of the Rotavirus and Corona virus infections in cattle. J Anim Vet Advances. 2008;7:1320-1323.

338. Yolken RH, H. Kim W, Wyatt RG, Clem T, Kalica AR, Chanock RM, Kapikian AZ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Lancet. 1977;2:263-266

339. Yolken RH, Stopa PJ. Enzyme-linked fluorescence assay: ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. J Clin Microbiol. 1979;10:317-321.

340. Yolken R, Arango-Jaramillos S, Eiden J, Vonderfecht S. Lack of genomic reassortment following infection of infant rats with group A and group B rotaviruses. J Infect Dis. 1988;158:1120-1123.

341. Zhao W, Xia MJ, Bridges-Malveo T, Cantu M, McNeal MM, Choi AH, Ward RL, Sestak K. Evaluation of rotavirus dsRNA load in specimens and body fluids from experimentally infected juvenile macaques by real-time PCR. Virology. 2005;341:248-256.

342. Zheng S, Woode GN, Melendy DR, Ramig RF. Comparative studies of the antigenic polypeptide species Vp4, Vp6, and Vp7 of the three strains of bovine rotavirus. J Clin Microbiol. 1989;27:1939-1945.

9. EKLER

EK A. Tavşanlara Uygulanan Adjuvantsız İmmunizasyon Süreci

İmmunizasyon başlangıcı	Enjeksiyon yolu	Virus Hacmi	
1 gün	Deri altı	5 ml virus içeren hücre kültürü supernatantı	
3. gün	Deri altı	5 ml virus içeren hücre kültürü supernatantı	
5. gün	Deri altı	5 ml virus içeren hücre kültürü supernatantı	
7. gün	Deri altı	2 ml PEG ile konsantre virus	
15. gün	Deri altı	2 ml PEG ile konsantre virus	
21. gün	Deri altı	2 ml PEG ile konsantre virus	**1 Ay sonra kan alımı**

EK B. Tavşanlara Uygulanan Adjuvantlı İmmunizasyon Süreci

İmmunizasyon başlangıcı	Enjeksiyon yolu	Virus+Adjuvant Hacmi	
1. gün	Deri altı	0,5 ml virus içeren hücre kültürü supernatantı + 0,5 ml Freund's complete adjuvant	
2. enjeksiyondan 1 Ay sonra	Kas içi	0,5 ml virus içeren hücre kültürü supernatantı + 0,5 ml Freund's incomplete adjuvant	
2. enjeksiyondan 7 gün sonra	Kas içi	Virus+ PBS (0,5 ml virus içeren hücre kültürü supernatantı +0,5 ml PBS)	**14 gün sonra Kan alımı**

10. ÖZGEÇMİŞ

Serpil YANBAKAN 28.01.1981 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladıktan sonra 1998 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2002 yılında mezun oldu. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda 2002 yılında başladığı yüksek lisans eğitimini 2004 yılında tamamladı. 2004 yılında S.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.