T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIZILCIK PROANTOSİYANİDİNLERİNİN VE MOLEKÜLER BİLEŞENLERİNİ MEYDANA GETİREN KATEŞİN VE EPİKATEŞİNİN ANTİ-ROTAVİRUS AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma Saliha ÖZEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç.Dr. Oya BULUT

KONYA-2012

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Fatma Saliha ÖZEN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Viroloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Sibel YAVRU Selçuk Üniversitesi	İmza
Danışman:	Oya BULUT Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Rüstem DUMAN Selçuk Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu …… tarih ve …… sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza
Prof.Dr. Tevfik TEKELİ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Enterik viruslar içerisinde rotaviruslar ağır diyareye sebep olan ve %30- 80 oranında pediatrik hastaneye yatırılışların başlıca nedenidirler. Enfeksiyon asemptomik seyrettiği gibi hafif kusma ve diyare bazende şiddetli dehidrasyon meydana gelmektedir. Şu anda kullanılan tedavi yöntemi dehidrasyon ve diyare esnasında ve sonrasındaki zararı telafi etmeye yöneliktir. Milyonlarca yenidoğan canlıyı enfekte eden ve salgın ishallere neden olan rotaviruslara karşı etkili bir ilaç yoktur (D'Agostino 2008).

Antiviral ilaçlar üzerine yapılan çalışmalar uzun süreden beri başarılı bir şekilde sürmektedir, fakat bu ilaçlara karşı gelişen viral mutantlar problem oluşturmaktadır. Koruyucu ilaç olarak tanımlanan bitkisel kökenli yeni ajanlar insan ve evcil hayvan populasyonundaki enterik viral hastalıkların yayılımını azaltmaktadır ve bu bitkisel ilaçlara karşı herhangi bir viral mutant gelişimine dair bir bulguya rastlanmamıştır.

Bu çalışma ile kızılcık proantosiyanidinin antiviral mekanizmasının belirlenmesi, kateşin ve epikateşinin anti-rotavirus aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bilgilerin rotavirus enfeksiyonlarının tedavisinde sağlık kuruluşlarına yarar sağlayacağı ve bitkisel kökenli ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

Çalışmamda her türlü yardımını ve desteğini gördüğüm danışmanım Doç. Dr. Oya BULUT'a, öğrenim hayatımda bana çok şey katan Prof. Dr. Sibel YAVRU'ya, Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK'e, Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e, Doç. Dr. Orhan YAPICI'ya, Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN'a, Dr. Oğuzhan AVCI'ya ve Veteriner Hekim Ela ESİN'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ	2
1.1. Etiyoloji	2
1.1.1. Rotavirus Proteinleri	4
1.1.2. Gruplar	6
1.1.3. Alt Gruplar	7
1.1.4. Serotipler	7
1.1.5. Replikasyon	8
1.1.6. Hücre Kültürü	11
1.1.7. Çevre Şartlarına Dayanıklılık	12
1.2. Epidemiyoloji	13
1.3. Patogenez ve Patoloji	14
1.4. Klinik Bulgular	16
1.5. Teşhis	17
1.6. İmmunite	19
1.7. Tedavi ve Kontrol	21
1.8. Kızılcık ve Proantosiyanidinler	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gereç	28
2.1.1. Virus	28
2.1.2. Hücre Kültürü	28
2.1.3. Kızılcık Proantosiyanidini	28
2.1.4. Kateşin [(+) - Catechin Hydrate]	28
2.1.5. Epikateşin [(-) - Epicatechin]	28
2.1.6. ELISA	29
2.1.7. Toxilight^{R} Bioassay Kiti	29
2.1.8. Kobay Eritrositleri	29
2.1.9. Monoklonal Antikorlar	29

2.1.10. Watersorb® Polimerler 30
2.1.11. Transmisyon Elektron Mikroskopi 30
2.1.12. İstatistiksel Değerlendirme 30
2.2. Yöntem 30
2.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması 30
2.2.2. Virusun Çoğaltılması 30
2.2.3. Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Titrasyonu 31
2.2.4. Numunelerin Hazırlanması 31
2.2.4.1. Kızılcık Proantosiyanidini 31
2.2.4.2. Kateşin ve Epikateşin 32
2.2.5. ELISA 32
2.2.6. Sitotoksisite Testi 33
2.2.7. Rotavirusun Konsantrasyonunun Artırılması 33
2.2.8. Mikro-Hemaglütinasyon Testi 33
2.2.9. Gold Labeled Immunelektron Mikroskopi 34
2.2.10. İstatiksel Değerlendirme 34
3. BULGULAR 35
3.1. Virus 35
3.2. Virusun Titresi 36
3.3. ELISA Sonuçları 36
3.4. Sitotoksisite Sonucu 39
3.5. Mikro-Hemaglütinasyon Sonucu 40
3.6.Gold Labeled Immunelektron Mikroskopi Sonucu 42
4. TARTIŞMA 44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 51
6. ÖZET 52
7. SUMMARY 54
8. KAYNAKLAR 55
9. EKLER 65
EK A.Eitk Kurul Onayı 65
10. ÖZGEÇMİŞ 66

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenosine Three Phosfat
^{o}C	Derece Santigrant
Ca^{+2}	Kalsiyum
CO_2	Karbondioksit
CPE	Cytopathologic Effect (sitopatolojik efekt)
dk	Dakika
$DKID_{50}$	Doku Kültürü Infektif Doz %50
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
dsRNA	Double strain RNA (çift iplikçikli RNA)
EDTA	Ethylen Diamine Tetra Acetic acid
EM	Elektron Mikroskopi
ELISA	Enyzme Linked Immunosorbent Assay
FCV	Feline Calicivirus
g	Gram
K^{+}	Potasyum
LA	Lateks Aglütinasyon
ml	Mililitre
MA-104	Monkey Kidney-104
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
Na^{+}	Sodyum
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
PAC	Proantosiyanidin
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
pH	Asitlik Değeri
RNA	Ribo Nükleik Asit
RTV	Rotavirus
SA-11	Simian Agent-11
TEM	Transmission Electron Microscopy
VP	Viral Protein

1. GİRİŞ

Yeni doğanlarda ishalin nedenleri çok çeşitli olup, enfeksiyöz ajanlar, çevre, beslenme ve hijyenik faktörler hastalığın çıkışında rol oynar. Yeni doğanların ishal olgularının başlıca viral etkenleri rotaviruslar ve coronaviruslar olup; parvoviruslar, adenoviruslar, astroviruslar, caliciviruslar ve flaviviruslar bu olgularda yer alan diğer viral etkenlerdir (Alkan 1998).

Dünyadaki akut gastroenteritlerin sebep olduğu vakaların %50-60'ının nedeni rotaviruslardır. Rotaviruslar, tüm dünyada bebeklerde ve hayvan yavrularında görülen diyarelerin en önemli etkenlerinden biridir (Brooks ve ark 1998). Bütün türlerde klinik bulgular, teşhis ve hastalığın epidemiyolojisi birbirine benzerken, hastalığın şiddeti değişiklik gösterebilir (Murphy ve ark 1999).

Rotaviruslar ilk kez 1943 yılında Light ve ark tarafından, çocuklarda görülen bir ishal epidemisinde tespit edilmiştir.

1965 yılında Matberhhe ve ark, 70 nm büyüklükte olan rotavirus Simian Agent-11 (SA-11) suşunu izole etmişlerdir. 1969 yılında Mebus ve ark Nebraska Calf Disease Virus'u (NCDV) izole etmişlerdir.

Bishop ve ark (1973), akut gastroenterit gözlenen çocukların duodenum mukozasından aldıkları biyopsi materyalinden, 70 nm büyüklükte olan rotavirusu elde etmişlerdir.

Flewwet ve ark (1978) etkenin morfolojik olarak araba tekerleğine benzemesi nedeniyle Latince terminolojide tekerlek anlamına gelen rotavirus ismini vermişlerdir.

1977 yılında McNulty ve ark buzağı rotaviruslarını tripsinle muamele ederek Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürlerinde başarıyla üretmişlerdir (Yazıcı 1992).

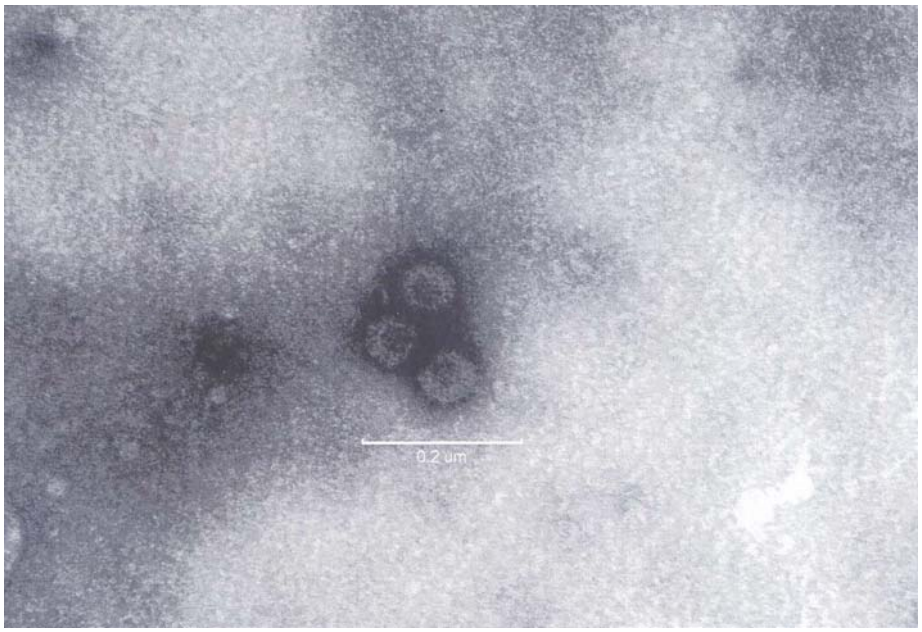
Ojeh (1984), diyareli buzağılardan elde ettiği dışkı örneklerini Monkey Kidney (MA-104) hücrelerine inokule ederek virusu üretmeyi başarmışlardır.

1.1. Etiyoloji

Reoviridae familyasında yer alan rotaviruslar, ortak morfolojik ve biyokimyasal özellik taşırlar (Estes 1991).

Etken zarsız, çift katlı ve ikozahedral simetrili kapsitten oluşur.

Rotavirus kelimesi Latince bir sözcük olan rotadan gelmektedir; rota tekerlek anlamındadır. Bu şekilde isimlendirilmesinin sebebi dairesel dış kapsidin tekerleğe benzemesindendir (Kapikian ve Chanock 1996).



Resim 1.1. Rotavirus

Rotavirus enfeksiyöz partikülü; dış kapsid, iç kapsid ve öz bölgesinden meydana gelen üç tabakalı yapıya sahiptir (Kalica ve ark 1983, Matsui ve ark 1989).

Viral genom 11 segmentli, pozitif (+) polariteli ve çift sarmal (ds) RNA molekülüne sahiptir (Matson ve ark 1990). Her segment en az bir viral proteinin kodlanmasından sorumludur. Bu konuda SA-11 suşu ile ilgili bilgi hemen hemen tamdır ve SA-11 prototip virus olarak tanımlanır (Hernandez ve ark 1990, Doymaz 2000).

Çizelge 1.1. Rotavirusların genel özellikleri (Hernandez ve ark 1990, Estes 1991, Serter 1997, Doymaz 2000).

Yapısı	
	65-75 nm
	Çift katlı kapsid
	Üç katmanlı yapı
	İkozahedral simetri
	Zarsız
	Enfeksiyözite dış kapsidin bulunmasına bağlı
Genom	
	11 segmentli dsRNA
	Pürifiye RNA segmentleri enfeksiyöz değildir
	Herbir segment en az bir protein kodlar
Replikasyon	
	Tümüyle sitoplazmik
	İnklüzyon cisimciği oluştururlar
	Virus replikasyon enzimlerini içerir
	Transkriptler hem protein hem de negatif zincir üretiminde rol alırlar.
	dsRNA segmentleri yeni oluşan subviral partiküller içinde oluşur
	ER zarından tomurcuklanarak oluşur, dış kapsid proteinlerini bu süreçte kazanırlar.
	Enfekte hücrelerin parçalanması ile açığa çıkarlar

1.1.1. Rotavirus Proteinleri

Genom segmentlerinden 6 kadarının (VP1-8) gen ürünleri yapısal proteinlerdir.

VP1, VP2 ve VP3 virus partikülü içerisindeki öz bölgesinde bulunurlar (Estes ve Cohen 1989).

VP1 proteini, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz olarak görev yapar (Dhama ve ark 2009).

VP2 proteini, translasyon esnasında viral mRNA'ya bağlanarak çift iplikçikli RNA segmentlerinin replikasyonunda ve rotavirus virionlarının kapsid içerisinde toplanmasında rol oynar (Brüssow ve ark 1990).

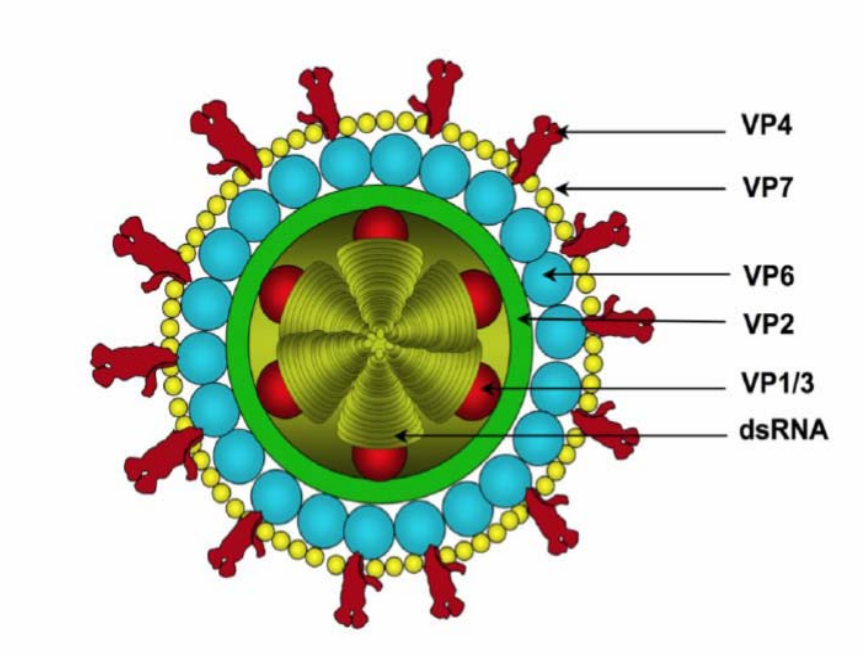
VP4 (VP5+VP8) ve VP7 dış kapsitte bulunurlar (Estes ve Cohen 1989).

VP4 proteini, virusun yüzeyinde bulunan bir çıkıntı (spike) proteinidir. VP4'ün konakçı hücreye bağlanma ve virulans kazandırma gibi önemli görevleri vardır (Kalica ve ark 1983, Offit ve ark 1984). 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 nötralizan aktivitesi gibi fonksiyonlara sahip olurlar (Mattion ve ark 1994). Buna göre enfeksiyözite, dış kapsidin bulunmasına bağlıdır (Espejo ve Arias 1991, Estes ve ark 1981, Dhama ve ark 2009).

VP7 proteini kuvvetli bir immunojen olup nötralizan antikor seviyesini artırır (Hoshino ve ark 1988). VP7 sentezi endoplazmik retikulum (ER) içinde olmaktadır. ER'un olmadığı veya yok edildiği durumlarda, VP7 oluşumu golgi organelinde veya ekstraselüler ortamda olabilmektedir (Dolan ve ark 1985, Estes ve Cohen 1989, Hernandez ve ark 1990, Doymaz 2000, Ustaçelebi 2001).

VP6 proteini iç kapsitte yer alır. Virusun en önemli immunojenik proteini olan ve grup spesifik antijen özelliği gösterip öz bölgesini çevrelemektedir (Estes ve Cohen 1989). Virus partiküllerinin en önemli yapısal kısmı VP6 proteinidir. VP6, tek katmanlı partiküllerin yüzeyinde yer alır ve bu proteinin kaldırılması ile polimeraz aktivitesi kaybolur (Widdowson ve ark 2001).



Resim 1.2. Rotavirus proteinleri (Ruiz ve ark 2009).

Rotavirusa ait genom yapısında 5 adet yapısal olmayan protein bulunur. Bunlar; NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 ve NSP5 proteinleridir.

NSP3'ün viral replikasyon sırasında protein sentezinin translasyonunun artırılmasında rolü vardır.

NSP4, plazma membranının permeabilitesini değiştirir ve epitel hücrelerin yüzeyleri arasındaki sıkı bağlantıların (tight juction) yapısını değiştirerek intraselüler kalsiyum seviyesini artırır ve virusun hücre içine girmesini kolaylaştırır. 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).

Rotavirusa ait NSP20, NSP26, NSP34, NSP35, NSP53 gibi yapısal olmayan proteinler olgunlaşmış virus partikülünde bulunmayan, enfekte hücrede tespit edilen proteinlerdir (Fields ve ark 1996).

Çizelge 1.2. Rotavirusların yapısal proteinleri

Genom Segmenti	**Ürün**	**Olgun Protein**	**Bulunduğu Yer**	**Görevi**
1	VP1		Öz bölgesi	RNA Polimeraz
2	VP2		Öz bölgesi	Replikasyon, Kapsid içinde toplama
3	VP3		Öz bölgesi	-
4	VP4	VP5 VP8	Dış kapsid	Konakçı hücreye bağlanma, Hemaglütinin ve Nöraminidaz aktivitesi
6	VP6		İç Kapsid	Immunojen, grup spesifik antijeni
9	VP7		Dış kapsid	Immunojen, Nötralizan antikor seviyelerini yükseltir.

Rotaviruslar , kapsid proteinin antijenik özelliğine göre serolojik olarak grup, alt grup ve serotiplere ayrılırlar (Estes ve Cohen 1989).

1.1.2. Gruplar

Rotavirusa ait RNA gen segmenti göç profilleri ve genom parçalarına ait birbirinden farklı yapıların tespit edilmesi ile alfabetik olarak A'dan G'ye kadar 7 farklı rotavirus serolojik olarak gruplandırılmıştır (Pedley ve ark 1983, 1986).

A, B ve C grubu rotavirusları hem insan hem hayvanlarda bulunurken; D, E ve F grubunda bulunanlar sadece hayvanlarda belirlenmiştir (Estes ve Cohen 1989).

Grup A rotaviruslar bebeklerde ve hayvan yavrularında ciddi ishalli hastalıklarına yol açarlar.

Grup B rotaviruslar Çin'de epidemik olarak görülen ciddi ishal vakalarına neden olurlar (Castello ve ark 2002). Grup A rotavirusları, buzağı ve kuzularda grup

B rotaviruslarına göre daha yaygın olup, klinik olarak daha çok öneme sahiptir (Chasey ve Banks 1984, Fijtman ve ark 1987, Theil ve McCloskey 1989).

Grup C rotaviruslar pararotavirus olarak da isimlendirilir, domuzlarda ve insanlarda tespit edilmiştir. İshalli çocuklarda sporadik olarak görülmektedir (Saif ve ark 1980, Rodger ve ark 1982, Castello ve ark 2002).

1.1.3. Alt Gruplar

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 I, alt grup II ve alt grup olmayan I yada II olarak sınıflandırılır. İnsan rotaviruslarının çoğunluğu alt grup I yada II özelliği gösterir. Memeli ve kuş rotaviruslarında alt grup olmayan I ve II mevcuttur (Kalica ve ark 1983, Kapician ve ark 1989, Hoshino ve ark 1988, Mattion ve ark 1994, Iturriza ve ark 2003).

1.1.4. Serotipler

Rotavirusa ait serotip spesifitesinin başlıca belirleyicisi VP7 olup, G (Glikoprotein) serotipini temsil eder ve dış kapsidin büyük bir bölümünü oluşturur (Kalica ve ark 1983, Bridger ve ark 1992, Arias ve ark 1996).

VP4, P (Proteaza duyarlı protein) serotipini temsil eder (Mattion ve ark 1994).

VP4 ve VP7'yi temsil eden P ve G 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). İnsanlarda G serotiplerinin 11'i (G1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 ve 12) ve P serotiplerinin 7'si (P1,2A,3,4,5A,8 ve 11) tespit edilmiştir. Hayvanlarda ise G serotipinin 7,11,13 ve 14'ü ile P serotipinin 6,7,9 ve 10'u tespit edilmiştir (Hoshino ve Kapikian 2000).

1.1.5. Replikasyon

Rotavirusların replikasyon mekanizmasına ait bilgiler, maymun böbreğinden elde edilen devamlı hücre kültürü üzerinde yapılan çalışmalar sonucu elde edilmiştir (Estes ve Cohen 1989).

Rotavirus'un konakçı hücreye penetrasyonu, füzyon ile direkt hücre içine girme ya da reseptör aracılıklı endositoz (Ca^{+2} bağımlı endositoz) olayı ile gerçekleşir. Reseptör aracılığıyla gerçekleşen endositozda rotaviruslar enterositlerin yüzeyinde bulunan integrin ve sialik asit içeren gangliozid gibi reseptörler aracılığıyla hücreye bağlanırlar. Sadece üç tabakalı tam rotavirüs partikülleri konakçı hücreye bağlanabilir. Rotavirus'a ait yapısal olmayan NSP4, plazma membranının permeabilitesini değiştirir. Epitel hücrelerin yüzeyleri arasındaki sıkı bağlantıların yapısı değişerek, intraselüler kalsiyum miktarı artar böylece virusun hücre içine girmesi (endositoz) kolaylaşır ve enfeksiyoz rotavirus partikülleri sitoplazma içerisine alınır (Ruiz ve ark 2000, Nava ve ark 2004).

Tripsin, pankreatin gibi sindirim enzimleri ile muamele rotavirusun invitro kültürünü kolaylaştırmaktadır (Estes ve Cohen 1989). VP4'ün bu enzimler ile VP5 ve VP8 alt ünitelerine ayrışarak virus'un konakçı hücreye penetrasyonunu ve enfeksiyözitelerini artırır. VP8, epitel hücreler arasındaki yeni oluşan bağlantıları inhibe ederek, virus'un bu bağlantıların altında yer alan gizli integrin reseptörlerine ulaşmasını sağlar. Bunun sonucunda VP5 ve integrin reseptörü arasında füzyon olayı meydana gelir (Nava ve ark 2004). Bu sayede tripsin ile aktive olan rotaviruslar direkt olarak konakçı hücre membranından geçerek hızlı bir şekilde konakçı hücre içerisine girerek (3-5 dk), sitoplazmalarında replikasyona başlarlar. Tripsin ile ayrışmamış rotavirus partikülleri ise enfektif değildir ve konakçı hücre içerisine yavaş bir şekilde girerler (30-50 dk). Fagositoz yolu ile hücre içine geçtikten sonra lizozom içerisine alınır ve lizozom enzimleri ile kapsitten sıyrılırlar. (Estes ve Cohen 1989). Rotavirus'a ait dış kapsidin ayrılması konakçı hücre içerisindeki düşük Ca^{+2} ortamında olur. Üç katmanlı tam virus partikülleri, çift katmanlı transkripsiyonel olarak aktif partiküller haline dönüşür.

Replikasyon için gerekli olan enzimler viral partiküller tarafından sağlanır. Viral RNA, virusa ait RNA polimerazın aktivitesiyle messenger RNA (mRNA)'ya transkribe olur. Viral mRNA'lar viral proteinlerin sentezi ve negatif polariteli RNA sentezi için kalıp görevi görür. Sitoplazmada viroplazma içinde oluşacak öz bölgelerini oluşturmak için VP1, VP3 ve mRNA segmentleri paketlenir. Bu öz bölgesinin içinde çift sarmallı RNA genomu oluşturmak için negatif polariteli RNA replikasyonu gerçekleştirilir. Yeni oluşan çift katmanlı subviral partiküller, yüzeyinde bulunan VP6 proteini ile ER'un membranında bulunan NSP4 reseptörlerine bağlanır, tomurcuklanma ile geçici bir zarf kazanarak ER'a girer. ER'dan tomurcuklanma sırasında VP7 ve VP4 proteinleri kazanılır. Viral partiküller ER içinde ilerlerken, geçici zarlarını ve NSP4'leri kaybederler. VP4 ve VP7 dış kapsidi yapmak için organize olur ve virusun olgunlaşması sonucu üç katmanlı partiküller oluşur. ER'da tomurcuklanma ve virusun olgunlaşması için yüksek Ca^{+2} konsantrasyonu gerekir. Olgunlaşan virionlar hücre lizisi ile hücre dışına saçılımı gerçekleşir (Estes ve Cohen 1989).

Rotavirus'a ait segmentli genom yapısı, influenza virusu gibi segmentli genom yapısına sahip diğer viruslarda olduğu gibi reassortment mekanizması ile yeni suşlar oluşabilmektedir. Reassortment, virus yüzey proteinlerinde ani olarak meydana gelen ve virus tarafından tamamen yeni yüzey proteinlerinin oluşturulduğu büyük değişimdir. Bu olay, iki farklı rotavirus suşunun aynı konakçı hücreyi enfekte etmesi esnasında başlayan, replikasyon ve kurgulanma aşamasında genom segmentlerinin değiştirilmesi sonucu oluşur. Bu durum antijenik shift (değişim) olarak da adlandırılır. Sonuçta hibrit progeni virusların, yüzey proteinlerinde immun sistemden kaçışı kolaylaştıran çok önemli değişiklikler, yeni bir antijenik kalıp oluşur (Ramig 1997).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, insan ve hayvan populasyonları arasında dolaşım halinde olan suş çeşitliliğinin arttığını göstermektedir. Artan suş çeşitliliğinin nedeni, nokta mutasyonların zaman içinde birikimi (genetik dirft) ile soy ağacını etkileyen ve antikorlardan kaçış sağlayan mutantların ya da aynı hücreyi etkileyen ikili enfeksiyonlar sonucu meydana gelen genetik reassortment etkisi ile açıklanabilir (Iturriza ve ark 2003).

Rotavirus partiküllerinin morfolojik görünümleri farklıdır ve elektron mikroskobi (EM) ile çift katmanlı, tek katmanlı ve kor olmak üzere üç tip partikül görülür.

Çift katmanlı partiküller 70 nm çapında, düzgün kenar çevresi ve kısa parmakları ile tekerleğe benzer.

Tek katmanlı partiküllerin yüzeyi tırnaklıdır.

Korlar daha seyrek görülürler, genellikle genomik RNA içermezler ve toplu halde bulunurlar (Doymaz 2000). Kor, tek katmanlı partiküllerin sodyumtiosiyanat veya yüksek konsantrasyonlu kalsiyumklorid gibi ajanlarla parçalanması sonucu açığa çıkartılabilir (Estes ve Cohen 1989).

Sadece tam ve çift katmanlı rotavirus partikülleri enfektif olma özelliğine sahiptir (Flewett ve Woode 1978, Cukor ve Blacklow 1984).

Tek ve çift katmanlı partiküller, sezyumklorid (CsCl) veya sükroz içinde derece santrifüj yolu ile ayrılabilirler.

Çift katmanlı partiküller CsCl içinde 1.36 g/cm^3 yoğunluğa sahip ve sükroz içinde 520-530 saniyede sediment oluştururlar (Estes ve Cohen 1989).

Tek katmanlı partiküller, 1.38 g/cm^3 yoğunlukta 380-400 sn'de sediment oluşturabilirler.

Kor partikülleri ise 1.44 g/cm^3 yoğunluğa sahip ve sedimantasyon katsayıları 280 sn'dir (Serter 1997, Doymaz 2000).

Rotavirus genomu; molekül ağırlığı $2x10^5$-$2x10^6$ dalton arasında degişen, boyut aralığı 0.6-3.3 kilobase çiftleri olan 11 parçalı çift zincir RNA içerir. RNA parçaları EM'la ölçülen dış hat uzunluklarına göre 4 gruba ayrılır. 11 segmentin bu dört gruba dağılımı RNA'nın poliakrilamit jel elektroforezinde (PAGE) belirgin olarak görülmektedir (Kapikian ve Chanock 1996).

Genomik RNA segmentleri 4 grup altında kümeleşir.

Çizelge 1.3. Rotavirus Genomik RNA segmentleri

Memeli grup A rotavirusları	4:2:3:2
Memeli grup B ve E rotavirusları	4:2:2:3
Memeli grup C rotavirusları	4:3:2:2
Avian grup A rotavirusları	5:1:3:2
Avian grup D ve F rotavirusları	5:2:2:2
Avian grup G rotavirusları	4:2:2:3

Bu RNA segmentleri karakteristik olarak poliakrilamit jel elektroforezindeki hareket sırasına göre numaralandırılmıştır. Memeli A grubu rotaviruslar için; 4 tane geniş parça, 2 tane orta büyüklükte parça, 3 tane daha küçük parça ve 2 tane en küçük parçadır. Bazı memeli A grubu rotaviruslarında bu karakteristik RNA bantlarının hareketi görülmez. Örneğin sığır rotaviruslarında 11. bant (segment) farklıdır ve 6. ile 7. bant arasında yerleşmişir (Kapikian ve Chanock 1996).

Rotaviruslarda görülen bu bantlar reovirusların bantlarından farklıdır. Reoviruslarda; geniş, orta ve küçük olmak üzere üç gruba ayrılan 10 RNA segmentinden oluşmuştur (Kapikian ve Chanock 1996).

Rotavirusların insan, maymun, fare, domuz, buzağı, bizon, geyik, antilop, at, koyun, keçi, köpek, kedi, papağan, hindi, ördek ve tavuk üzerinde 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, McNulty ve ark 1979, Muniiappa ve ark 1987, Puntel ve ark 2002, Rodgers ve Baldwin 1991).

1.1.6. Hücre Kültürü

Rotavirusların üretilmesinde en duyarlı hücre kültürleri primer hücre kültürleridir (Mc Nulty 1978).

Araştırmalarda devamlı hücre kültürleri arasından en çok kullanılanları Monkey Kidney (MA-104) ve Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürleridir (Kapikian ve Chanock 1996). Ayrıca Monkey Kidney (MK-2), Rhesus

Monkey Kidney (LLC-MK-2), African Green Monkey Kidney (Vero), Pig Kidney (PK-15), İnsan Karaciğer Hücresi (HepG2), İnsan Kolon Adenokarsinom Hücresi (CaCo-2) ve Sekonder Sığır Böbrek Hücreleri diğer duyarlı hücre kültürleri arasında yer almaktadır (Sato ve ark 1981, Ojeh 1984).

Rotaviruslar hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) oluşturarak ürerler. Virusun üremesiyle oluşan enfeksiyonun ilk 24-48 saatinden sonra hücreler yuvarlaklaşmaya başlarlar ve hücre zarında kalınlaşmalar görülür (Sato ve ark 1981).

1.1.7. Çevre Şartlarına Dayanıklılık

Rotaviruslar dış etkenlere karşı oldukça dirençlidirler. Dış ortamda haftalar hatta aylar boyunca sağlam kalabilmektedirler.

Yüksek pH ortamında dış kapsid yüzeyinde bulunan ve hemaglütinasyon aktivitesine sahip olan VP4 yapısı kaybolmaktadır (Anthony 1991).

Virus 25 ^{o}C'de 24-48 saat, 37 ^{o}C'de 1 saat ve 50 ^{o}C'de 5 dakika boyunca dayanıklılık göstermektedir (Estes ve ark 1991). PH 3-9 arasında en az 15 dk dayanıklıdır (Serter 1997, Ustaçelebi 1999).

4 ^{o}C'de 1.5mM CaCl içinde stabilize edildiklerinde aylarca enfeksiyözitesini korur. Virus enfeksiyözitesi fenol, formalin, klorin ve betapropiolaktan gibi dezenfektanlarla inaktive edilebilir (Serter 1997, Ustaçelebi 1999).

Kloroformla muamele hemaglütinasyon aktivitesini bozar (Ustaçelebi 2001).

% 0.1'lik Sodyumdeoksisülfat virusu inaktive eder (Ustaçelebi 2001).

% 95'lik etanol rotavirusa karşı en etkili dezenfektandır ve virusun dış kapsidini yok eder (Kapikian ve Chanock 1990).

İnsan sütünde pastorizasyondan (80 ^{o}C'de 15 dk) sonra bile rotavirus tespiti yapılmıştır (Benkaddour ve ark 1993).

Tripsin, pakreatin ya da elastin gibi çeşitli sindirim enzimleri ile muamele sonucunda virus enfektivitesi artmaktadır.

Ethylen diamine tetra acetic acide (EDTA) gibi bağlayıcı özellikteki kimyasalların, virusa ait VP4 ve VP7 proteinlerini yok ederek viral partiküllerin enfeksiyon kabiliyetlerini ortadan kaldırmaktadır (Cohen ve ark 1979).

Non-iyonik deterjanlar kümeleri parçalayarak enfeksiyöziteyi artırır (Ustaçelebi 2001).

1.2. Epidemiyoloji

Rotaviruslar, tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, geniş bir konakçı spektrumuna sahiptirler (Göçmen ve ark 1995). Enfeksiyon spektrumunun içinde bebekler ve hayvan yavruları yer almaktadır (Mebus 1990).

Rotavirus enfeksiyonlarının seyrini etkileyen faktörler;

1.Yeni doğanların kolostrum alıp almadıkları

2. Sütten kesilme zamanları

3.İklim şartları

4.İmmunite durumları

5.Var olan diğer enteropatojenik ajanlar (Yazıcı 1992, Brandt ve ark 1992).

Rotavirusların başlıca bulaşma yolu, fekal-oral yoldur. Enfekte hayvanların dışkıları ile yüksek miktarda (yaklaşık 10^{11} partikül/g) viral partikülü etrafa saçılır. Enfeksiyonun 3. ve 4. günleri bu saçılım en üst düzeye ulaşır ve dışkıda birkaç ay canlı kalabilirler (Murphy ve ark 1999).

Rotavirus enfeksiyonları, insanlarda ve hayvanlarda mevsimsel ve iklimsel farklılıklar göstermektedir (Yazıcı 1992, Brandt ve ark 1992). Her iki yarım kürede de mevsime bağlı insidensin en yüksek olduğu aylar kış ve ilkbahar aylarıdır (McNulty 1978).

Soğuk ve kuru havaları seyreden aylarda, ılık ve rutubetli aylara göre enfeksiyona daha sık raslanılmıştır (Vargas ve ark 2001). Soğuk havalarda yağmur, kar fırtınası; sıcak havalarda ise ısı, rüzgar ya da esen kumlar ishalin etkisini artıran etkenler olmuştur (Mebus 1990).

Çocuklarda rotavirus enfeksiyonları 6 ile 24. aylar arasında gözlenir (Yurdakök 1983). Buzağılar her yaşta rotavirus enfeksiyonlarına duyarlı olmakla beraber, özellikle 1 yaşın altındaki buzağılarda daha yaygın olarak görülür (Bridger 1994).

Erişkin subklinik enfekte hayvanlarda rotavirus saçılımı, gebeliğin geç dönemlerinde, özellikle doğum yaptıklarında hormonal değişiklikler ve hormonların

immun sistemdeki immunosupresif etkilerine bağlı olarak artmaktadır. Bu nedenle enfekte hayvanlar, yeni doğanlara etkeni edinmelerinde ve virusun etrafa yayılımında önemli bir rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte kolostrum, süt yolu ile yenidoğanların enfeksiyondan korunması mümkün olabilmektedir (Çabalar 2004).

Anne sütünün, rotavirus enfeksiyonlarına karşı koruyucu özelliğinden dolayı yaşamın ilk 6 ayı ile 3 yaş sonrası dönemde rotavirus enfeksiyonları oldukça seyrektir. Rotavirus enfeksiyonları erişkinlerde de görülebilir. Ancak, bunlar asemptomik ve tedavi gerektirmeyecek kadar hafif seyirli ishal olgularıdır (Yurdakök 1983, Tünger ve ark 2001).

İnsan ve hayvan rotaviruslarının bazı serotipleri arasında görülen antijenik benzerlik nedeniyle insan rotavirusları domuz, sığır ve köpeklerde enfeksiyon oluşturabilir (Zvicdic ve ark 2001, Doymaz 2000, Beyazova 1996, Ustaçelebi 1999).

Etkenin dış ortam şartlarına ve pek çok dezenfektana dirençli olması enfeksiyonun yayılmasında önemli bir etkendir (Yurdakök 1983, Yazıcı 1992). Bazı rotaviruslar klorlamaya çok dirençlidir ve suda uzun süre canlı kalabilir, bu nedenle su kaynakları geçiş için bir risk taşımaktadır (Murphy ve ark 1999).

Hastalık direkt veya indirekt olarak bulaşabilir. Kalabalık gruplar halinde yaşam hastalık oranını artırır (Yurdakök 1983, Yazıcı 1992).
Enfeksiyon yayılımı, el yıkama ve dezenfeksiyon gibi hijyenik tedbirlerle azaltılabilir (Yıldırmak ve ark 1992).

Komplike olmayan rotavirus enfeksiyonlarında ishal tedavisiz geçer. Fakat E. coli, Salmonella, Clostridia yada Cryptosporidiumlu komplike enfeksiyon olduğunda ölümler artabilir (Mebus 1990).

1.3. Patogenez ve Patoloji

Rotaviruslar organizmaya sindirim sistemi yolu ile girerler. Zarfsız oldukları için mide asidine karşı dirençlidirler. Rotavirusların başlıca replikasyon alanı ince barsaklardaki villus epitel hücreleridir (McNulty 1978).

Villus epitel hücrelerinin enfeksiyonu sonucu hem plazma zarında hemde endoplazmik retikulumda Ca^{+2} geçirgenliği artar ve hücre lizisi meydana gelir. Burada NSP4'ün hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} serbest bırakacak mekanizmaları

uyardığı tespit edilmiştir. Artan Ca^{+2} sonucu Ca^{+2}'a duyarlı F-aktin, Villin ve Tübülin gibi proteinler etkilenerek mikrovillus iskeletini tahrip ederler. Villuslar kısalır ve kübik bir şekle dönüşürler. Bu kübik epitel hücrelerin adsorbsiyon kapasiteleri ve enzimatik aktiviteleri düşüktür. Epitel hücrelerinde zedelenme ve hasar oluşur (McNulty ve Logan 1983).

Replikasyon sonucunda hasar görmüş hücreler, barsak boşluğuna dökülür ve dışkılama ile büyük miktarda virus atılımı (10^{10} partikül/dışkı) gerçekleşmektedir (Holland 1990, Brooks ve ark 1998). Hasar görmüş hücrelerin kaybı; glukoz taşıyıcılarının, sodyum taşıyıcılarının ve Na^{+}, K^{+} ve ATPase aktivitelerinin azalmasına yol açar. Bu durum Na^{+}, K^{+}, klorid, bikarbonat ve suyun kaybına neden olur ve asidoz gerçekleşir. Enfeksiyon esnasında oluşan ishalin en önemli nedeni tahrip olan enterositlerin yerine gelen yeni hücrelerin, yeterli transport işlevini gerçekleştirememesidir. Olgunlaşmamış hücredeki yetersiz glikoz ve sodyum adsorbsiyonu ishali meydana getirir.

Makroskobik olarak barsaklarda ödem, gerginlik ve bazı durumlarda barsak mukozasında hemorajik alanlar görülmektedir (McNulty ve Logan 1983). Ortaya çıkan bu histopatolojik değişiklikler, 3-8 hafta sonra normale döner (Ustaçelebi 1999, Doymaz 2000).

Enfeksiyon sırasında patolojik ve anatomik olarak genel bir akut gastroenterit tablosu görülür. Enfeksiyonun kendisine ait karakteristik bir patolojik bulgusu yoktur (Yurdakök 1983, Doymaz 2000). Ayrıca rotavirus enfeksiyonuna ait patolojik bulgular çeşitli virus türleri ile benzerlik gösterebilir (Snodgrass ve ark 1986).

İntestinal sistem dışında viral replikasyon minumumdur ve klinik semptom oluşturmamaktadır (Mebus 1990). Ancak, maymun, fare, domuz, rat, sığır ve tavşan gibi hayvanların serumlarının yanı sıra; karaciğer, böbrek, beyin ve nazal sıvılarında rotavirus antijeni tespit edilmiştir (Azevedo ve ark 2005, Jaimes ve ark 2005, Zhao ve ark 2005).

Rotavirus replikasyon için serviks, göğüs, kemik, akciğerle, prostat, ovaryum gibi farklı hücre tiplerini seçiyor olması, gastrointestinal sistem dışındaki organların kan yolu ile kontaminasyonunu düşündürmektedir (Crawford ve ark 2006).

Rotavirusla enfekte hücrelerin dökülmesi sonucu laktoz gibi disakkaritlerin emilimi azaldığından barsak lümeninde biriken laktoz bakteriyel üreme için elverişli bir ortam sağlar ve sekonder enfeksiyonlar ortaya çıkar (Kapikian ve Chanock 1990).

1.4. Klinik Bulgular

Rotavirusler yeni doğan hayvan türlerinde ve insanlarda neonatal diarelerin en önemli etkeni olup; klinik semptomları tüm türlerde birbirine benzemektedir (McNulty 1978, Kapikian ve Chanock 1990).

Hastalıkta görülen semptomlar;

1.Kusma

2.Ateş

3.Sulu ishal

4.Dehidrasyon

5.Abdominal bozukluklar

Rotavirus enfeksiyonlarının inkübasyon süresi 1-4 gündür (Brooks ve ark 1998). Virusün 1-3 günlük kuluçka evresinden sonra kusma nöbetleri ve ishal görülür (White ve Fenner 1994).

Kusma rotavirus ishallerinde gözlenen ilk semptomdur. Gaita sulu ve sarı renktedir. Ateş vakaların yarısında görülür ve genellikle 38.5 ^{0}C'nin altındadır. Eğer ateş yükselirse komplikasyon oluştuğu yada başka bir hastalık olduğu düşünülür (Cleary ve Pickering 1992, Biswas ve ark 1996).

İshal 5-7 gün sürer (Gracey 1991, Ustaçelebi 1999). Hastalığın ortalama süresi 4-7 gündür, ancak gaita ile virüs saçılımı 10 gün kadar sürer (Yurdakök 1983, Serter 1997, Ustaçelebi 1999).

İnsanlarda hastalık 2-6 yaş, genç hayvanlarda ise 1-8 hafta arasında gözlenir (White ve Fenner 1994, Murphy ve ark 1999).

Beyaz ishal yada süt ishali olarak da adlandırılan buzağı, domuz, tay ve kuzu rotavirus enfeksiyonlarının inkubasyon süresi 16-24 saat'tir (Murphy ve ark 1999).

Hastalığın seyri sırasında ortaya çıkan komplikasyonların en önemlileri barsak emilim işlevleriyle ilgili olanlarıdır (Hamilton 1990, Yurdakök 1983).

Rotavirus gastroenteritlerinde villuslarda emilimden sorumlu tepe enterositlerinin virusla invazyonu sonucu dökülmesi ile adsorbsiyon yetenekleri kısıtlı olan hücreler onların yerine geçer. Bunun sonucunda glikoza bağlı Na^+ emilimi bozulur, Na-K, ATP'ase aktivitesi azalır ve sonuç olarak da sulu dışkılar oluşmaktadır (Roy ve ark 1995, Cleary ve Pickering 1992, Hamilton 1990). Çok fazla süt tüketimi ishalin şiddetinin artmasına neden olur (Murphy ve ark 1999).

Rotavirus'a bağlı enfeksiyon sonucu, diğer enteropatojenler ile komplike olmadığı durumlarda barsaklarda büyük lezyonlar meydana gelmez ve şekillenen diyare, 3-4 gün içinde kendiliğinden iyileşme gösterir (Holland 1990). Beslenmesi iyi olan çocuklarda ölüm nadirdir (White ve Fenner 1994).

1.5. Teşhis

Rotavirüs enfeksiyonlarının teşhis edilmesinde en çok kullanılan numune örnekleri gaita, barsak içerikleri ve barsaktan alınan doku parçalarıdır (Ustaçelebi 1999, Winiarczky ve Gradzki 1999).

Teşhisin esası gaitadan virus ya da virus antijeninin varlığının saptanmasına dayanmaktadır (Alkan ve ark 1992).

Rotavirus teşhis metotları;

1.Immunoelektronmikroskopi (IEM)
2.Immun Flouresan Testi (IF)
3.Enzyme Linkend Immunosorbent Assay (ELISA)
4.Agar-jel Immunodiffüzyon Tekniği (AGID)
5.Hemaglutinasyon Testi
6.Hemaglutinasyon Inhibisyon Testi (HI)
7.Komplement Fiksasyon Testi (CFT)
8.Serum Nötralizasyon Testi (SN)
9.Lateks Aglütinasyon Testi (LA)
10.Immunoelektroosmoforesis (IOEP)
11.Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE)
12.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

13.Elektron Mikroskopi (EM)

14.Immun Peroksidaz Testi (IP)

15. Reverse Passive Hemaglutinasyon Testi (RPHA)

(Serter 1997, Ustaçelebi 1999, Doymaz 2000).

Bu testlerle ilgili karşılaştırmalı çalışmalar poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), ELISA ve immunelektromikroskopi (IEM) hem hızlı sonuç verdiği, hem de doğruluk oranının yüksek olduğunu ortaya konmuştur (Saravan ve ark 2001).

Domuz ve sığırlar üzerinde rotaviruslara karşı yapılan antikor tarama çalışmalarında nötralizasyon testinin HI testine göre daha duyarlı olduğunu belirtmiştir (Burgu ve Akça 1983).

Rutin tanıda LA ve ELISA en yaygın olarak kullanılmaktadır (Samboug ve ark 1985, Öztürk ve ark 1990, Hernandez ve ark 1990, Estes 1991, Tietzova ve Petrovicova 1993, Winiarczky ve Gradzki 1999, Ustaçelebi 1999, Doymaz 2000).

Elektron mikroskopi yöntemi ile virüs partiküllerinin morfolojik yapısı belirlenerek virüs identifikasyonu gerçekleştirilir. Bu yöntem ile çok sayıda virion partikülünün varlığı şarttır (en az 10^5 g/dışkı). Bu gereklilik immunoelektronmikroskopi yöntem ile ortadan kaldırılmıştır (Murphy ve ark 1999).

ELISA dışkı örneklerinde rotavirüs aranmasında çok hassas sonuçlar sağlamaktadır (Caple IW 1989).

PAGE 11 gen segmentinin ayrıştırılmasında kullanılır. PCR ise viral dsRNA'nın nicel olarak artırılmasında kullanılır (Matson ve ark 1990).

A, B ve C grubu Rotaviruslar PAGE, PCR ve dot hibridizasyon yöntemleriyle birbirlerinden ayrıt edilebilirler (Matson ve ark 1990). A grubu rotaviruslar ELISA veya LA kitleri ile saptanır (Nakata ve ark 1986).

Rotavirus G ve P serotiplerinin belirlenmesinde monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan ELISA, poliklonal antikorlar kullanılarak yapılan nötralizan testleri (Hoshino ve Kapikian 2000), nükleik asid hibridazsyonu, reverse transkription chain reaction (RT-PCR) ve nükleik asid sekans analizi metotları kullanılır (Hoshino ve Kapikian 1994).

Reassortment haritası ile spesifik mutasyonların yeri saptanmaktadır. Burada PAGE ve nükleik asit hibridizasyonu ile RNA segment orjini saptanabilir (Fields ve ark 1996).

Rotavirüslerin invitro kültürleri oldukça zordur. Virus izolasyonu için en çok kullanılan hücreler maymun böbrek hücre serisi MA-104 ve insan kolon karsinoma hücre serisi CaCo-2'dir (Cumino ve ark 1998).

Proteolitik enzim (tripsin, pankreatin) ihtiva eden hücre kültüründe virus enfektivitesinin artığına dair ilk çalışma reoviruslar üzerinde yapılmıştır. Etken üretilmeden önce tripsinle muamele edilerek dış kapsid proteini olan VP4'ü proteolitik bölünme ile VP5 ve VP8'den ayrılır (Cumino ve ark 1998). CPE görülebilir ama belirsizdir. Bu nedenle enfekte hücrelerde virus antijenlerinin belirlenmesi için immun flouresan (IF) tekniği kullanılmaktadır (Beyazova 1996, Ustaçelebi 1999, Doymaz 2000, Saravanan ve ark 2001).

1.6. İmmunite

Rotavirus enfeksiyonları, viremi dönemi oluşturmadan, lokal seyreden enfeksiyonlardır (Doymaz 2000).

Çalışmalar, virus replikasyonun en önemli alanının villus hücreleri olduğunu, bu nedenle barsaktaki lokal immunitenin koruyucu olabileceğini ortaya koymuştur (Ustaçelebi 1999, Serter 1997).

Enfeksiyonun seyrinde immunolojik olarak iki farklı görüş vardır.

a- Barsak mukozasında bağışıklık mevcut ise immun mekanizma etkili olabilir.

b- Serumdaki antikorlar hastalığın prognozunda ve tanısında etkili olabilir (Burgu 1988).

İnce barsaklarda oluşan immunizasyonda, Peyer plaklarında bulunan lenfositler önemli bir role sahiptir. Burada enfeksiyondan bir hafta sonra spesifik B ve T lenfositleri görülür ve 4 hafta boyunca kalırlar.

Nötralizan antikorlar kanda 1 hafta sonra görülmeye başlar ve 2. haftada en yüksek miktara ulaşırlar. İmmunitede B lenfositlerin rolü T lenfositlerinden daha fazladır (Doymaz 2000, Serter 1997).

Barsak lamina propia katında bulunan ve immunglobulinlerin (Ig) üretiminden sorumlu olan B lenfositler, fazla miktarda IgA ve daha az miktarda IgM üreten immun sistem hücrelerdir (Bachmann ve Hess 1983).

Yenidoğan ve bebeklerdeki birincil rotavirus enfeksiyonlarının ilk haftası içinde kan serumlarında ve duodenal sıvılarında IgM tespit edilmiştir (Yurdakök 1983, Beyazova 1996). Enfeksiyondan 1-4 ay sonra ise IgG ve IgA saptanabilmektedir. Bu nedenle dışkı ve duodenum sıvısında IgA saptanması, rotaviruslarla yeni geçirilmiş bir primer veya reenfeksiyonun iyi bir göstergesidir (Bora ve Öğütmen 1995, Aydoğdu ve ark 1996). Bağışıklık ve korunmada daha çok IgA veya interferon gibi lokal bağışıklık faktörleri önemli rol oynamaktadır (Serter 1997).

Yeni doğanların kolostrum alıp almadıkları ve anne sütü ile beslenme süreleri enfeksiyonun seyrini etkiler (Yıldırmak ve ark 1992).

Doğumdan önce transplasental olarak, doğumdan sonra da anne sütü ile yavrulara geçen antikorlar yaşamın ilk aylarında onları rotavirus enfeksiyonlarından korumaktadır (Bruce ve ark 1995, Estes 1991).

Yapılan çalışmalar, kolostrum ve anne sütünde rotavirusa karşı IgA yapısında antikorların koruyucu olduğunu ama plasenta aracılığıyla geçen IgA ların koruyucu olmadığını göstermiştir (Gökay ve ark 1995, White ve Fenner 1994).

Neonatal enfeksiyonlar, barsaklarda geçici bir nötralizan salgısal IgA yanıtını uyarmakta, ancak bu antikorlar reenfeksiyona karşı önemli bir immunite oluşturmamaktadır (White ve Fenner 1994).

Kolostrum yoluyla enfeksiyona karşı bir korunma sağlanabilmesi için kolostral antikorların belirli bir düzeye ulaşmaları gerekmektedir (McNulty 1978).

Doğal bir rotavirus enfeksiyonunun reenfeksiyona ve hastalığa karşı etkisini değerlendirmek için yapılan çalışmalarda, doğumda enfekte olanlarda rotavirus hastalığı daha az sıklıkta ve daha hafif iken, doğumda enfekte olmayanlarda daha çok sıklıkta ve daha ağır olmuştur. Yeni doğanlarda rotavirus enfeksiyonu bir sonraki

ağır semptomik hastalığa karşı koruma göstermiştir, fakat tekrar enfekte olmasını önleyememiştir (Hoshino ve Kapikian 2000).

1.7. Tedavi ve Kontrol

Rotavirus enfeksiyonların çoğu hafif seyirli olduğundan yalnız ağızdan sıvı verilerek düzelebilir. Tedavide ilk olarak kusma ve ishal sonucu oluşan su ve elektrolit kaybı karşılanmalıdır. Dehidrasyonun ağır seyrettiği olgularda parenteral sıvı tedavisi uygulanmalıdır. Enfeksiyonun ikincil bir bakteriyel ajanla birlikte görüldüğü durumlarda ise antibiyotik tedavisi ilave edilir (Beyazova 1999, Doymaz 2000).

Rotavirus enfeksiyonuna direnç sağlamada ince barsaktaki lokal bağışıklık sistemik bağışıklıktan daha önemlidir.

Evcil memelilerin kolostrumunda bulunan rotavirus antikorları yeni doğanları korumada önemlidir (Murphy ve ark 1999). Fakat bir haftadan daha küçük hayvanlarda rotavirüs ishalinin sıklıkla görülmesi, doğum sonrası 3-7 gün içinde sütteki antikor titresinin hızla düşmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Gebe hayvanlara aşı yapımı sütteki antikor salgılanmasını uzatarak ishalin etkisinin azalmasını sağlamaktadır (Mebus 1990). Yapılan bir çalışmada, ineklere kombine inaktif rotavirus - E.coli aşısı uygulanmasıyla serum ve kolostrumda nötralizan antikor düzeyinde artış saptanmıştır (Ustaçelebi 1999, Doymaz 2000).

Bazı hayvan ve insan rotavirusları arasında türler arası rotavirus suşlar bakımından antijenik benzerlikler tespit edilmiştir. Bu özellikten yararlanarak hayvan rotavirus suşları insanlar için rotavirus aşıları hazırlamakta kullanılmaktadır (Brüssow ve ark 1990, Nagesha ve Holmes 1991).

Sığır kökenli G tip 6, Finlandiya'lı çocuklarda %50-88 oranında koruma sağlamıştır (Bruce ve ark 1995, Mascarenhas). Diğer sığır kaynaklı Wistar Calf 3 (WC3) aşısında da %5-76 oranında bağışıklık gelişmiştir. Maymunlardan elde edilen aşı suşları (Rhesus rotavirus-RRV) sığır suşlarına göre daha immunijeniktir. RRV ile %67'e varan oranda antikor yanıtı alınmıştır. İnsan ve hayvan rotavirus suşları ile hazırlanan karma aşılarda; sığır, maymun ve insan G tipi 1 ile G tip 1, 2 ve 4'ü içeren

aşılar yapılmıştır. Monavalan ve 4'lü karma aşılarla yapılan çalışmalar sonucunda % 63-77 oranında etkili bulunmuştur (Mascarenhas ve ark 2002b, Doymaz 2000).

Son zamanlarda RotaRix (GlaxoSmithKline) ve RotaTeq (Merck/CSL) isimli 2 farklı firma tarafından üretilen oral aşılar bebekler üzerinde etkili olarak kullanılmaktadır (Dennehy 2008).

Doğal enfekte erişkin hayvanlarda serum antikor düzeyi çok yüksek olmadığı, bu nedenle kolostrum ve süt aracılığıyla yenidoğan hayvanları enfeksiyondan korumada yetersiz kaldığı görülmüştür. Aşılama rotavirus enfeksiyonlarının azalmasını sağlamıştır. Erişkin sığırların gebeliğin geç dönemlerinde aşılanarak annelerde yüksek antikor titresi ile yenidoğanların maternal antikorlar yoluyla enfeksiyona karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir (Snodgrass ve ark 1980, Snodgrass 1982, Fernandez ve ark 1998, Kim ve ark 2002).

Oral uygulamalar, mukozal immuniteyi harekete geçirmektedir (Doymaz 2000). Rotavirus antikorları kullanarak pasif immunizasyonda, bebeklere oral olarak ineklerden elde edilen yüksek titrede rotavirus antikoru içeren süt ve kolostrum verilmiştir. Bu tür uygulamalar, hem enfeksiyonun yayılmasını kontrol etmek hemde immun sistemi baskılanmış çocukları tedavi etmek için terapötik olarak kullanılabilir (Kapikian 1989, Beyazova 1996, Ustaçelebi 1999, Doymaz 2000).

Yeni doğanların modifiye canlı rotavirus içeren oral aşılar ile aktif immunizasyonlarının gerçekleşebileceğine dair görüşler vardır. Ancak oral aşılama ile oluşan etkinin, kolostrumda bulunan spesifik antikorlar tarafından engellendiği bildirilmektedir. Enterik bir viral enfeksiyona karşı bağırsak içi antikor yanıtı olarak IgM ve IgA antikorları üretilir. Fakat kolostrum yolu ile virusa karşı spesifik antikorların alınması ile bağırsak içi antikor yanıtında azalma görülmektedir. Bu nedenle kolostrum yolu ile yüksek miktarda virusa karşı spesifik antikorlar alabilen yenidoğanlarda oral yol ile aşılanmanın gereksiz olduğu rapor edilmiştir (Radostits ve ark 2007).

Sonuç olarak enfeksiyonun kontrol edilmesinde canlının bulunduğu çevre şartlarına ve hijyene önem verilmelidir (Estes ve Cohen 1989).

1.8. Kızılcık ve Proantosiyanidinler

Kızılcık, kızılderililer tarafından binlerce yıldır ilaç olarak yararlanılan etkili bir meyvedir. İçeriğindeki yüksek C vitamini nedeniyle denizciler iskorbit hastalığına karşı koruyucu olarak kullanmışlardır. Amerikalı botanikçiler tarafından 1997 yılında ilk onda satılan bitkisel ilaç olarak ilan edilmiştir.

Ericaceae familyasının üyesi olan kızılcığın, *Vaccinium macrocarpon, V. oxycocus ve V. eruthrocarpum* olmak üzere bilinen üç türü vardır.

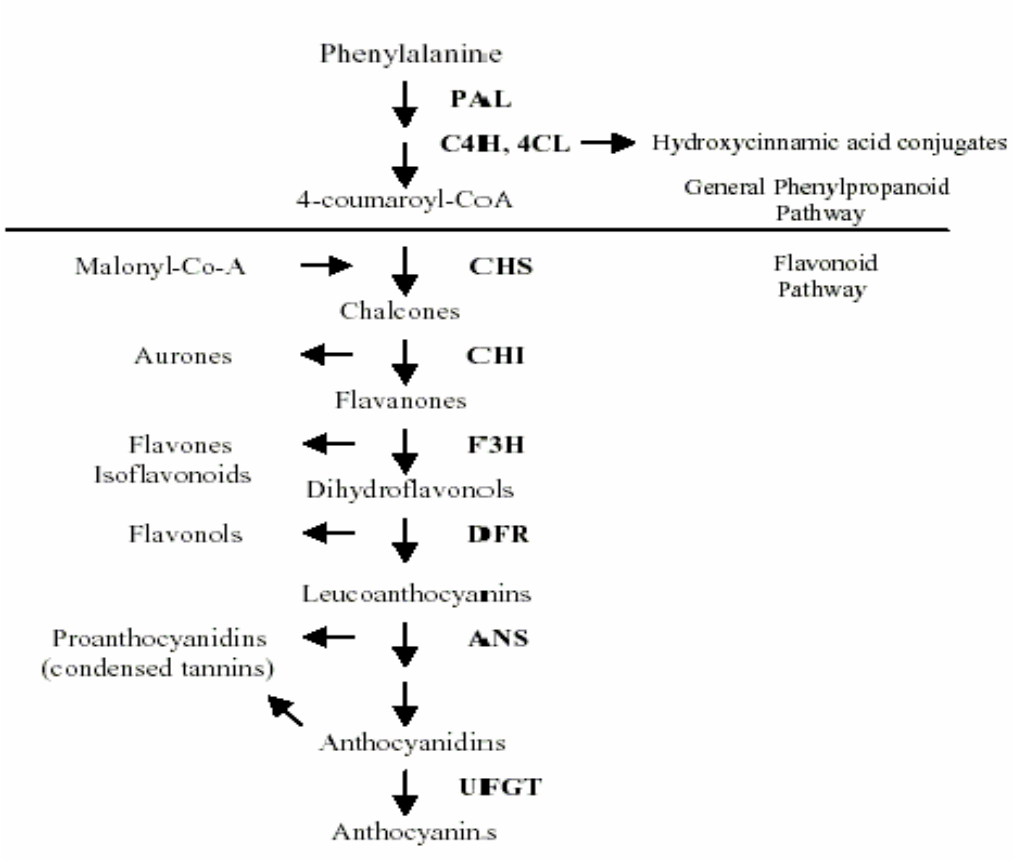


Resim 1.3. Kızılcık

Kızılcık %88 oranında su, organik asit karışımı, C vitamini, proantosiyanidin, antosiyanidin, epikateşin ve kateşin içermektedir (Fanos ve ark 2006, Raz ve ark 2004).

Proantosiyanidinler, antosiyanidinlerin renksiz öncüleridirler. Dimer, oligomer ve enzimatik yoğunlaşma sonucu karbon köprüleriyle kurulmuş flavan-3ols polimerlerinden oluşurlar. Düşük molekül ağırlıklı bileşikleri suda çüzünebilirler (Lea ve Arnold 1978). Çözülebilir proantosiyanidin polimerleri 1000-6000 aralığında molekül ağırlığına sahiptirler bazen bu 20.000 molekül ağırlığında da olabilmektedir (Haslam 1998). Ancak bitkilerde bulunan çözünmeyen yüksek polimerler baskındır.

Çizelge 1.4. Proantosiyanidinlerin biyolojik sentez yolu (Jaakola ve ark 2009)

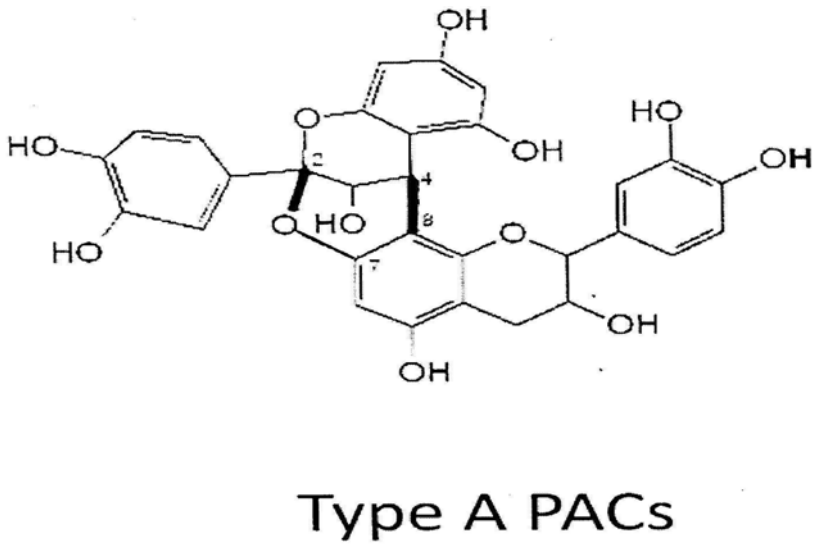


Proantosiyanidinler, bitkiler aleminde ligninlerden sonra en geniş dağılıma sahip polifenollerdir. Kakao, çay, fındıklar, meyveler, bakliyatlar, baharatlar ve kırmızı üzüm gibi birçok bitkisel gıda proantosiyanidin ihtiva etmektedir (Gu ve ark 2003). Genellikle de *vaccinium* cinsi (kızılcık, yaban mersini) bitkilerde bulunurlar. Tanin grubuna dahil bu polifenol bileşikler bitkileri mikroplara karşı korumakla görevlidirler (Stapleton 2003, Fanos ve ark 2006, Raz ve ark 2004).

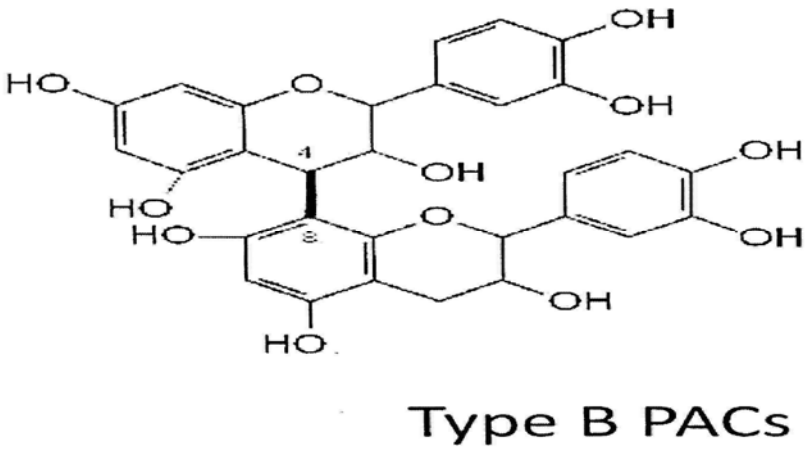
Bate-Smith (1973) tarafından yapılan bir araştırmada bitkisel tatsız kısımların yani 'bitkisel taninlerin (=proantosiyanidinlerin)' hayvan ve mikroplara karşı büzücü

özellik sağladığı ileri sürülmüştür. Proteinleri çökerten bu büzücü özellikleri patojenlere karşı bitkisel savunmada karakteristik bir öldürücü özellik kazanmalarını sağlamaktadır. Bu yetenekleri demir ve diğer mineralleri bağlaması sonucu ciddi temel mineral kaybı nedeniyle patojenlerin üremelerinin sınırlandırılması olarak rapor edilmiştir.

Proantosiyanidinlerin A, B ve C gibi tipleri vardır. A-tipi proanthosiyanidinlerin monomerleri $C_4 - C_8$ ve $O_7 - C_2$ arasında bağlantılıdır (Resim 1.4.). B ve C tipinde ise $C_4 - C_8$ ve $C_4 - C_6$ arasında bağlantılıdır (Resim 1.5.) (Lea ve Arnold 1978). B-tipi proantosiyanidinler A-tipine göre daha sık raslanmaktadır (Gu ve ark 2003).



Resim 1.4. A tipi Proantosiyanidin



Type B PACs

1.5. Resim B tipi Proantosiyanidin

Proantosiyanidinler epikateşin ve kateşin oligomerlerinden meydana gelmektedirler. Bu oligomerler biyokimyasal bağlarıyla A tipi proantosiyanidine anti-yapışma özelliği kazandırmaktadır. A tipi Proantosiyanidinler kızılcıkta bol miktarda bulunmaktadır (Howell ve ark 2005).

Bitki dokularındaki (-)- epikateşinin varlığı fungal saldırılara karşı direnç sağlamaktadır. Zararlı otlara karşı bazı bitkiler (-)- kateşin gibi flavan-3ols moleküllerinden yaralanarak bu zararlı komşu bitki türünün hızlı çoğalmasına karşı korunmaktadır. Kateşin kalsiyum sinyal yolağının yanı sıra aktif oksijen üretimini de başlatarak zararlı komşu bitki türünün kök hücrelerinin ölümünü ilerletmektedir (Scalbert 1991, Bais ve ark 2003).

Biyoyararlanım çalışmalarında proantosiyanidinlerin insan kolon mikroflorasında emildiği bildirilmiştir. Anoksik ortamda 10 saatlik inkübasyon sonucu yaklaşık %50'sinin emildiği, 48 saatlik inkübasyon sonucunda da tamamının emildiği bildirilmiştir (Deprez ve ark 2000).

Proantosiyanidinlerin saflaştırılmasında Sephadex^{R} LH-20 kullanılmaktadır. Sayısal olarak analiz etmede spektrofotometrik metotlar ve kromotografik metotlar kullanılmakla birlikte genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanılmaktadır. Bitkisel materyaldeki proantosiyanidinlerin içeriğinin miktar belirlenmesinde ise farklı kolorimetrik metotlar kullanılmaktadır. (Gu ve ark 2003, Maatta-Rhiihinen ve ark 2005).

Proantosiyanidinlerin ekstrakt olarak elde edilmesinde; sulu-organik çözücüler, aseton ve metanol karşımı %50 oranında su ile kullanılmaktadır. En iyi çözücü %60'lık metanoldür (Kahkonen ve ark 2001). Ekstrakt santrifüjden sonra hemen analize tabi tutulur. Şeker, amino asid, protein gibi çıkan maddeler farklı absorbentler ile test edilir (Kraemer- Schafthalter ve ark 1998).

Bir çok çalışma kızılcık suyunun ve proantosiyanidinin antibakteriyel, antiviral ve farmakolojik özelliğini göstermiştir (Kerry 1999, Lipson ve ark 2007a, Lipson ve ark 2007b, Lynch 2004).

Helicobacter pylori yönünden pozitif olan peptik ülserli hastalarda kızılcık suyu tüketimi sonrasında plaseboya göre bu bakterinin 3 suşuna karşı enfeksiyonda azalma görülmüştür (Zhang ve ark 2005).

Dört hafta boyunca günlük içilen kızılcık suyunun obez erkeklerdeki HDL kolesterolü önemli oranda arttırdığı ve LDL kolestrolü ise önemli oranda azalttığı gözlemlenmiştir (Ruel ve ark 2006, Reed 2002).

Tel Aviv Üniversitesinin 1990'lı yılların sonlarına doğru yaptığı çalışmada yüksek moleküler bileşenli kızılcık suyunun bakteriyel kümeleşmeyi özellikle de gram negatif bakterilerin neden olduğu kümeleşmeyi azalttığı rapor edilmiştir (Weiss ve ark 1998).

İn vitro çalışmalarda A tipi kızılcık ve B tipi üzüm proantosiyanidinlerinin *E. coli*'nin üroepitelyal hücrelerine yapışmasını önlediği tespit edilmiştir (Howell ve ark 2005).

Su ve ark (2010a, 2010b) tarafından yapılan bir çalışmada kızılcık suyunun ve proantosiyanidinin enterik viral ajanlara (norovirus, calicivirus) olan antiviral etkisini rapor etmiştir.

Bu çalışma ile kızılcık proantosiyanidinin antiviral mekanizmasının belirlenmesi, kateşin ve epikateşinin anti-rotavirus aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bilgilerin rotavirus enfeksiyonlarının tedavisinde sağlık kuruluşlarına yarar sağlayacağı ve bitkisel kökenli ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Virus

Araştırmada Amerikan Tip Kültür Kolleksiyonundan (Rockville, MD, USA) temin edilen Rotavirus SA-11 suşu (ATCC VR-1565) kullanıldı.

2.1.2. Hücre Kültürü

Simian Rotavirus SA-11 suşu'nun çoğaltılması, titrasyonu ve antiviral etkisi çalışılan numunelerin sitotoksisite testinin yapılmasında ViroMed Laboratuvarından (Minneapolis, MN,USA) temin edilen MA-104 hücresi (Monkey kidney cells, *Ceropithecus aethiops*) kullanıldı.

2.1.3. Kızılcık Proantosiyanidini

Dr. Amy B. Howell'dan (Rutgers University, NJ, USA) temin edilen kızılcık proantosiyanidinin antiviral etkisinin mekanizmasının araştırılmasında kullanıldı.

2.1.4. Kateşin [(+)- Catechin Hydrate]

Rotavirusa karşı antiviral etkinin araştırılmasında Sigma-Aldrich firmasından (St. Louis, MO, USA) temin edilen kateşin kullanıldı.

2.1.5. Epikateşin [(-)- Epicatechin]

Rotaviruse karşı antiviral etkinin araştırılmasında Sigma-Aldrich firmasından (St. Louis, MO, USA) temin edilen epikateşin kullanıldı.

2.1.6. ELISA

Viral enfektivite kaybını, test edilen numunelerin etkili oldukları konsantrasyonlarının ve sürelerinin belirlenmesi için rotavirus grup spesific viral antijenine (VP6) duyarlı ticari olarak temin edilen ELISA kiti (Premier^{TM} Rotaclone ELISA kitleri ticari olarak Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA) kullanıldı.

2.1.7. Toxilight^{R} Bioassay Kiti

ELISA testi sonucunda antiviral etkisi belirlenen numunelerin etkili oldukları konsantrasyonların sitotoksisitesini belirlemek için Lonza Rockland firmasından (Rockland, ME, USA) ticari olarak temin edilen Toxilight^{R} Bioassay Kiti kullanıldı.

2.1.8. Kobay Eritrositleri

ELISA testi sonucunda antiviral etkisi belirlenen numunelerin etkili oldukları konsantrasyonların rotavirusun viral antijenik determinantına (dış viral kapsid protein 4) ve kırmızı kan hücre yüzeylerindeki siyalik asit reseptörlerine etkisini araştırmak amacı ile Innovative Research firmasından (Plymouth, MN, USA) temin edilen kobay eritrositler kullanıldı.

2.1.9. Monoklonal Antikorlar

Kızılcık proantosiyanidinin rotavirus üzerindeki antiviral etkisinin araştırılması amacıyla gold labeled immunelektron mikroskopi yöntemi uygulandı. Bu amaçla Abcam^{R} firmasından (Cambridge, MA, USA) temin edilen rotavirus grup spesifik viral antijeni olan VP6'ya karşı fare monoklonal antikorları ve Electron Microscopy Sciences firmasından (Hatfield, IL, USA) temin edilen fare monoklonal antikorlarına karşı keçilerden (goat-anti mouse) elde edilen 5 nm'lik altın parçacıklarıyla işaretlenmiş konjuge IgG antikorları kullanıldı.

2.1.10. Watersorb® Polimerler

Gold labeled immunelektron mikroskopi ve hemaglutinasyon çalışmalarında rotavirusun konsantrasyonunun artırılmasında Watersorb firmasından (Fayetteville, AK, USA) temin edilen polimer absorbant kristaller kullanıldı.

2.1.11. Transmisyon Elektron Mikroskopi

Gold labeled immunelektron mikroskopi çalışmasında Mount Sinai Medical Center, Patoloji Bölümünde (NY, USA) bulunan Hatachi 7650 Transmisyon elektron mikroskobu kullanıldı.

2.1.12. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatiksel olarak değerlendirilmesinde Student's t Testi kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

MA-104 hücre kültürü %10 fötal dana serum, %1 antibiyotik-antimikotik (100 U penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 1 µg/ml amfoterisin B) ve %1 L-Glutamin bulunan EMEM içerisinde 37 ^{o}C'de CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılarak monolayer olarak çoğaltıldı.

2.2.2. Virusun Çoğaltılması

Monolayer halde üretilen MA-104 devamlı hücre kültürü flaskların idame vasatları döküldükten sonra, hücre yüzeyi phosphate buffer saline-minus (PBS-M) ile yıkandı. İçerikleri döküldükten sonra %2 fötal dana serum, %1 antibiyotik-

antimikotik (100 U penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 1 µg/ml amfoterisin B) bulunan EMEM içerisine 100 µl rotavirus SA-11 suşu süspansiyonu ilave edilerek 37 ^{o}C'de CO_2'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Beşinci günün sonunda sitopatik etki (CPE) gözlenen hücre kültürlerine 2 kez dondurma-çözme işlemi uygulandı, 3000 rpm'de 10 dk santrüfüj sonrasında elde edilen süpernatantlar virus süspansiyonu olarak kullanılıncaya kadar -60 ^{o}C'de saklandı.

2.2.3. Virusun Mikrotitrasyon Yöntemi ile Titrasyonu

Virusun doku kültürü infektif dozunu ($DKID_{50}$) tespit etmek için mikrotitrasyon yöntemi kullanıldı. Bu yönteme göre; 96 gözlü mikropleyt tablasında üretilmiş MA-104 hücre kültürlerinin idame vasatı döküldükten sonra hücre yüzeyi phosphate buffer saline-minus (PBS-M) ile yıkandı. İçerikleri döküldükten sonra %2 fötal dana serum, %1 antibiyotik-antimikotik (100 U penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 1 µg/ml amfoterisin B) bulunan EMEM ilave edildi. EMEM içerisinde log10 tabanına göre sulandırılan virus süspansiyonu, her sulandırma basamağından mikrotitrasyon tablasındaki 5 göze 25'er µl konularak, 37°C' lik %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Virus kontrol gözlerine sulandırılmamış virus süspansiyonundan konuldu. Hücre kontrol gözlerinin ise sadece vasatı değiştirildi. Her gün hücrelerde meydana gelen değişiklikler doku kültürü mikroskobunda incelendi ve sonuçlar Reed-Muench (1938) metoduna göre hesaplanarak virusun titresi tespit edildi.

2.2.4. Numunelerin Hazırlanması

2.2.4.1. Kızılcık Proantosiyanidini

Kızılcık proantosiyanidini hassas terazi ile 3000 µg tartılarak üzerine 2 ml PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ilave edilerek sırası ile 5 dk vortex ve homojenizatörde homojen hale getirildikten sonra PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile sulandırılarak 1000, 500, 200 ve 100 µg/ml konsantrasyonları hazırlandı. Bu konsantrasyonları virusla 15,

30 ve 60 dk inkübe edilerek hangi konsantrasyon ve sürede antiviral aktivite gösterdiği ELISA ile araştırıldı.

2.2.4.2. Kateşin ve Epikateşin

Hassas terazide 200.000'er µg tartılan kateşin ve epikateşin 1 ml'lik methanolde çözdürüldü. Son methanol konsantrasyonu en yüksek %2.5 oranında olacak şekilde PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile seyreltilerek 10.000, 7.500, 5.000, 2.500 ve 1.000 µg/ml konsantrasyonları hazırlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Bu konsantrasyonları virusla 15, 30 ve 60 dk inkübe edilerek hangi konsantrasyon ve sürede antiviral aktivite gösterdiği ELISA ile araştırıldı.

2.2.5. ELISA

ELISA, üretici firma tarafından belirtilen prosedüre göre yapıldı. Bu amaçla test edilen her bir numune 3 göz olarak çalışıldı. Rotavirus ve sample diluent ile 1:10 oranında rotavirus süspansiyonları hazırlandı. Pozitif kontrol için eşit oranda rotavirus süspansiyonu ve PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) konuldu. Negatif kontrol için PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) konuldu. Methanol pozitif kontrol için eşit oranda rotavirus süspansiyonu ve %2.5 oranında methanol içeren PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) konuldu. Deney grubu için de rotavirus süspansiyonu ve test edilen numune eşit oranda karıştırılarak oda ısısında (20-25 ^{o}C) 15, 30 ve 60 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bu karışımdan her bir göze 100 µl bırakılarak üzerlerine 100'er µl enzim konjugat ilave edilerek oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda distile su ile 5 kez yıkanarak, 100'er µl subsrat A ve B ilave edildi. Oda ısısında 10 dk inkübe edildikten sonra 100 µl stop solüsyonu eklendi ve 450 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okundu. Okunan değerlerin aritmetik ortalaması alınıp pozitif kontrolun aritmetik ortalamasına bölünerek viral enfektivite kaybı yüzde olarak hesaplandı. Sonuçlar arasındakı farkın önemli olup olmadığı Student's t testi ile değerlendirildi.

2.2.6. Sitotoksisite Testi

ELISA sonucunda rotavirusa karşı antiviral etkisi belirlenen numunelerin etkili oldukları konsantrasyon ve süresinin hücrelere toksik olup olmadığı yönünden sitotoksisite testi ile test edildi. Test, Toxilight^{R} Bioassay kiti içerisinde belirtilen prosedure uygun olarak yapılmıştır. Mikropleyt tablasında üretilen MA-104 hücrelerinin vasatları döküldükten sonra hücre yüzeyi phosphate buffer saline-minus (PBS-M) ile yıkandı. Negatif kontrol için 150 µl PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) konuldu. Pozitif kontrol için PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile 1:3 oranında hazırlanan 150 µl Lysise Reagent Solüsyonu konuldu. Methanol pozitif kontrol için %2.5 oranında methanol içeren PBS (w/o Ca^{2+} or Mg^{2+}) konuldu. Deney gruplarına ise ELISA testi ile belirlenen numunelerin etkili oldukları konsantrasyonlardan 150 µl hücreler üzerine konularak 30 dk 37 ^{o}C'de CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda gözlere 100 µl Adenylate Kinase ilave edilerek 5 dk sonunda luminometer cihazında okunarak sonuçlar hücrelere toksik olup olmamaları yönünden değerlendirildi.

2.2.7. Rotavirusun Konsantrasyonunun Artırılması

İçerisinde 1/3 oranında absorbent kristaller içeren test tübe rotavirus süspansiyonu ilave edilerek 5 dk sonunda konsantre olan virus süspansiyonu başka bir kaba aktarılarak gold labeled immunelektron mikroskopi ve hemaglutinasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

2.2.8. Mikro - Hemaglütinasyon Testi

Test Kalica ve ark (1978)'nın hazırladığı standart prosedüre göre yürütüldü. 0.7 ml eritrosit hücreleri 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek, 9.3 ml PBS (phosphate-buffer saline w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ilave edildi. Lamellere pozitif kontrol için eşit miktarda hazırlanan eritrosit süspansiyonu, PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ve konsantrasyonu artırılan rotavirus; negatif kontrol için 1:3 oranında hazırlanan eritrosit süspansiyonu ve PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) karışımı ve deney grubu için de eşit miktarda kızılcık proanthosiyanidini ve konsantrasyonu artırılan rotavirus

konularak 30 dk 23 ^{0}C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda eşit miktarda eritrosit süspansiyonu ilave edilerek 30 dk 23 ^{0}C'de inkübasyona inkübasyona bırakıldı. Proanthosiyanidinin kırmızı kan hücre yüzeylerindeki siyalik asit reseptörlerine olan etkisini araştırmak amacı ile eşit miktarda PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ve eritrositlerle 30 dk 23 ^{0}C'de inkübasyona bırakılarak değerlendirildi.

2.2.9. Gold Labeled Immunelektron Mikroskopi

Ticari olarak temin edilen rotavirus grup spesific viral antijenine (VP6)'e karşı fare monoklonal antikorlar 1:20 oranında PBS'le (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) sulandırıldıktan sonra eşit oranda virus süspansiyonu ile 37 ^{o}C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda fare monoklonal antikorlarına karşı 5 nm'lik altın parçacıklarıyla işaretlenmiş keçi (goat-anti mouse) konjuge IgG antikorları 1:10 oranında PBS'le (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) sulandırılarak eşit oranda ilave edilerek tekrar 37 ^{o}C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol; monoklonal antikor, virus ve altınla işaretlenmiş IgG antikorları; Deneysel Kontrol; monoklonal antikor, virus, altınla işaretlenmiş IgG ve kızılcık proantosiyanidini ve Negatif kontrol sadece monoklonol antikor ve virus konularak yukarıda anlatılan şekilde hazırlanarak 30 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Tüm bu örnekler plastik bir zemin üzerine damlatılarak üzerlerine formvar kaplı bakır gridler kapatıldı. Bir dakika %1'lik sulu uranyum asetatla negatif boyama yapılarak Transmisyon Elektron Mikroskobunda incelendi.

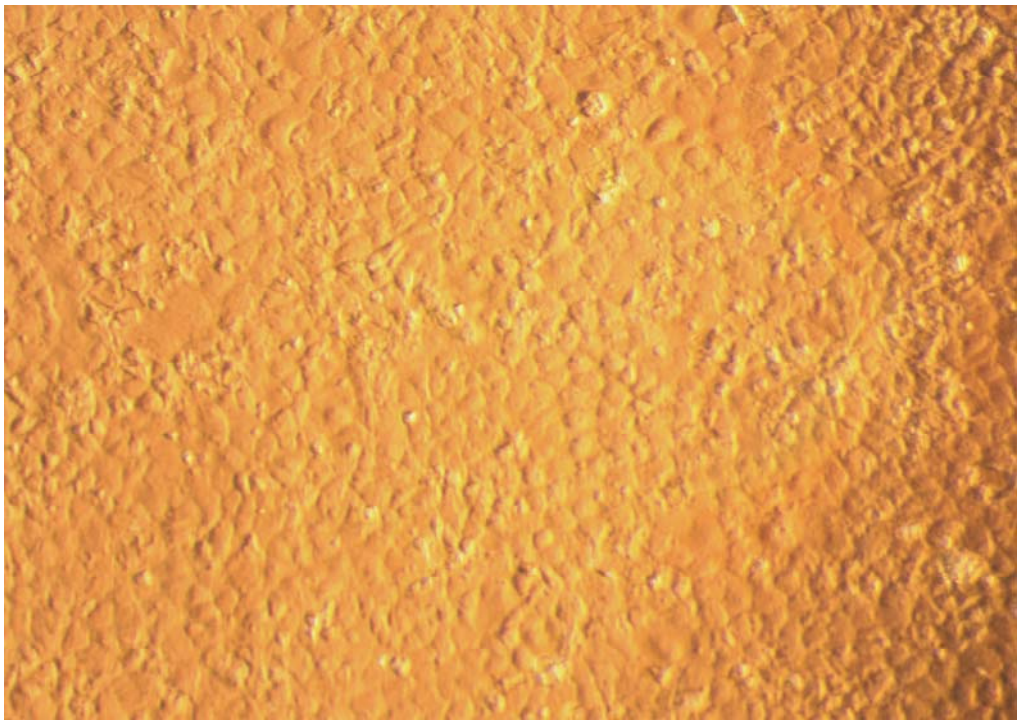
2.2.10. İstatiksel Değerlendirme

Araştırmada her bir deney 3 kez yapılmıştır. Çalışma sonuçlarının aritmetik ortalamaları alınmıştır. Elde edilen sonuçların aralarındaki farkın önemli olup olmadıkları Student's t testi ile değerlendirilmiştir. $P<0.05$ istatistiki açıdan önemlidir.

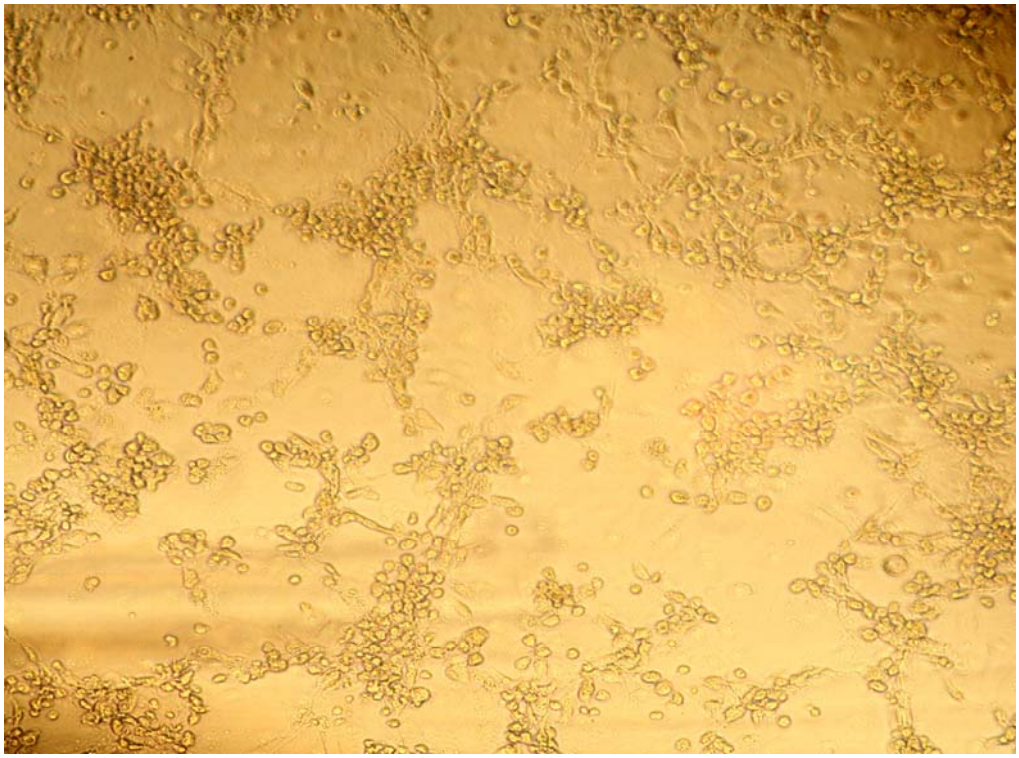
3. BULGULAR

3.1. Virus

Rotavirus SA-11 suşu MA-104 hücre kültürlerine yapılan inokulasyon sonucunda, hücre kültürlerinde 5. günde karakteristik sitopatik effekt (CPE) oluşumu gözlendi (Resim 3.2). Virus inokulasyonu yapılmayan MA-104 hücre kültürleri 'hücre kontrol' olarak kullanıldı (Resim 3.1).



Resim 3.1. MA-104 Hücre kültürü kontrol.



Resim 3.2. MA-104 Hücre kültüründe rotavirus SA-11 suşuna özgü CPE (5. gün).

3.2. Virusun Titresi

Rotavirus SA-11 suşunun MA-104 hücre kültürlerine mikrotitrasyon yöntemi ile CPE yönünden 5-7 gün boyunca kontrolü yapılarak enfeksiyözite gücü 100DKID_{50}/ml: $7.2x10^{-2}$ /ml olarak tespit edildi.

3.3. ELISA Sonuçları

Kızılcık proantosiyanidinin 30 dk Rotavirus SA-11 suşu ile inkübasyonu sonucunda 200 µg/ml konsantrasyonunun %91.2 oranında, 100 µg/ml konsantrasyonunun ise %56 oranında viral enfektivite kaybına neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Sonuçlar istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($p=0.002$, $p=0.001$).

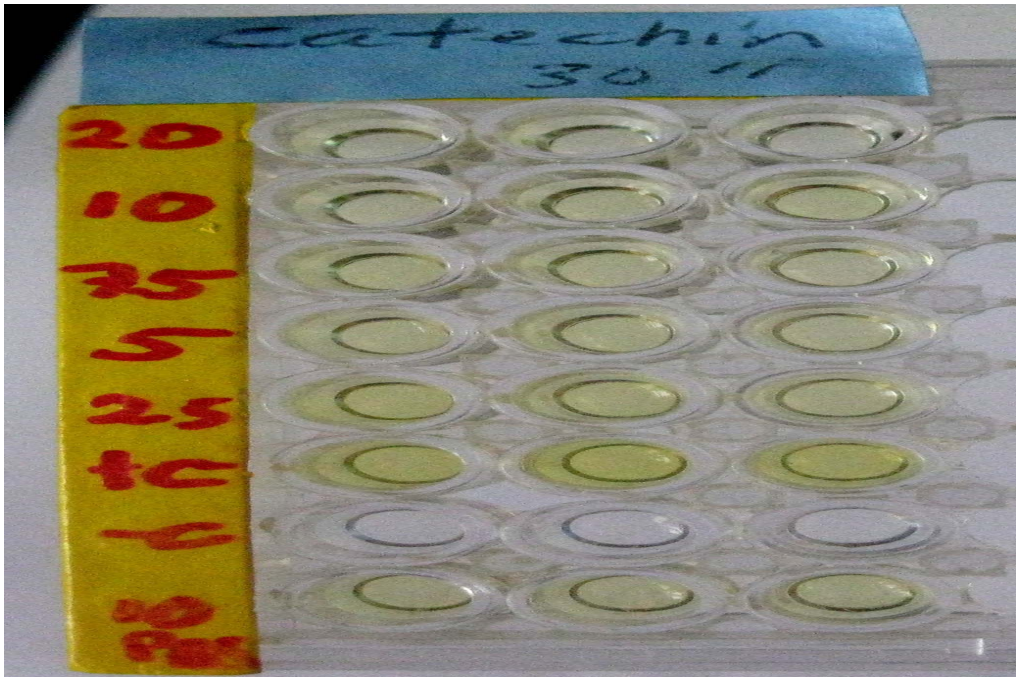
Çizelge 3.1.Kızılcık Proanthosiyanidini-Rotavirus SA-11 suşu ELISA Sonucu

Kızılcık Proantosiyanidini	1. göz	2. göz	3. göz	Ortalama Değerleri	Viral Enfektivite Kaybı(%)
200 µg/ml	0.069	0.062	0.089	0.073	%91.8
100 µg/ml	0.355	0.305	0.519	0.393	%56
Pozitif Kontrol	0.931	0.885	0.866	0.894	-
Negatif Kontrol	0.057	0.062	0.060	0.059	-

Kateşin 10.000 µg/ml ve 5.000 µg/ml konsantrasyonları sırası ile %22 ve %26 oranında enfektivite kaybına neden olmuştur (Çizelge 3.2). Sonuçlar istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (p=0.010 ve p= 0.000). Phosphate buffer saline (w/o Ca^{2+} or Mg^{2+}) pozitif kontrol ile %2.5 methanol ihtiva eden PBS (w/o Ca^{2+} or Mg^{2+}) pozitif kontrol arasında istatistiksel fark bulunamamıştır (p=0.536).

Çizelge 3.2. Kateşin- Rotavirus SA-11 suşu ELISA Sonucu

Kateşin	1. göz	2. göz	3. göz	Ortalama Değerleri	Viral Enfektivite Kaybı(%)
10.000 µg/ml	0.622	0.642	0.533	0.599	% 22
5.000 µg/ml	0.555	0.574	0.572	0.567	% 26
PozitifKontrol%2.5M	0.742	0.764	0.795	0.767	-
Pozitif Kontrol	0.782	0.749	0.824	0.785	-
Negatif Kontrol	0.072	0.070	0.068	0.070	-



Resim 3.3. Kateşin Rotavirus SA-11 suşu ELISA

Epikateşin 10.000 µg/ml ve 5.000 µg/ml konsatrasyonları % 50 ve %27 oranında viral enfektivite kaybına neden olmuştur (Çizelge 3.3). Sonuçlar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (p=0.003ve p= 0.004).

Çizelge 3.3. Epikateşin Rotavirus SA-11 suşu ELISA Sonucu

Epikateşin	1. göz	2. göz	3. göz	Ortalama Değerleri	Viral Enfektivite Kaybı(%)
10.000 µg/ml	0.304	0.477	0.466	0.416	%50
5.000 µg/ml	0.643	0.595	0.582	0.607	%27
PozitifKontrol(%2.5M)	0.813	0.782	0.885	0.827	-
Negatif Kontrol	0.066	0.064	0.065	0.065	-

3.4. Sitotoksisite Sonucu

ELISA testi sonucunda etkinliği tespit edilen 200 µg/ml kızılcık proantosiyanidini, 10.000 µg/ml ve 5.000 µg/ml epikateşin ve kateşin 30 dk'lık inkübasyonu sonucu okunan değerlerin negatif kontrolün altında olması sonucu hücrelere toksisitesinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5).

Çizelge 3.4. Kızılcık Proantosiyanidini Sitotoksisite testi sonucu

	1. göz	2. göz	3. göz	Ortalama Değerleri
Kızılcık Proantosiyanidini200 µg/ml	67	53	37	52
Negatif Kontrol	1560	1277	2167	1668
Pozitif Kontrol	25957	26296	25350	25867

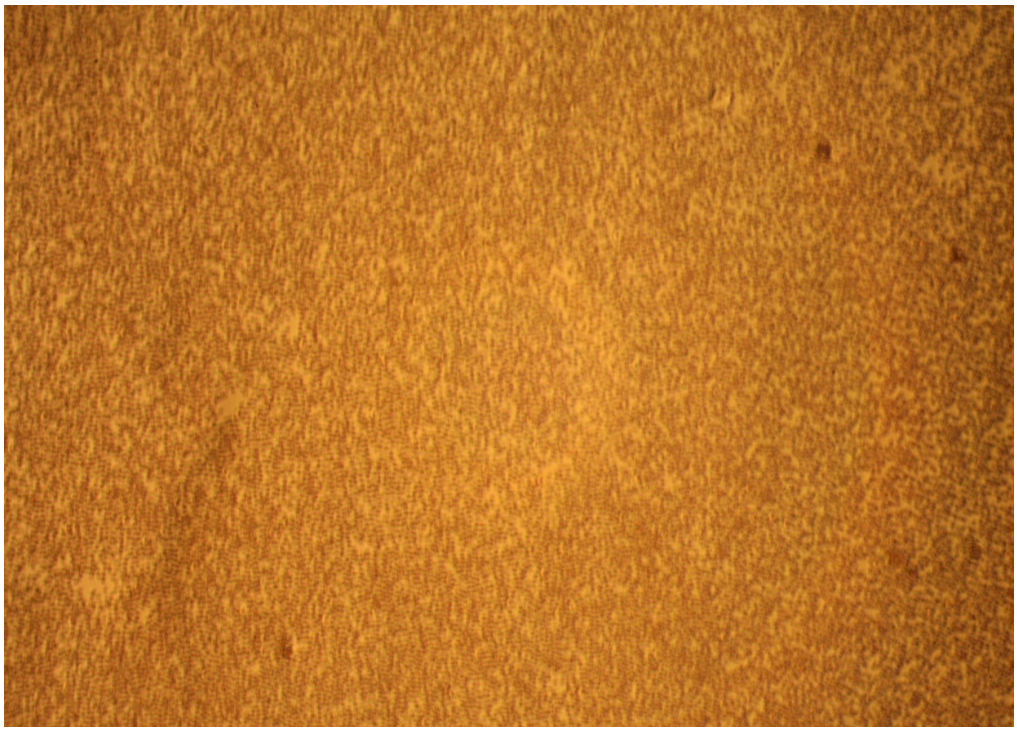
Çizelge 3.5. Epikateşin ve Kateşin Sitotoksisite testi sonuçları

	1. göz	2. göz	3. göz	Ortalama Değerleri
Epikateşin 10.000 µg/ml	43	60	68	57
Epikateşin 5.000 µg/ml	164	234	115	171
Kateşin 10.000 µg/ml	49	21	47	39
Kateşin 5.000 µg/ml	31	37	37	35
Negatif Kontrol	2128	2507	3244	2626
Negatif Kontrol(%2,5'lik Methanol)	3409	2558	2952	2973
Negatif Kontrol (%5'lik Methanol)	3198	4383	4134	3905
Pozitif Kontrol (% 2,5'lik Methanol)	51416	49125	47219	49253
Pozitif Kontrol (%5'lik Methanol)	45271	46306	46323	45667
Pozitif Kontrol(%2.5'likMethanol+PBS)	3409	2558	2952	2973
Pozitif Kontrol(%5'likMethanol+PBS)	3198	4383	4134	3905

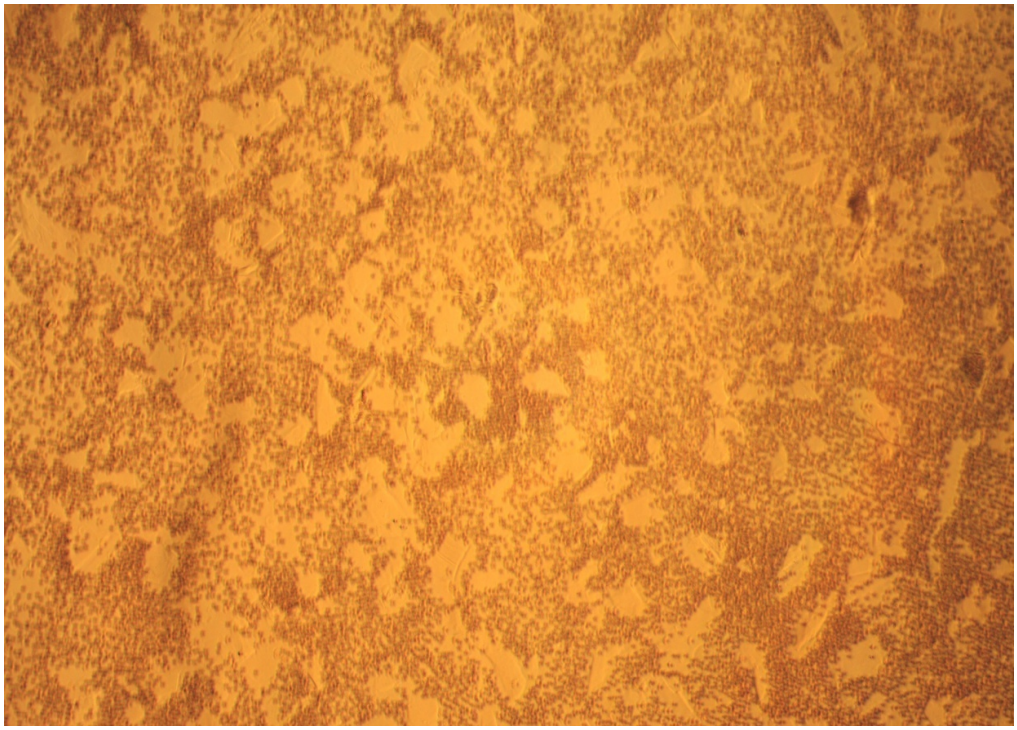
3.5. Mikro-Hemaglütinasyon Sonucu

Kızılcık proantosiyanidini ile rotavirus SA-11 suşu 30 dk 23 ^{0}C'de inkübe edildikten sonra eritrositlerle hemaglütinasyonun gerçekleşmediği gözlendi (Resim3.6).

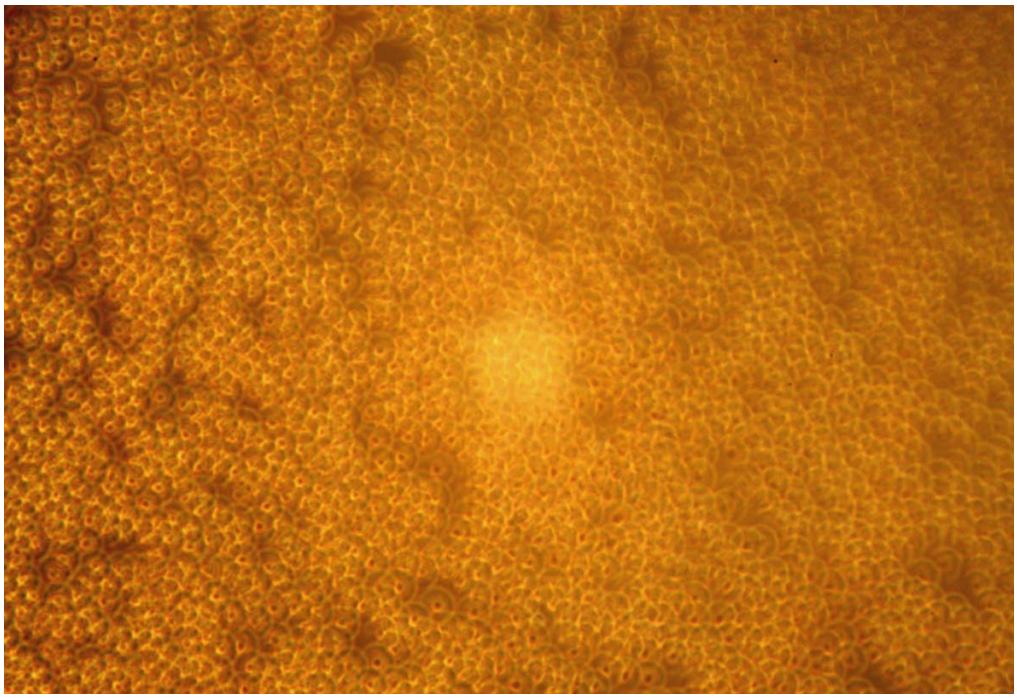
Kızılcık proantosiyanidini, PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ve eritrosit süspansiyonu ile inkübasyonu sonucu da hemaglütinasyon negatif olarak gözlendi.



Resim 3.4. Negatif kontrol; eritrosit süspansiyonu ve PBS.



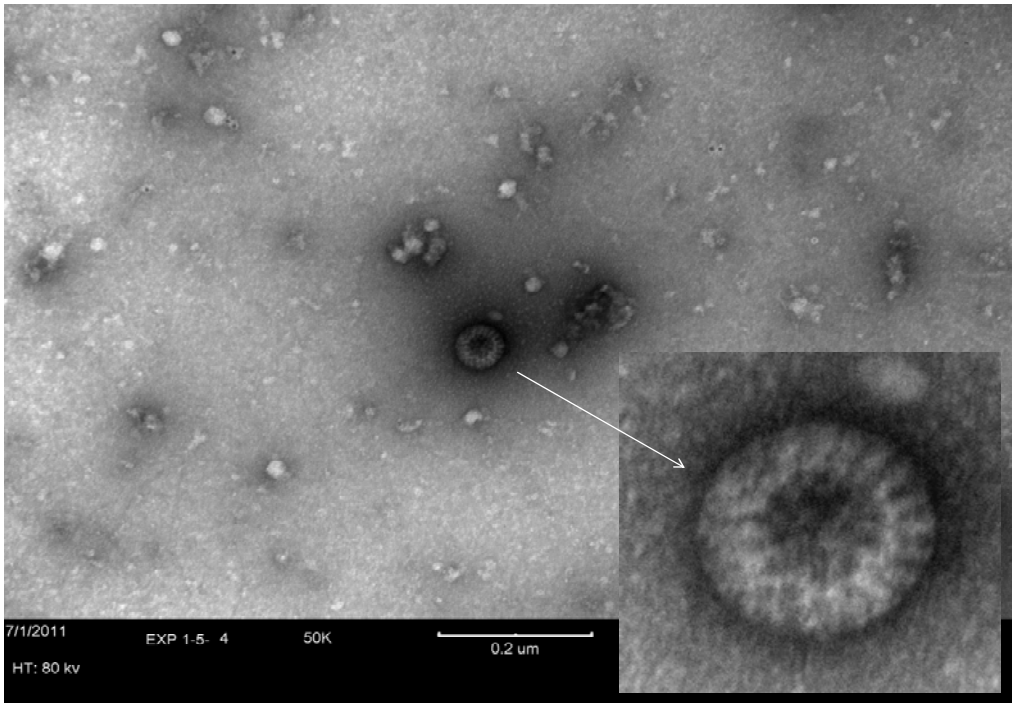
Resim 3.5. Pozitif kontrol; eritrosit süspansiyonu, PBS ve konsantrasyonu artırılan rotavirus SA-11 suşu.



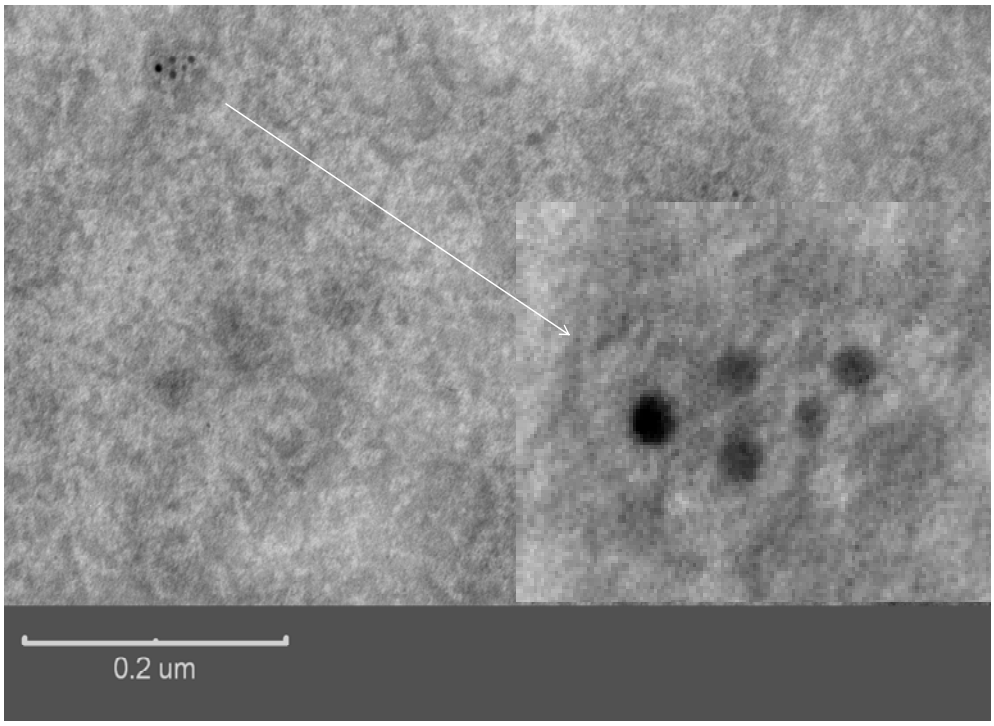
Resim 3.6. Deney grubu; eritrosit süspansiyonu, kızılcık proantosiyanidini ve konsantrasyonu artırılan rotavirus SA-11 suşu.

3.6. Gold Labeled Immunelektron Mikroskopi Sonucu

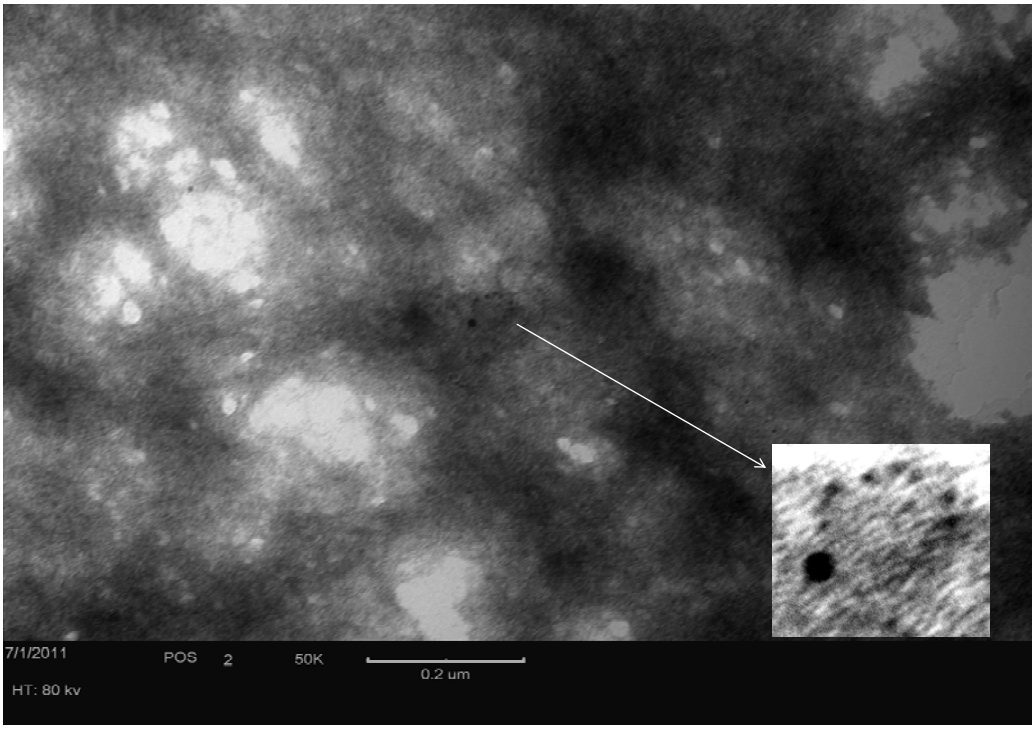
Gold Labeled Immunelektron Mikroskopi sonucunda virus partiküllerinin kızılcık proantosiyanidinlerinin içinde hapsolduğu gözlenmiştir (Resim3.10).



Resim 3.7. Negatif kontrol, Rotavirus SA-11 suşu



Resim 3.8. Pozitif Kontrol, Gold labeled Rotavirus SA-11 suşu



Resim 3.10. Deney grubu, Proantosiyadinlerin içerisine hapsolmuş gold- labeled ile işaretlenmiş Rotavirus SA-11 suşu

4. TARTIŞMA

Bitkiler ve bitkisel ürünlerin (meyve suları, ekstraktları) antimikrobiyal ve antiviral etkileri araştırıcılar tarafından uzun yıllardan beri ilgi odağı olmaktadır. Besinler ve bu besin ürünlerinin doğal antimikrobiyal ve antiviral etkileri in vitro ve in vivo ortamlarda çalışılmaktadır (Jassim ve Naji 2003).

Son yirmi yıldır toplumun beslenme ve besin bilimine olan ilgisi gün geçtikçe artmaktadır. Uluslararası ve ulusal düzeyde çok sayıda organizasyonlar besin bilimi ve beslenme üzerinde yapılan çalışmalara destek vermektedir (Food ve Nutritional Information Center 2005).

Besinlerdeki doğal antiviral aktiviteleri araştırmaya yönelik bilimsel ilgi ise 1970'lerde Konawalchuk ve Spears'ın (1978) yaptığı çalışmalara dayanmaktadır.

Günümüzde otuzun üzerinde antiviral ilaç olmasına rağmen bu ilaçların her zaman etkili olmadığı düşünülmektedir. İlaçlara karşı artan dirençli suşlar nedeniyle yeni antiviral ilaçlara olan ihtiyaç da artmaktadır. Bu nedenle ileriki araştırmalar günümüz ilaçlarına göre yan etkisi daha az olan bileşikler geliştirmeye odaklanmalıdırlar. Bu duruma olası çözüm yolları ise bitkiler, bakteriler, deniz faunası ve florası gibi doğal kaynaklardan antiviral ürünlerin elde edilmesi üzerine geliştirilmelidir. Antiviral doğal ürünler üzerine yapılan araştırmalar enfeksiyonlara karşı geleneksel tıpta kullanılan bitkiler üzerine yoğunlaşmıştır (Kinghorn 2001).

Antiviral kemoterapide doğal ürünlerin kullanılan en önemli kaynak olduğu rapor edilmiştir (Potterat ve Hamburger 2008). Bu umut verici aktiviteye sahip doğal bileşikler direkt ilaç olarak ya da ilaç sentezinde kullanılabilmektedirler. Bu nedenle son yıllarda antiviral aktiviteye sahip bileşiklerle ilgili çalışmaların sayısında artma sağlanmıştır (Martin ve Ernst 2003).

Middleton ve ark (2000), yaptıkları çalışmalar sonucu çeşitli otlar ve yenilebilir bitki ürünlerindeki flavonoidlerin (proantosiyanidinlerin) in vitro ve in vivo ortamlardaki antiviral etkisinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bitkiler ve onların içeriğindeki proantosiyanidinlerin çok sayıda bakteri ve hayvan viruslarında enfektivite kaybına neden olduğu bir çok çalışmada yayınlanmıştır (De Bryne ve ark 1999, Iwasawa ve ark 2009, Lipson ve ark 2007b, 2010, Su ve ark 2010a).

Enterik viruslar içerisinde rotaviruslar ağır diyareye sebep olan ve %30- 80 oranında pediatrik hastaneye yatırılışların başlıca nedenidirler. Enfeksiyon asemptomik seyrettiği gibi hafif kusma ve diyare bazende şiddetli dehidrasyon meydana gelmektedir. Şu an da kullanılan tedavi yöntemi dehidrasyon ve diyare esnasında ve sonrasındaki zararı telafi etmeye yöneliktir. Milyonlarca yenidoğan canlıyı enfekte eden ve salgın ishallere neden olan rotaviruslara karşı etkili bir ilaç yoktur (D'Agostino 2008).

Kızılcık suyu ve proantosiyanidinin in vitro ve in vivo ortamlarda enterik ve rotaviruslar üzerinde antiviral etki gösterdiği birçok çalışmada rapor edilmiştir (Lipson ve ark 2007a, Lipson ve ark 2007b, Lipson ve ark 2011, Lynch 2004). Çalışmalar göstermiştir ki, kızılcık suyu ve kızılcık ürünleri bakteriyel adhezyonları azaltarak üriner sistem enfeksiyonlarının önlenmesine yardımcı olabilmektedir (Avorn ve ark 1994, Kerr 1999, Kontiokari ve ark 2001, Lynch 2004, Greenberg ve ark 2005, Stothers ve Brown 2007, Liu ve ark 2008, Pinzon-Arango ve ark 2009). Benzer etkileri mide lumeninde *Helibacter pylori* enfeksiyonlarını önleyerek de yaptığı bildirilmiştir (Zhang ve ark 2005, Shmuely ve ark 2007, Matsushima ve ark 2008). Kızılcık suyunun aynı zamanda E.coli, Salmonella ve Listeria gibi birçok patojen üzerine etki ettiği rapor edilmiştir (Noguira ve ark 2003, Pedigo ve ark 2007, Wu ve ark 2008).

Min ve Hart (2003), ise yemlere katılan proantosiyanidinlerin gastrointestinal parazitleri kontrol etmede potensiyel bir yardımı olabileceğini ileri sürerek, tavsiye etmişlerdir.

Kızılcık proantosiyanidinlerin yapısal olarak tanin yönünden zengin besinlerden farklı olduğu, nadir raslanan A tipi bağa sahip olduğu ve diğer besinlerde bulunan proantosiyanidinlerde ise B tipi bağın bulunduğu bildirilmiştir (Howell ve ark 2005). Howell ve ark (2005) yaptıkları çalışmalarda kızılcık suyu kokteylinin insanlarda özellikle idrar yollarında anti adhezyon aktivitesi gösterdiğini, ancak B tipi proantosiyanidin içeren besinlerin tüketiminde bu durumun gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Weiss ve ark (2005) ise kızılcığın Influenza virusunun adhezyonunu inhibe ettiğini ve viral enfektivite kaybına sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Lipson ve ark (2010) tarafından yapılan bir araştırmada, rotavirusun hücreye inokulasyonundan önce kızılcık suyuyla muamelesi sonucu virusun hücreye

adsorbsiyonunun engellendiği bildirilmiştir. Diğer taraftan rotavirusun hücreye inokulasyonundan sonra kızılcık suyuyla muamelesi sonucu TEM'de incelendiğinde, virusun hücre içerisinde tutsak kaldığı ve viral salınımının inhibe edildiği rapor edilmiştir. Araştırıcılar, hayvan modelleri üzerinde yaptıkları bu çalışmada, oral yolla (gavajlarla) ratlara eşit oranlarda kızılcık suyu ve üzüm suyu ile muamele edilmiş rotavirus vermişlerdir. Sadece virus verilen pozitif kontrol hayvanında sistemik hemorajiler, diyare, dehidrasyon ve 4. günün sonunda ölüm meydana gelmiştir. Üzüm suyu ile muamele edilmiş rotavirus verilen ratların kolon histolojisinde küçülmüş mukoza, müsini tükenmiş goblet hücreleri, bazı inflamasyon odakları ve ölmüş hücreler gözlenirken, kızılcık suyu ile muamele edilmiş rotavirus verilen ratın kolonunda normal mukoza, sağlıklı goblet hücreleri ve yoğun dışkı görülmüştür. Sonuç olarak, memeli enterik viruslarına karşı bu iki meyve suyunun kliniksel koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir.

Lipson ve ark (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise kızılcık suyunun, rotavirusların hücreleri bir arada tutan ve bariyer görevi yapan tight junction üzerindeki yıkıcı etkisini azalttığı rapor edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, bu doğal ürünlerin antiviral etkilerinin birincil olarak doğrudan konakçıya mı etki ettiği yoksa aynı anda hem virus hemde konakçıya mı etkili olduğu net bir şekilde ifade edilmemiş, proantosiyanidin ve memeli enterik viruslari arasındaki ultrastrüktürel etkileşim açık bir şekilde tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, virusun enfektivite titresinde karışıklığa neden olabilecek verileri elimine etmek için hücresiz deney sistemi kullanılarak kızılcık proantosiyanidini, kateşin ve epikateşinin rotavirus SA-11 suşuna olan direkt etkisi incelenmiştir. Meydana gelen viral enfektivite kaybını araştırmak üzere ELISA, sitotoksisite, mikro-hemaglütinasyon testleri ve gold labeled immunelektron mikroskopi yöntemi kullanılmıştır.

Rotavirus partiküllerinin en önemli yapısal kısmı VP6 proteinidir. İç kapsitinde yer alan viral kapsid protein 6 (VP6), virusun en önemli immunojenik proteini olup, grup spesifik antijen özelliği göstermektedir (Estes ve Cohen 1989). VP6 proteinin kaldırılması ile polimeraz aktivitesi kaybolur (Widdowson ve ark 2001). ELISA enfeksiyöz rotavirus partiküllerine olan hassasiyeti nedeni ile viral enfektivite titrasyonunu belirlemede, biyomedikal araştırmalarda ve klinik

ortamlarda kullanılmaktadır (Lipson ve ark 1989, 1990, 1992, 2001, 2011, Liu ve ark 2011 ve Tran ve ark 2010). Günümüzde bir çok araştırıcı (Liu ve ark 2011 ve Lipson ve ark 2011) viral kapsit bütünlüğündeki kaybı nicel olarak ölçmek için rotavirus grup spesific viral antijenine (VP6) duyarlı ELISA (Enyzme Linked Immunosorbent Assay)'dan yararlanmıştır. Bu çalışmada, rotavirus SA-11 suşu ile kızılcık proantosiyanidini ve kızılcık proantosiyanidinlerini meydana getiren kateşin ve epikateşin karışımının VP6 proteinine olan antiviral aktivitesini belirlemek amacıyla ELISA uygulanmıştır. ELISA sonucunda kızılcık proantosiyanidinin 30 dk rotavirus SA-11 suşu ile inkübasyonun 100 µg/ml'sinin rotavirus SA-11 suşuna karşı %56 oranında, 200 µg/ml'sinin ise %91.8 oranında antiviral etki gösterdiği tespit edilmiştir. Hücresiz süspansiyonda viral kapsid antijen (VP6) kaybı oranı artan kızılcık proantosiyanidini konsantrasyonuna göre devamlı olarak azalmıştır. Kateşin ve epikateşinin 10.000 µg/ml ve 5.000 µg/ml konsantrasyonları %22- 26 ve %50-27'lik viral enfektivite kaybına neden olmuştur.

Araştırmada, ELISA sonucunda rotavirusa karşı antiviral etkisi belirlenen numunelerin etkili oldukları konsantrasyon ve süresinin hücrelere toksik olup olmadığı yönünden sitotoksisite testi ile test edildi. Çalışılan kızılcık proantosiyanidini, kateşin ve epikateşin konsantrasyonlarının 30 dk'lık inkübasyonu sonucu okunan değerlerin negatif kontrollün altında olması nedeniyle, MA-104 monolayer hücre kültüründe hiçbir sitotoksik etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir.

Kateşin ve epikateşinin çalışılan bu konsantrasyonları %90'nın altında viral enfektivite kaybına neden olduğu için ve ayrıca artırılacak konsantrasyonlarının olası toksisite meydana getirebilme ihtimali nedeniyle antiviral aktivitelerinin araştırılmasına devam edilmemiştir. Çalışma kızılcık proantosiyanidinin antiviral aktivitesinin mekanizmasının mikrohemaglütinasyon ve gold labeled immunelektron mikroskopi yöntemi ile sürdürülmüştür.

Dış kapsid proteini olan VP4, virusun enfektifitesinden sorumludur. Konakçı hücreye bağlanma, hemaglütinin ve nötralizan aktivitesi gibi görevleri vardır (Mattion ve ark 1994). ELISA testi sonucunda antiviral etkisi belirlenen kızılcık proantosiyanidinin 200 µg/ml konsantrasyonunun rotavirusun viral antijenik determinantına (dış viral kapsid protein 4) ve kırmızı kan hücre yüzeylerindeki siyalik asit reseptörlerine etkisini araştırmak amacı ile kobay eritrositleri ile

çalışılmıştır. İki yüz µg/ml kızılcık proantosiyanidinin rotavirus SA-11 suşu ve kırmızı kan hücreleriyle 30 dk'lık ön muamelesi sonucu hemaglütinasyon negatif olarak gözlenmiştir. Bu sonuç proantosiyanidinin hem viral antijenik determinantları (dış viral kapsid protein 4) hem de kırmızı kan hücre yüzeylerindeki siyalik asit reseptörlerini kapatması sonucu hemaglütinasyonu inhibe ettiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, rotavirus grup spesifik viral antijeni olan VP6'ya karşı fare monoklonal antikorları ve bu fare monoklonal antikorlarına karşı keçilerden elde edilen 5 nm'lik altın parçacıklarıyla işaretlenmiş konjuge IgG antikorları uygulanarak gold labeled immunelektron mikroskopi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, rotavirus SA-11 suşunun hızlı ve kesin tespit edilmesinin yanısıra kızılcık proantosiyanidinleri ile rotavirus SA-11 suşu arasında meydana gelen viral enfektivite (VP6) kaybının aydınlatması bakımından oldukça önem taşımaktadır. Gold labeled immunelektron mikroskopi tekniğinde deneysel kontrol; monoklonal antikor, virus, altınla işaretlenmiş IgG ve kızılcık proantosiyanidini ile hazırlanmıştır. Etrafı altın parçacıklarıyla işaretlenmiş rotavirus SA-11 suşunun kızılcık proantosiyanidinleri tarafından etrafının sarıldığı ve içerisine hapsolduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrolde ise monoklonal antikor, virus ve altınla işaretlenmiş IgG antikorlar ile hazırlanan karışımda virusun kapsid kenarı altınla işaretlenmiş olarak tespit edilirken, monoklonal antikor ve virus konularak hazırlanan negatif kontrolde sadece virus gözlenmiştir.

Li ve ark(2009)'nın rotavirus ve proantosiyanidinleri üzerine yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri karışımı TEM'de incelemişlerdir. Sonuç olarak, rotavirus kapsid kanallarının güçlükle tanındığını ve yüzeylerindeki spikeların kaybolduğunu tespit etmişlerdir.

Su ve ark (2010a) insan enterik virusları üzerine kızılcık suyu ve kızılcık proantosiyanidinlerinin etkilerini incelemek üzerine Murine norovirus (MNV-1), feline calicivirus (FCV-F9), MS2(ssRNA) ve phX-174(ssDNA) bakteriyofajları ile bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada yüksek ($7 \log_{10}$ PFU/ml) yada düşük ($5 \log_{10}$ PFU/ml) titrelerdeki viruslar eşit miktarlardaki kızılcık suyu ve kızılcık proantosiyanidin konsantrasyonları ile karıştırılmıştır. 1 saat oda ısısında inkübe edilen karışımın viral enfektivitesi plak testi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak yüksek titrelerdeki viruslarda bile viral enfektivite kaybına neden olan bu ürünlerin

doğal bir antiviral olarak kabul edilebileceği ve viral hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılabileceği tavsiye edilmiştir.

Lipson ve arkadaşları (2011) yaptıkları immunelektron mikroskobi çalışmasında, rotavirus SA-11 suşunun kızılcık proantosiyanidinlerle kompleks oluşturduğunu, viruslerin kümeleştiğini ve proantosiyanidinin içine hapsolduğunu göstermişlerdir. Virusun kümeleşmesi ve ayrışması viral enfektiviteyi değiştirici bir faktördür (Fattal ve ark 1977, Floyd ve Sharp 1978). Olası mekanizma olarak proantosiyanidin fenolik gruplarının virus kapsid proteinlerini meydana getiren prolin aminoasidine bağlandığı ileri sürülmüştür.

Proantosiyanidinlerin süspansiyone haldeyken, proteinlere bağlandığı ve çökelttiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Jöbstl ve ark 2004; Martin ve Martin 1982). Gold labeled immunelektron mikroskopi çalışması ile birlikte virusların kızılcık proantosiyanidinlerin içine hapsolmasının rotavirus kapsidindeki prolin aminoasitlerine proantosiyanidinlerin bağlanması sonucu olduğu düşünülmektedir (Hagerman ve Butler 1981; Lipson ve ark 2011). Proantosiyanidin ve protein kompleksleri arasında artan hidrojen bağları nedeni ile proantosiyanidinlerin prolin aminoasidince zengin proteinlerle birleşme eğilimi olduğu ileri sürülmüştür (Hagerman ve Butler 1981). Virus kapsid proteinindeki prolin aminoasidince zengin tekrar eden segmentler çeşitli viral gruplar arasında sıkça görülmektedir (Aliperti ve Schlesenger 1978, Fitzon ve ark 2000, Yamashita ve ark 2009, Yang ve Baines 2009). Özellikle rotaviruslar prolin aminoasidince zengin kapsid proteinine sahiptirler (Estes ve ark 1984). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Lipson ve ark. (2011) tarafından yapılan araştırmada belirlenen bulgularla benzer bulunmuştur. Elde edilen bulgular doğrultusunda, proantosiyanidinin virusun antijenik determinantlarına bağlanması nedeniyle viral enfektivite kaybına sebep olduğu düşünülmektedir.

Su ve ark (2010b) Murine norovirus (MNV-1), feline calicivirus (FCV-F9), MS2(ssRNA) ve phX-174(ssDNA) bakteriyofajları ile muamele ettikleri kızılcık suyu ve kızılcık proantosiyanidinlerinin meydana getirdiği yapısal değişiklikleri Transmission electron microscopy (TEM)' de incelemişlerdir. Araştırıcılar çalışılan tüm viruslarda viral enfektivite kaybını tespit ederken, bazı viruslarda enfektivite kaybını daha düşük bulmuşlardır. Örneğin, MNV-1 deki enfektivite kaybı, FCV-

F9'daki enfektivite kaybına göre daha düşük tespit edilmiştir. Bu durum, virusların farklı çevre şartlarına ve farklı kimyasallara karşı daha dirençli olmaları ve test edilen virusların izoelektrik noktalarının (pl's) farklı olması ile açıklanmıştır. Bu çalışmada ise kızılcık proantosiyanidinlerinin sadece rotavirus SA-11 suşu üzerine antiviral etkisi çalışıldığı için herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada, 200 µg/ml kızılcık proantosiyanidini (tip A) hücresiz ortam ve hücresiz süspansiyon deney sisteminde %91.8 oranında viral enfektivite kaybına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle kızılcık proantosiyanidinin oldukça etkili bir antirotavirus bitki metaboliti olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçların kızılcık proantosiyanidinin kimyasal yapısından kaynaklandığı ve viral partiküllerin antijenik determinantlarına (VP4 ve VP6) bağlanması sonucu olduğu düşünülmektedir. Viral enfektivite kaybı ve virus kapsid bütünlüğünde meydana gelen yıkım ELISA sonuçları ile ortaya konmuştur. Bu bulgular mikro-hemaglütinasyon ve gold labeled immun elektron mikroskobu çalışması sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Bu çalışma ile kızılcık proantosiyanidinlerin rotavirus kapsid bütünlüğüne etki ettiği belirlenmiştir. Bu durumun virusun antijenik determinantlarını (VP4 ve VP6) etkisiz hale getirmesi sonucu rotavirus enfektivitesini önlemesi nedeniyle meydana geldiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, ilk kez hücresiz deney sistemi kullanılmış, böylece virusun enfektivite titresinde karışıklığa neden olabilecek veriler elimine edilmiştir. Rotaviruslar ve kızılcık proantosiyanidinleri arasındaki direkt etkileşim sonucu meydana gelen viral enfektivite kaybı ELISA, mikro-hemaglütinasyon ve gold labeled immunelektron mikroskopi yöntemi ile ortaya konulmuştur. Kızılcık ve kızılcık proantosiyanidinlerinin antiviral etkisi üzerine çok sayıda çalışma bulunmadığı için, elde edilen bulguların tamamı üzerine bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Araştırmada elde edilen bulgular sonucu kızılcık proantosiyanidini gibi bitki ekstraktlarının viral enfektivite kaybına neden olduğu bir kez daha ortaya konmuştur. Bu bulgular doğrultusunda planlanacak çalışmalarda, hayvan deneyleriyle birlikte bitkisel ekstraktların antiviral etkisinin kemoterapötik uygulamalara katkısı araştırılacaktır. Elde edilmesi muhtemel sonuçların daha etkili antiviral ilaçların geliştirilmesi konusunda bir katkı sağlayacağı tahmin edilmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kızılcık Proantosiyanidinlerinin ve Molekuler Bileşenlerini Meydana Getiren Kateşin ve Epikateşinin Anti-Rotavirus Aktivitesinin Araştırılması

Fatma Saliha ÖZEN

Viroloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2012

Flavonoidlerin (ikincil bitki metabolitleri) duyarlı konaklardaki antiviral aktivitesi enfektivite titrasyon testi ile gösterilebilmektedir. Ancak, hücresiz test sisteminde flavonoidlerin dogrudan virus enfektivitesi/kapsit bütünlüğüne olan etkisine yönelik henüz bir çalışma bildirilmemiştir.

Bu çalışma proantosiyanidin ve proantosiyanidinin yapısal olarak farklı molekül bileşenleri olan kateşin [(+)- Catechin hydrate] ve epikateşinin [(-)- Epicatechin; EC] antiviral aktivitesini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Simian rotavirus SA-11 suşu (ATCC VR-1565) temsili bir enterik viral sistem için kullanılmıştır. Antigen capture [viral kapsid protein 6 (VP6)] enzyme immunoassay (ELISA), rotavirusun proantosiyanidin, kateşin ve epikateşin ile muamelesi sonucu viral enfektivite/kapsit bütünlüğünde meydana gelen kaybı ölçmek için kullanıldı. Rotavirus enfektivite titresi, monkey kindey (MA-104) monolayer hücre kültürleri kullanılarak tespit edilmiştir. ELISA sonucunda rotavirusa karşı antiviral etkisi belirlenen numunelerin etkili oldukları konsantrasyon ve süresinin hücrelere toksik olup olmadığı sitotoksisite testi Toxilight^{R} Non-Destructive Cytotoxicity BioAssay (Lonza) ile belirlendi. Araştırmada, Gold labeled immunelektron mikroskopi, virus-proantosiyanidin komplekslerinin mikroskop altında inceleyebilmek için kullanılmıştır. Kırmızı kan hücreleri ve rotaviruslar arasındaki hemaglutinasyonu proantosiyanidinlerin inhibe etme yeteneklerinin olup olmadığını belirlemek için mikrohemaglütinasyon testinden yararlanılmıştır.

İkiyüz ve 100 ug/ml kızılcık proantosiyanidini sırasıyla %91.8 ve %50 oranlarında virus enfektivite kaybına neden olmuştur. Proantosiyanidin bileşenlerinden flavan-3-ol monomerleri olan kateşin ve epikateşinin yüksek konsantrasyonları (5.000 ve 10.000 ug/ml) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en fazla %30-50'ye varan rotavirus enfektivite kaybına sebep olmuştur. İkiyüz ug/ml proantosiyanidin konsantrasyonu ile muamele edilen rotavirusların hemaglütinasyon yetenekleri üzerinde proantosiyanidinlerin inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir. Rotavirus antijenik determinantlarının kırmızı kan hücrelerindeki sialik asit reseptörüne bağlanmasını

proantosiyanidinlerin inhibe ettiği düşünülmektedir. Gold labeled immunelektron mikroskopi çalışmasında rotavirus parçacıkları proantosiyanidinler tarafından sarıldığı, hapsolduğu Transmisyon Elektron Mikroskobunda (TEM) gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan proantosiyanidinler, kateşin ve epikateşin konsantrasyonları MA-104 monolayer hücre kültüründe sitotoksisite göstermemiştir.

Bu çalışmada elde edilen verilerle ilk kez hücresiz deney sistemi kullanılarak rotavirus enfektivite/kapsit bütünlüğüne olan direkt antiviral etkisi gösterilmiştir. Kateşin ve epikateşin proantosiyanidinin bileşenleri olmasına rağmen, tek tek test edildiğinde minimal etkili olduğu, bileşik haldeyken daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Anti-rotavirus aktivitesi; Epikateşin; Kateşin; Kızılcık Proantosiyanidini; Rotavirus SA-11.

7. SUMMARY

Investigations into Anti-Rotavirus Activity of Cranberry Proanthocyanidins and this Molecule's Component of Catechin and Epicatechin

Flavonoids (secondary plant metabolites) display antiviral activity upon infectivity titration testing in susceptible hosts. However, no studies have reported the direct loss of virus infectivity/virus structural integrity by flavonoids in the cell-free assay system.

Accordingly, experiments were performed to determine the extent of antiviral activity by proanthocyanidins (PACs) and the structurally different PAC component molecules catechin [(+)-Catechin hydrate] and epicatechin [(-)- Epicatechin; EC]. The simian rotavirus stain SA-11 (ATCC VR-1565) was used as a representative enteric viral system. A quantitative antigen capture [viral capsid protein 6 (VP6) enzyme immunoassay assay was used to measure loss of viral infectivity/viral capsid integrity in the presence and absence of treatment regimens with PACs, catechin and EC. Rotavirus (RTV) stock titers were determined by monkey kidney epithelial (MA-104) cell culture monolayers grown in 96-well microtiter plates. Cytotoxicity testing was performed by the "Toxilight^{R} Non-Destructive Cytotoxicity BioAssay" (Lonza). Gold-labeled immunoelectron microscopy was performed to visualize the virus-PAC complexes. A microhemagglutination assay was used to investigate whether PACs were capable of inhibiting red blood cell (RBC) aggregation by rotavirus.

Two hundred and 100 ug/ml PACs affected a direct loss of virus infectivity to 91.8 and 56% of control, respectively. PAC component flavan-3-ol monomers (i.e., catechin and EC), mandated elevated concentrations (ca., 5,000 to 10,000 ug/ml) to affect a RTV loss of infectivity approaching 30-50% of control. At a concentration of 200 ug/ml, PACs displayed an inhibitory effect upon the RTV-induced hemagglutination. These data suggest an inhibitory effect on the binding of RTV antigenic determinants to RBC sialic acid receptor sites. Utilizing gold-labeled immunoelectron microscopy technique, RTV particles were found to be shrouded within solubilized PACs and sequestered within PAC aggregates by Transmission Electron Microscopy (TEM). At the concentrations used in this study, neither PACs, catechin, nor EC, proved cytotoxic to MA-104 cells grown in monolayer culture.

The data from this study show for the first time, a direct antiviral effect on rotavirus infectivity/structural integrity using a cell-free assay system. Catechin and EC, although components of PACs, were minimally effective as antiviral agents when individually tested. The components were found to be more effective when the compound.

Key Words: Anti-rotavirus activity; Catechin; Cranberry Proanthocyandin; Epicatechin; Rotavirus SA-11.

8. KAYNAKLAR

1.Aliperti, G. and Schlesinger MJ. Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein. Virology.1978;90:366-9.

2.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;39:238-46.

3.Alkan F. Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. A. Ü. Vet. Fak. Derg. 1998;45:1.

4.Anthony ID, Bullivant S, Dayal S, Bellamy AR, Berriman JA. Rotavirus spike structure and polypeptide composition. J Virol. 1991;65: 4334-40.

5.Arias CF, Romeo P,Virginia A, Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. J Virol. 1996;70:5832-39.

6.Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA. Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. Jamajournal of the American Medical Association 1994;271:751-54.

7.Aydoğdu S, Kütükçüler N, Yağcı RV ve Çağlayan S. Rotavirus infeksiyonuve klinik özellikleri, Ege Pediatri Bülteni. 1996;3:4,233-36.

8.Azevedo Yuan AS, Jeong L, Gonzalez KI, Nguyen TV, Pouly S. Gochnauer M, Zhang W, Azevedo A, Saif LJ. Viremia and masal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. J Virol. 2005;79:5428-36.

9.Bachmann PA, Hess RG. Local immunity in rotaviral infection. Annual Rech Vet. 1983;14:502-6.

10.Bais H, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM. Allelopaty and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. Science. 2003;301:1377-80.

11.Bate-Smith EC, Swain T. Flavonoid Compounds. In Comparative Biochemistry; Mason HS, Florkin AM, Eds.; Academic Press: New York.1957; Vol.3,pp.764.

12.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.

13.Benkaddour M, Tache S, Labic 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;144:709-16.

14.Beyazova U. Viral gastroenteritler, 'Enfeksiyon Hastalıkları' Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 1996;602-4.

15.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;2:1281-83.

16.Biswas R, Lyon DJ and Nelson EA. A etiology of acute diarrhoea in hospitalized childeren in Hong Kong, Trop Med Int Healt. 1996;1:697-783.

17.Bora N ve Öğütman R. İshalli çocuklarda rotavirus enfeksiyonu ve bu hastalıklarda barsak florasında oluşan değişiklikler. PTT Hastanesi Tıp Dergisi. 1995;17(3):299-307.

18.Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC and Parrott RB. Rotavirus gastroenteritis and weather, J of Clin Microbiol. 1992;478-82.

19.Bridger JC, Hall GA, Parsons KR. A study of basis of virulence variation of bovine rotavirus. Vet Microbiol. 1992;33:169-74.

20.Bridger JC. A definition of bovine rotavirus virulence. J Gen Virol. 1994;75:2807-12.

21.Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, Alderberg's Medical Microbiology, USA. 1998;461-64.

22.Bruce MG, Campbell IC and Van Pinxteren Land Snodgrass DR. Intestinal cellular immunity after primary rotavirus infection. J of Comp Path. 1995;113:155-64.

23.Brüssow H, Bruttin A, Marc-Martin S. Polypeptide composition of rotavirus empty capsids and their possible use as unit vaccine. J Virol. 1990;64:3635-42.

24.Burgu İ Akça Y ve Ünseren H. Dana ve buzağılarda viral enterisitler I-Virus izolasyonu üzerinde çalışmalar. A. Ü. Vet. Fak. Dergisi. 1983;30(1):45-53.

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

26.Caple IW. Neonatal viral diarrhoeas. Australlian Veterinary Journal. 1989;66(12):407-8.

27.Castello AA, Arguelles MH, Villegas GA, Olthoff A and Glikman G. Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in.Argentina. J Med Virol. 2002;67(1):106-12.

28.Chasey D, Banks J. The commenest rotavirus from neonatal lamb diarrhoea in England ana Wales have atypical electropherotypes. Vet Rec. 1984;115:326-27.

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

30.Cleary TG and Pickering LK. Acute Gastroenteritis in ''Infectious Diseases of Children'' Ed.by Krugman S, Katz S, Grshon AA, Wilfert CM (eds). 9th ed. Mosby, St.Louis. 1992;105-26.

31.Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherer R. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. Arch Virology. 1979;60:177-86.

32.Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Prasad BV. Trypsin cleavage stabilities the rotavirus VP4 spike. J Virol.2001;75:6052-61.

33.Crawford SE, Dinesh G, Patel EC, Berkova Z, Joseph M, Hyser MC, Milton J, Finegold ME, Estes MK. Rotavirus viremia and extraintestinal viral enfection in the neonatal rat model. J of Virology. 2006;80:4820-32.

34.Cukor G. Blacklow NR. Human viral gastroenteritis. Microbiol Rev. 1984;48:157-79.

35.Cumino AC, Giordano MO, Martinez LC, Medeot SI, Pavan JV and Yudowsky S. Culture amplification in huuman colon adenocarcinoma cell line CaCo-2 combined with an ELISA as a supplementary assay for accurate diagnosis of rotavirus. J Virol Methods. 1998;76(1-2):81-5.

36.Çabalar M. Van yöresindeki bazı süt sığırcılığı işletmelerinde rotavirus enfeksiyonunun serolojik araştırılması. YYÜVet Fak Derg. 2004;15:33-5.

37.D'Agostino J. Considerations in assessing the clinical course and severitty of rotavirus gastroenteritis. Clin Pediatr (Phila). 2006;45:203-12.

38.De BryneT, Pieters L, Witvrouw M, De Clercq E, Vanden Berghe D, and Vlietinck AJ. Biological evaluation of proanthocyanidin dimmers and related polyphenols. J Nat Prod. 1999;62: 954-58.

39.Dennehy PH. Rotavirus vaccınes:an overview. Clin Microbiol Ver. 2008;21:198-208.

40.Deprez S, Brezillion C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, Scalbert A. Polymeric Proanthocyanidins Are Catabolized by Human Colonic Microflora into Low-Molecular-Weight Phenolic Acids J Nutr. 2000;130:2733.

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

42.Dolan KT, Twist EM, Horton-Slight P, Forrer C, Bell M and Plotkin SA. Epidemiology of rotavirus electrophoretypes determined by a simplified diagnostic technique with RNAanalyses. J Clin Microbiol. 1985;21:753-8.

43.Doymaz MZ. Medikal Viroloji. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 2000;522-30.

44.Espejo RT, Arias SC. Structural polypeptides of simian rotavirus SA-11 and the effect of trypsin. J Virol. 1991;37:156-60.

45.Estes MK, Graham DY, Mason BB. Proteolitic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. J Virol. 1981;39:879-88.

46.Estes MK, Mason BB, and Cohen J. Cloning and nucleotide sequence of the simian rotavirus gene 6 that codes for the major inner capsid protein. Nucleic Acids Res. 1984;12:1875-87.

47.Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev. 1989;53:410-49.

48.Estes MK. Rotaviruses and their replication In 'Fundamental Virology' Ed. By Fields BN, Knipe, MD, second edition, 1991;619-41.

49.Fanos V, Atzei A, Zaffanello M. et. al. Cranberry and prevention of urinary tract infections in children. J Chemother. 2006;18 Spec no.3:21-4.

50.Fattal B, Katzenelson E, Hostvsky T, and Shuval HI. Comparison of adsorption-elution methods for concentration and detection of viruses in water. Water Res. 1977;11: 955-58.

51.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 SA-11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) Vaccines. Vaccine. 1998;16:507-15

52.Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fundamental Virology, Third Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York,USA.1996;1557-65.

53.Fijtman NL, Barrandeguy ME, Cornaglia EM, Schudel AA. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. Ach Virol. 1987;96:275-81.

54.Fitzon T, Leschonsky B, Bieler K, Paulus C, Schrönder J and Wagner WH. Proline residuesnin the HIV-1 NH2 terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication. Virology. 2000;268,294-307.

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

56.Flewett TH, Glass RI,Keith J, Nakogomi T, Nakogomi 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. Virolog. 1995;141:292-98.

57.Floyd R and Sharp DG. Viral aggregation: Quantitation and kinetics of the aggregation of poliovirus and reovirus. Appl Environ Microbial. 1978;36:1079-63.

58.Food and Nutrition Information Center. International Resources. USDA and ARS. 2005.

59.Fulton FW, Johnson CA, Pearson NJ, Woode GN. Isolation of a rotavirus from a newborn dog with diarrhea. Am J Vet Res. 1981;42:841-43.

60.Göçmen İ, Karademir F,Ezdar İ, Erkan O, Özkaya H ve Mete Z. İshal yakınmasıyla başvuran çocuklarda rotavirus araştırılması, Klinik Dergisi. 1995;8:2,75-6.

61.Gökay N, Kotan E, Çam M, Pekun Fve Turgut A. Süt çocuğu akut gastroenteritlerinde rotavirus'un yeri, Okmeydanı Hastanesi Bülteni. 1995;13(2-3):17-20.

62.Gracey M. Recent advences in childhood diarrhoeal diseases, Acta Paediatr Jpn. 1991;33:280-3.

63.Greenberg JA, Newmann SJ, Howell AB.Consumption of sweetened dried cranberries versus unsweetened raisins for inhibition of uropathogenic Escherichia coli adhesion in human urine: a pilot study. Jonurnal of Alternative and Complementary Medicine. 2005;11:875-78.

64.Gu L, Kelm M, Hammerstone JF, Beecher G, Holder J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior RL. Sceening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. J Agric Food Chem. 2003;51: 7513-21.

65.Hagerman AE and Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. J Biol Chem. 1981;256: 4496-97.

66.Hamilton JR. The pathophysiological basis for viral diarrhea: A progress report. J Pediatr Gastroent Nutr. 1990;11:150-4.

67.Haslem E. Practical Polyphenols: From Structure to Moleculer Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press, UK 1998.

68.Hernandez FI, Akahori H, Hasoka Y, Ikegmai N and Akatani K. The finest ultrastructural details of the inner layer of rotavirus revealed by minimal electron doses. J of Electron Microscopy. 1990 ;39:105-7.

69.Holland RE. Some infectous causes of diarrhea in young farm animals. Clin Microbiol Reviews. 1990;3:345-75.

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

71.Hoshino Y, Baldwin CA, Scott FW. Isolation and characterization of feline rotavirus. J Gen Virol. 1981;54:313-23.

72.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;62:744-48.

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

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

75.Howel AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DC, Leahy M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. Phytochemistry. 2005;66:2281-91.

76.Itturiza GM, Desselberger U, Gray J. Molecular epidemiology of rotaviruses: genetic mechanisms associated, with diversity. In Viral gastroenteriitis. Edited by Desserberger U, Gray J. Amsterdam: Elsevier Science. 2003;317-44.

77.Iwasawa A, Niwano Y, MokudaiT, and Kohno M. Antiviral activity of proanthocyanidin against feline calicivirus used as a surrogate for noroviruses, and coxsackievirus used as a representative enteric virus. Biocontrol Sci. 2009;14: 107-11.

78.Jaakola L, Riihinen K, Haggman H, Hohtola A. Billbery in vitro protocols and analyses of phenolic compounds. Methods Mol Biol. 2009;547:71-80.

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

80.Jassim SAA and Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. J. Appl.Microbiol. 2003;95:412-27.

81.Jöbstl E, O'Connell J, Patrick J, Fairclough A, and Williamson MP. *Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. Biomacromol. 2004;5:942–49.*

82.Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. J Agric Food Chem. 2001;49:4076-82.

83.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.

84.Kapikian AZ. Prospects for development of a rotavirus vaccine against rotavirus diarrhea in infants and young children. Rev Infect Dis. 1989;11:539.

85.Kapikian ZA, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN. ve ark, 2. edition, Virology. New York:Raven Press. 1990;2:1353-87.

86.Kapikan ZA and Chanock MR. Rotaviruses. Field Virology, Third Edition. 1996.

87.Kerry KG. Cranberry juice and prevention of recurrent urinary tract infection. Lancet. 1999;353-673.

88.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;20:1248-58.

89.Kinghorn AD. J.Pharm. Pharmacol. 2001;53:135.

90.Kohara J, Hirai T, Mori K, Ishizaki H, Tsunemitsu H. Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newbornclf diarrhea. J Vet Med Sci. 1997;59:1023-25.

91.Konawalchuk J and Spears JI. Antiviral effect of commercial juices and beverages. Appl. Environ. Microbiol. 1978;35;1219-20.

92.Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M. Randomised trial of cranberry – lingoberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. British Medical Jonurnal. 2001;322:1571-73.

93.Kraemer Schafhalter A, Fuchs H, Pfannhauser W. Solid-phase extraction (SPE) – a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from Aronia melanocarpa var nero. J Sci Food Agric. 1998;78:435-40.

94.Lea AGH, Arnold GM. The phenolic of cider: Bitterness and adstringency. J Sci Food Agric. 1978;29:478-83.

95.Li Z, Baker ML, Jiang W, Estes MK and Prasad BV. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. J of Virol. 2009;83:1754-66.

96.Liu CC, Chang HW, Yang G, Chiang JR, Chow YH, Sai IH, Chang JY, Lin SC, Sia C, Hsiao CH, Chou AH, and Chong P. Development of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay for monitoring the Enterovirus 71 vaccine manufacturing process. J. Virol Methods. 2011;176:60-8.

97.Lipson SMand Zelinsky-Papez K. Comparison of four latex agglutination and three enzyme linked immunosorbent assays fir the detection of rotavirus in fecal specimens. Amer J Clin Pathol. 1989:92:637-42.

98.Lipson SM, Leonardi GP, Salo RJ, Schutzbank TE, and Kaplan MH. Occurrence of nonspecific reactions among stool specimens tested by the Abbott TestPack enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1990;28:1132-34.

99.Lipson SM, Svenssen L, Goodwin L, Porti D, Danzi S, and Pergolizzi R. Evaluation of two current generation immunoassay and an improved isolation- based assay for the rapid detection and isolation of rotavirus from stool. J Clin Virol. 2001;21:17-27.

100.Lipson SM, Sethi L, Cohen P, Gordon RE, Tan IP, Burdowski A, Stotzky G. Antiviral effects on bacteriophage and rotavirus by cranberry juice. Phytomedicine 2007a; 14:23-30.

101.Lipson SM, Cohen P, Zhou J, Burdowski A, Stotzky G. Cranberry cocktail juice, cranberry concentrates, and proanthocyanidins reduce reovirus infectivity titers in African green monkey kidney epithelial cell cultures. Mol. Nutr Food Res. 2007b;51:752-58.

102.Lipson SM, Sobilo A, Andragna M, Roy M, Burdowski A, Collins B, Stotzky G. Reduction in reovirus Infectivity by Pure- and Store-Purchased Cranberry and Grape Juice Drinks. In: P. G. Scardina (ed.), Fruits Juices: Properties, Consumption and Nutrition. Nova Publ.,New York, NY. 2009 pp. 151-66.

103.Lipson SM, Gordon RE, Karthekeyan L, Singh M, Burdowski A, Roy A, Stotzky G. Effect of Cranberry and Grape Juice Drinks on Enteric Virus Integrity, Infectivity in Cell Culture, and Pathology in the Animal Model. Flavor and Health Benefits of Small Fruits. Amer. Chem.Soc.Press, Chicago,IL. In: Qian and A. Rimand (ed). 2010;177-95.

104.Lipson SM, Gordon RE, Ozen S, Karthikeyan L, Kirov N and Stotzky G. Cranberry and grape juices affect tight junction function and structural integrity of rotavirus-infected monkey kindey epithelial cell monolayers. Food and Environ Virol. 2011;3:46-54.

105.Liu Y, Gallardo-Moreno AMİ, Pinzon-Arango PA, Reynolds Y, Rodriguez G, Camesano TA. Cranberry changes the physicochemical surface proper ties of E. coli and adhesion with uroepithelial cells. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces. 2008;65:35-42.

106.Lynch DM. Cranberry for prevention of urinary tract infections. American Family Physician. 2004;70:2175-77.

107.Maatta-Riihinen KR, Kahkönen MP, Törrönen AR, Heinonen IM. Catechins and procyanidins in berries of Vaccinium species and their antioxidant activity. J Agric Food Chem. 2005;53: 8485-91.

108.Martin KW, Ernst E. Antiviral agents from plants and herbs:a systematic review. Antivir Ther. 2003;8:77-90.

109.Martin JS and Martin MM. Tannin assays in ecological studies: Lack of correlation between phenolics, proanthocyanidins and protein-precipitating constituents in mature foliage of six oak species. Oecologia .1982;54:205-11.

110.Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB and Leite JP. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belem, Brazil, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002b;97(1):113-7.

111.Matson DO, Estes MK, and Burns JW. Serotype variation of human group A Rotaviruses in two regions of the USA. J Infect Dis. 1990;162:605.

112.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;27:780-2.

113.Matsushima M, Takagi A, Masui A, Suzuki T, Shirai T, Mine T. Growth inhibiting action of cranberry on Helicobacter pylori. Helicobacter. 2006;11:43.

114.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.

115.Mebus CA. Bovine and ovine rotavirus. Virus infections of Ruminants, Dinter Z and Morein B eds, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo. 1990:239-42.

116.McNulty MS. Rotaviruses, J Gen Virol. 1978;40:1-18.

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

118.McNulty MS, Logan EF. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. Vet Rec. 1983;113:333-5.

119.Middleton E Jr, Kandaswami C and Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharm Rev. 2000;52:673-751.

120.Min BR, Hart SP. Tanins for suppression of intestinal parasites. J Anim. Sci. 2003;81:E102-9.

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

122.Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC. Student MJ Veterinary Virology, A Division of Harcourt Brace Company, USA. 1999:402-4.

123.Nakata S, Setes MK, Graham DV, Loosie R, Tao H and Shunheng W. Antigenic charecterizayion and ELİSA detection of adult diarrhoea rotaviruses, J Infect Dis. 1986;154: 448-55.

124.Nagesha HS, Holmes IH. VP4 relationships between porcine and other rotavirus serotypes. Arch Virol. 1991;116:107-18.

125.Nava P, Lopez S, Arias CF, Islas S, Gonzales-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.

126.Nogueira MCl, Oyarzabal OA, Gombas DE. Inactivation of Escherichla coli 0157:H7 Listeria monocytogenes and Salmonella in cranberry, lemon and lime juice concentrates. J of Food Protection. 2003;66:1637-41.

127.Offit PA, Clark HF, Kornstein MJ, Plotkin SA. A murine model for oral infection with primate rotavirus (Simian SA-11) . J Virol. 1984;51:233-36.

128.Ojeh CK, Snodgrass DR, Herring AJ. Evidence for serotypic variation among bovine rotaviruses. Arch Virol. 1984;79:161-71.

129.Özsan MA, Çetin N, Kurtoğlu S ve Özbal Y. Gastroenteritlerde ELISA yöntemiyle rotavirus araştırılması. Erciyes Tıp Dergisi 1990;12(1):81-5.

130.Öztürk MA, Çetin N, Kurtoğlu S ve Özbal Y. Gastroenteritlerde ELISA yöntemiyle rotavirus araştırılması. Erciyes Tıp Dergisi. 1990;12(1):81-5.

131.Pedigo AS, Critzer FJ, Golden DA. .Inactivation of Escherichia coli 0157:H7 in apple juice as affected by cranberry juice concentration and holding temperature. Food Protection Trends 2007;27:952-56.

132.Pedley S, Bridger JC, Brown JF, McCare MA. Molecular characterization of rotavirus with distinct group antigens. J Gen Virol. 1983;64:2093-101.

133.Pedley S, Bridger JC, Brown JF, McCare MA. Defination of two new groups of atypical rotaviruses. J Gen Virol. 1986;67:2093-101.

134.Pinzon-Arango PA, Liu YT, Camesano TA. Role of cranberry on bacterial adhesion forces and implications for Escherichia coli-uroepithelial cell attachment. J of Med Food. 2009;12:259-70.

135.Potterat O, Hamburger M. Drug discovery and development with plant derived compounds. Prog Drug Res. 2008;65:47-118.

136.Puntel M, Fondevilla 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;46:157-62

137.Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Veterinary Medicine, 8th ed.Bailliare Tindall, London. U.K. 1994;1016-94.

138.Radostis OM, Gay CG, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. Tenth edition, Saunders elsevier. 2007;1294-97.

139.Ramig RF. Genetics of the rotaviruses. Ann Rev Microbiol. 1997;51:225-55.

140.Raz R, Chazan B, Dan M. Cranberry juice and urinary tract infection. Clin Infect Dis. 2004;38:1413-19.

141.Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg. 1938;27:493-7.

142.Reed J. Cranberry flavonoids atherosclerosis and cardiovascular health. Crit Rev Food Sci Nutr. 2002;42:301-16.

143.Rodger SM, Bishop RF, Holmes UH. Detection of rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. J Clin Microbiol. 1982;16:724-6.

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

145.Rodriguez ZM, Goveia MG, Dallas MJ, Itzler RF, Boslego JW, Heaton PM, DiNubile MJ. Safety and efficacy of the pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine in healthy premature infants. Pediatr Infect Dis J. 2007;26(12):1099-104.

146.Roy C, Silverman A and Alagille D. Diarrheal disorders In 'Pediatric Clinical Gastroenterolog', eds by Roy C, Silverman A and Alagille D. 4th ed, St. Louis, Mosby. 1995;216-87.

147.Ruel G, Pomerleau S, Couture P, Lemieux S. Favourable impact of low-calorie cranberry juice consumption on plasma HDL-cholestrol concentrations in men. Br J Nutr. 2006;96:357-364.

148.Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. Role of Ca^{+2} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. Cell Calsium. 2000;8:137-49.

149.Riuz MC, Leon T, Diaz Y, and Michelangeli F. Molecular biology of rotavirus entry and replication. Sci Wld J. 2009;9:1476-97.

150.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;105-11.

151.Samboug M. Direct applaisal of latex agglutination testing, a conveniant alternative to enzyme immunoassay for the detection of rotavirus in childhood gastroenteritis, by comparison of two enzyme immunassays and two latex tests, J Clin Microbiol. 1985;21:622-25.

152.Saravanan P, Ananthan S and Sundaram A. Comparative analysis of monoclonal antibody based enzyme immunoassay, modified genome electrophoresis and electron microscopy procedures for rotavirus diagnosis from faecal specimens, Indian J Med Res 2001;113,:78-82.

153.Sato K, Inaba Y, Shinozaki T, Fujii R and Matumoto M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. Archives of Virology. 1981;69:155-60.

154.Scalbert A. Antimicrobial properties of tanin. Phytochemistry. 1991;30:3875-83.

155.Serter D. Virus Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 1997;243-51.

156.Shmuely H, Yahav J, Samra Z, Chodick G, Koren R, Niv Y, Ofek I. Effect of cranberry juice on eradication of Helicobacter pylori in patients treated with antibiotics and a proton pump inhibitor. Mol Nutr Food Research. 2007;51:746-51.

157.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 ans Immunity. 1980;32:70-3.

158.Snodgrass DR. Diarrhoea in dairy calves reduced by feeding colostrum from cows vaccinated with rotavirus. Res Vet Sci. 1982;32:70-3.

159.Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Synge BA. Aetiology of diarrhea in young calves. Vet Rec. 1986;119:31-4.

160.Stapleton A. Novel approaches to prevention of urinary tract infections. Infect Dis Clin North Am. 2003;17:457-71.

161.Stothers L, Brown P. Consumer cost analysis of cranberry anthocyanins for the prevention of urinary tract infection. Jof Urology. 2007;177:28-9.

162.Su X, Sangster MY, and D'Souze DH. Effect of chitosan on the infectivity of murine norovirus, feline calicivirus, and bacteriophage MS2. J Food Protec. 2009;72:2623-8.

163.Su X, Howell AB, D'Souza DH. The effect of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on the infectivity of human enteric viral surrogates. Food Microbiol. 2010a;27:535-40.

164.Su X, Howell AB, and D'Souza DH. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates-A time dependence study in vitro. Food Microbiol. 2010b;27:985-91.

165.Tietzova J and Petrovicova A. The IMU-LA-TEST ROTA Dot-ELISA test kit for diagnosis of rotavirus infections, Cesk Epidemiol Microbiol Imunol 1993;42(4):177-8.

166.Theil KW, McCloskey CM. Molecular epide miology and subgroup determination of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in dairy and beef calves. J Clin Microbiol. 1989;27:126-31.

167.Tran A, Talmud D, Lejeune B, Jovenin N, Renois F, Payan C, Leveque N, Andreoletti L. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. J Clin Microbiol. 2010;48(5):1943-6.

168.Tünger Ö, Özbakkaloğlu B,Sürücüoğlu S ve Gündüz T. Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirus tip 40/41 sıklığının araştırılması, İnfeksiyon Derg 2001;15:1,43-6.

169.Ustaçelebi Ş. Rotavirusler, 'Temel ve Klinik Mikrobiyoloji' Ed by Ustaçelebi Ş. Güneş Kitapevi, Ankara. 1999.

170.Ustaçelebi Ş. Viral gastroenteritlet, '70.Yıl Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 70. Yıl Toplantısı Sempozyum Kitabı'nda. 2001;171-7.

171.Vargas M, Gascon H, Urassa H and Vila J. A comparative study of preva enteropathogens causing diarrhoea in children in Ifaka. Tanzania during the rainy season an season In '11 European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases 'abstr 120, Istanbul. 2001.

172.Weiss EI, Lev-Dor R, Kashamn Y, Goldhar J, Sharon N, Ofek I. Inhibition interspecies coaggregation of plaque bacteria with a cranberry juice constituent. J Am Dent Assoc. 1998;129:1719-23.

173.Widdowson MA, Van Doornumh GJJ and Van der poel WHM. An outbreak diarrhoea caused by emerging rotavirus genotype P 6 G9 in an incubator ward, '11 Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases''abstract book. 2001:312.

174.White DO and Fenner F. Medical Virology. 4th ed. Academic Press. 1994.

175.Winiarczyk S, Gradzki Z. Comparison of polymerase chain reaction and dot hybridization with enzyme-linked immunoassay, virological examination and polyacrylamide gel electrophoresis for the detection of porcine rotavirus in faecal specimens. Zentralbl Veterinarmed B. 1999;46(9):623-34.

176.Wu VCH, Oju HJ, Bushway A, Harper L. Antibacterial effect of American cranberry (Vaccium macrocarpon) concentrate on foodborne pathogens. Lwt-Food Science and Technology. 2008;41:1834-41.

177.Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shoma R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, and Matsuura Y. Biological and immunological characteristics of hepatits-like particles baced on the crystal structure. Proc Natl Acad Sci. 2009;106:12986-91.

178.Yang K and Baines JD. Proline and tyrosine residues in scaffold proteins of herpes simplex virus 1 critical to the interaction with portal protein and its incorporation into capsids. J. Virol. 2009;83: 8076-81.

179.Yazıcı Z. Buzağılarda Rotavirus enfeksiyonlarının Seroepidemiyolojisi ve ELISA testi ile Rotavirus Antijenlerinin İdentifikasyonu, Doktora Tezi, A.Ü. Veteriner Fakültesi. 1992.

180.Yıldırmak Y, Tanyer G, Dallar Y ve Serdaroğlu A. Süt çocuklarının rotavirus ve diğer etiyolojik ajanlara bağlı akut gastroenteritlerinde, klinik ve epidemiyolojik özellikler. Pediatri Dergisi. 1992;1(1):1-6.

181.Yurdakök M. Rotavirus. Katkı 4(8). 1983;714-23.

182.Zhao W, Xia MJ, Bridges-Malveo T, Cantu M, McNeal MM, Choi AH, Ward RI, Sestak K. Evaluation of rotavirus dsRNA load in specimens and body fluids from experimentallyinfected juvenile macaques by real-time PCR. Virology. 2005;341:248-56.

183.Zhang L, Ma J, Pan K, Go VLW, Chen J, You WC. Efficacy of cranberry juice on *Helicobacter pylori* infection: a double-bind, randomized placebo controlled trial. Helicobacter. 2005;10:139-45.

184.Zvidic S, Telalbasic S and Beslagic E. Clinical characteristics of rotavirus disease In 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Disease, Abstract book, İstanbul. 2001;1257.

185.http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/proanthocyanidins.php

10. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Konya'da doğdu. Lisans Eğitimini 2009 yılında Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde tamamladı. 2009 yılında başladığı Yüksek Lisans Eğitimini S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Viroloji Anabilim dalı'nda sürdürmektedir.