

TÜRKİYE'DE YENİ DOĞAN İSHALLİ BUZAĞILARDA İLK ROTAVİRUS İZOLASYONU

Veli GÜLYAZ

Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İSTANBUL

Mustafa HASÖKSÜZ

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı

Aykut ÖZKUL

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalı

Özet : Bu araştırmada, ishal semptomu gösteren 17 buzağıdan alınan gaita örneklerinden 8 adetinde (%47) Fetal Kidney Rhesus Monkey (MA-104) hücre kültüründe Rotavirusu izolasyonu gerçekleştirildi. Virus ekilen hücre kültürlerine inkubasyonun 2. gününde pankreatin enzimi takviyesi yapılmasının gerek virusun üremesi ve gerekse hücre kültüründe CPE odaklarının net olarak görülmesinde etkili olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Buzağı, rotavirus, izolasyon

Summary : In this research, 17 faeces samples obtained from calves with diarrhea symptoms were tested for detection of rotaviruses. 8 (%47) rotaviruses strains were isolated on (MA-104) cell cultures. After the inoculation of faeces samples on to the cell cultures, pancreatin solution were added in to the virus growth medium at second day in order to maintain of the level of pancreatin in the medium and than It was seen that pancreatin effected the replication of virus and to be seen CPE focus in the short time and clearly on the cell culture.

Key words : Calf, rotavirus, MA-104 cells, diarrhea, isolation, pancreatin.

Giriş

Rotavirusların (BRV) neden olduğu enteritler özellikle sonbahar ve kış aylarında yeni doğan buzağuları etkileyerek ve önlem alınmadığı takdirde sürü içinde

mortalitenin artmasına neden olarak, kapalı yetiřtirmelerde verimliđi dūřüren önemli unsurlar arasında yer almaktadır (7,12).

Bovine rotavirus ilk kez Mebus ve ark. nın ishallerden alınan gaitalar ile kolosrum almamış buzağılarda deneysel olarak enfeksiyonu oluşturmaları ile buzağıların ishal etkeni olarak tanımlanmıştır (2).

Rotaviruslar Reoviridae familyasında yer alıp çift iplikçikli, pozitif polariteli RNA'ya sahiptirler. Etken 60-80nm çapında olup, zar içermez (7).

Rotaviral enteritisler çoğunlukla 1-8 haftalık buzağılarda sulu, sarı renkli ishaller ile karakterizedir. Etkenin oral yolla alınmasından 16 – 24 saat sonra ilk enfeksiyon belirtileri oluşmaya başlar (7).

Enfeksiyonun teşhisi amacıyla geliştirilen farklı teknikler arasında en yaygın olarak kullanılanlar Elektron mikroskopi (EM), Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELISA), Immuno Electro Osmophoresis, Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), Revers Passive Haemagglutination (RPHA) testi, ImmunofluorescentTest (FAT) olarak bildirilmiştir (2,7). İshallerden rotavirus izolasyonunun zorluğu nedeniyle Türkiye de rotavirusun varlığı ve epidemiyolojisi Elektron mikroskopi (EM), Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELISA), Immuno electro osmophoresis, Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), Revers Passive Haemagglutination (RPHA) testi, ImmunofluorescentTest (FAT) metodları ile araştırılmış ancak virus izolasyonu yapılamamıştır (1,9,13,15). Rotavirus enfeksiyonunun Türkiye deki ilk tespiti serolojik olarak Burgu ve Akça (7) tarafından erişkin sığırlarda yapılmıştır. Yeni doğanlarda ishal olaylarında BRV varlığı ise Yazıcı (17) tarafından %17 lik bir oranla tespit edilmiştir. Alkan ve ark (1) yaptıkları çalışmada 0-1 ay yaş grubunda ishal semptomları gösteren buzağılardan aldıkları 96 adet gaita örneğinin 26' sında (%26.8) RPHA testi ile BRV antijenleri saptadıklarını bildirmişlerdir. Yine Alkan (2) ishal semptomu gösteren 83 buzağıdan sağlanan gaita örneklerinin 52 adetinde (%61.4) BRV ve coronavirus (BCV) yönünden etkenlerin varlığının saptandığını, 52 olgunun 7 adetinde (%13.4) BRV ve BCV ile mix enfeksiyonlar olduğunu, 37 (%71.1) olguda sadece BRV ve 8 (%15.4) olguda sadece BCV etkenlerinin varlığını ELISA tekniğini ile saptandığını bildirmiştir..

Rota virusunun izolasyonu amacıyla diğer ölkelerde çeşitli çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (3,4,6). Rotavirusunun hücre kültüründe ilk izolasyonu mebus ve ark. ları tarafından yapılmıştır (2). Daha sonraki yıllarda

özellikle MA-104 hücre kültürünün kullanımı ile rotavirusunun izolasyon oranları artmıştır.

Bu çalışma ile ülkemizde yeni doğan buzağılarda ölümlere sebep olan Rotavirusunun varlığının diğer yöntemler ile elde edilen veriler ile izolasyon oranlarının karşılaştırılması yanında yerel aşı suşu olarak kullanılabilir bir suşun elde edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve metod

Gaita örnekleri : Çalışmada kullanılan 17 adet gaita örnekleri Trakya bölgesinde halk elinde bulunan ve ishal semptomu gösteren 0-1 aylık buzağılardan elde edildi.

Hücre kültürü : Virus izolasyonu ve serum nötralizasyon testleri için Fetal kidney Rhesus monkey hücre kültürü (MA-104 /42. pasajı) ABD Ohio Tarımsal Araştırma ve Kalkınma Merkezinden temin edildi.

Referens Rotavirus suşu : Bovine Rotavirus (RV-A) strain : B 223 (grup A, serotip 7) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Rotavirus hiperimmün serumu : Bovine Rotavirus (RV-A) strain : B 223 (grup A, serotip 7 suşu kullanılarak tavşanlarda hazırlandı (5,8,11).

Vasat : hücre kültürü ve virus üretimi amacıyla Glasgow minimum Essential medium (GMEM) kullanıldı.

Metod

MA-104 hücre kültürü hazırlanması : Azot tankında muhafaza edilen MA-104 hücre kültürü 37 °C' lik benmaride hızlı bir şekilde çözdürüldü. Mililitre'de 300.000 hücre olacak şekilde 37 °C ısıdaki % 10 FCS içeren GMEM vasatı ile sulandırılarak 25cm² lik flasklara 7.5 ml konarak 37 °C de ve %5 CO₂'li ortamda monolayer hücre kültürü oluşması için inkubasyona bırakıldı. Flasklar her gün hücrelerin üremeleri yönünden kontrolleri yapıldı (4,6).

Gaita örneklerinin hazırlanması : İshalli buzağılara ait ELISA testi ile Rota virus yönünden pozitif bulunan 8 adet dışkı örnekleri 10µg/ml pankreatin, 100 IU/ml penicilin, 100mg/ml streptomisin ve 10 µl /ml partricine içeren GMEM vasatı ile %10 oranında sulandırıldı. Sulandırılan gaita örnekleri 3000 devirde 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı ve 0.22µm por çaplı selluloz asetat

filtrelerden süzöldü. Elde edilen süzöntü 1'rer ml olarak cryoviallere taksim edilerek -70 °C de muhafaza edildi (6,10,14).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : Bu amaçla ticari ELISA test kiti (Bio-X Rotavirus Elisa Kit) kullanıldı. 1/10 sulandırılmış 17 adet dışkı örneklere üretici firma tarafından belirlenen uygulama yönergesi doğrutusunda işlendi ve 450nm filtre absorbansları okunmak suretiyle sonuçlar değeriendirildi (2).

Hücre költüründe Rotavirusunun izolasyonu ve üretilmesi: ELISA testi ile Rotavirus yönünden pozitif bulunan gaita örneklereinden 25 cm² lik flasklarda üretilen MA-104 hücre költürlerine ekimleri yapıldı. Bu amaçla, %90 monolayer olarak üreyen MA-104 hücre költürlerinin vasatları dököldü, 3 kez 10µg/ml pankreatin, 100IU/ml penicilin, 100mg/ml streptomisin ve 10 µl/ml partricine içeren GMEM vasatı ile 3 kez hücre yüzeyleri yıkandı ve MA-104 hücre költürü kaplı 25 cm² lik flasklara 7.5ml pankreatinli GMEM vasatı konarak 1 saat süreyle 37 °C de inkube edilirken gaita örneklereide 1 saat boyunca 37°C de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon periyodu sonunda flasklarda vasatlar dököldü ve her gaita örneğinden dört flask olacak şekilde 0.5 ml ayrı ayrı hücre költürlerine ekimleri yapıldı. Örneklere 1 saat boyunca 37°C de %5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon periyodu sonunda flasklardaki hücrelerin yüzeyleri 3 kez pankreatinli GMEM vasatı ile yıkandı ve her flaska 10µg/ml pankreatin içeren 7.5 ml GMEM vasatı konarak 37°C de %5 CO₂ li etüvde inkubasyona bırakıldı. Her gaita örneğinden ekim yapılan 4 flask hücre költüründen ikisine her iki günde bir 500µg/ml saf pankreatin solüsyonundan 25 mikrolitre eklendi. Hücre költürleri 10 gün süreyle her gün CPE oluşumları yönünden kontrolleri yapıldı (5,6,14).

Virus titrasyon testi: 24 gözlü pleytlerde monolayer MA-104 hücre költürü hazırlandı. Kuyuculardaki hücrelerin yüzeyi 100 IU/ml penicillin, 100µg/ml streptomisin ve 10µl/ml partricine içeren GMEM vasatı ile 3 kez yıkandı. İzole edilen Rotavirusunun log₁₀ cinsinden 10 katlı dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 4 kuyucuğa 200'er µl kondu ve 1 saat boyunca 37°C de %5 CO₂ li etüvde inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon periyodu sonunda hücre yüzeyleri 3 kez GMEM ile temizlendi ve her kuyucuğu 1'er ml 10µl/ml Pankreatinli GMEM vasatı eklenerek 37 °C de inkubasyona bırakıldı. 10 gün süreyle her gün hücrelerin CPE oluşumları yönünden kontrolleri yapıldı. Sonuçlar Sperm-Kaerber metoduna göre değeriendirildi.

Virus nötralizasyon testi : MA-104 hücre kültüründe üreyen virusun identifikasyonu amacıyla 24 gözlü pleytlerde monolayer MA-104 hücre kültürü hazırlandı. Kuyuculardaki hücrelerin yüzeyi 100 IU/ml penicillin, 100µg/ml streptomisin ve 10 µl/ml partricine içeren GMEM vasatı ile 3 kez yıkandı. İzole edilen ve titreleri saptanan virus 100 DKID₅₀ /0.1ml değerleri saptandı ve 200 µl virus içeriği ile 200 ml Rotavirus hiperimmünserumu karıştırıldı ve 37 °C de 1 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon periyodu sonunda her karışımdan 24 gözlü kuyucuklarda hazırlanan ve hücre yüzeyleri 3 kez GMEM ile temizlenen hücre kültürlerine ekimleri yapıldı. 37 °C’de 1 saatlik periyot sonunda hücre yüzeyleri tekrar GMEM vasatı ile yıkanarak her kuyucuğu 1’er ml 10µl/ml Pankreatinli GMEM vasatı eklendi ve 37 °C de inkubasyona bırakıldı. Kontrol olarak her izolat süspansiyonundan saf virus ekimleri yapıldı. 10 gün süreyle her gün hücrelerin CPE oluşumları yönünden kontrolleri yapıldı (16).

İzole edilen virusların Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile identifikasyonu : Bu amaçla ticari ELISA test kiti (Bio-X Rotavirus Elisa Kit) kullanıldı. Hücre kültüründe CPE meydana getiren virusların Rotavirus yönünden identifikasyonu amacıyla her virus içeriği üretici firma tarafından belirlenen uygulama yönergesi doğrultusunda işlendi ve 450nm filtre absorbansları okunmak suretiyle sonuçlar değerlendirildi.

BULGULAR

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : ELISA testi ile 17 adet dışkı örneklerinden 8 adetinin (%47) BRV antijeni içerdiği saptandı.

Hücre kültüründe Rotavirusunun izolasyonu ve identifikasyonu: ELISA testi ile pozitif bulunan gaita örneklerinin MA-104 hücre kültürlerine ekimleri yapıldı. Ekimleri yapılan 8 adet gaita numunelerinin tümünde inkubasyonun 2. gününden itibaren CPE odakları gözlemlendi. ELISA ve serum nötralizasyon testi ile izole edilen etkenlerin BRV olduğu, 8 adet BRV virusuna ait CPE odaklarının 7. günde hücre kültürünün % 60-70’ini kapladığı saptandı. 10 günlük inkubasyon periyodunda 2 günde bir pankreatin eklenen hücre kültürlerinde meydana gelen CPE oluşumlarının çok çabuk yayıldığı ve virus üremesine bağlı olarak 4. günde tüm hücrelerin parçalanmasına neden olduğu saptandı. Rota virus izolatlarının gerek ileri pasajlarında ve gerekse titrasyon testlerinde virus ekilen hücre kültürlerine inkubasyonun ikinci gününde ek olarak her 25 cm² lik flasklardaki 7.5 ml vasata 500µg/ml stok pankreatin

solusyonundan 25 µl pankreatin takviyesinin yapılmasının virusun üreme hızını arttırdığı, CPE odaklarının net olarak ve kısa sürede oluştuğu ve 4 güne kadar tüm hücrelerin enfekte olduğu saptandı. Ayrıca pankreatin enziminin Rotavirus izolasyonunda hücrelere tripsin enzimine oranla daha güvenli olarak kullanılabilceği saptandı. İzole edilen 8 adet virus suşunun 10 kez seri pasajları yapıldı ve titrelerinin sırasıyla DKID₅₀ 10^{6.25}/ 0.2ml , 10^{7.0}/ 0.2ml, 10^{6.25}/ 0.2ml, 10^{6.0}/ 0.2ml, 10^{5.5}/ 0.2ml, 10^{5.75}/ 0.2ml, 10^{5.0}/ 0.2ml ve 10^{6.0}/ 0.2ml olduğu saptandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Rotaviral enteritiserler çoğunlukla 1-8 haftalık buzağılarda sulu, sarı renkli ishaller ile karakterizedir. Etkenin oral yolla alınmasından 16 – 24 saat sonra ilk enfeksiyon belirtileri oluşmaya başlar. Hastalığın başlangıcında normalin üzerinde olan vucut ısı daha sonra normal değerlere iner. Buzağılarda kilo kaybı, tüylerde düzensizlik ve keçeleşme dikkati çeker. Dehidrasyon ve sıvı elektrolit dengesinde bozulmaya bağlı olarak hipovolemik şok ve ölüm şekillenir. E.coli, salmonella, clostridia, criptosporidium gibi etkenler ile komplikasyon mortalitenin artmasına neden olur (2,7).

Enfeksiyonun teşhisi amacıyla geliştirilen farklı teknikler arasında en yaygın olarak kullanılanlar Elektron mikroskopi (EM), Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELISA), Immuno electro osmophoresis, Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), Revers Passive Haemagglutination (RPHA) testi, ImmunofluorescentTest (FAT) olarak bildirilmiştir (2,7). İshalli vakalardan rotavirus izolasyonunun zorluğu nedeniyle Türkiye de rotavirusun varlığı ve epidemiyolojisi Elektron mikroskopi (EM), Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELISA), Immuno electro osmophoresis, Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), Revers Passive Haemagglutination (RPHA) testi, ImmunofluorescentTest (FAT) metodları ile araştırılmış ancak virus izolasyonu yapılamamıştır. Yeni doğanlarda ishal olaylarında BRV varlığı Yazıcı (17) tarafından %17 lik bir oranla tespit edilmiştir. Alkan ve ark (1) yaptıkları çalışmada 0-1 ay yaş grubunda ishal semptomları gösteren buzağılardan aldıkları 96 adet gaita örneğinin 26 sında (%26.8) RPHA testi ile BRV antijenleri saptadıklarını bildirmişlerdir. Alkan (2) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, ishal semptomu

gösteren 83 buzağıdan sağlanan gaita örneklerinin 52 adetinde (%61.4) BRV ve coronavirus (BCV) yönünden etkenlerin varlığının saptandığını, 52 olgunun 7 adetinde (%13.4) BRV ve BCV ile mix enfeksiyonlar olduğunu, 37 (%71.1) olguda sadece BRV ve 8 (%15.4) olguda sadece BCV etkenlerinin varlığını ELISA tekniğini ile ortaya koymuşlardır. Ülkemizde ishalleri buzağılarda Rotavirus oranını Burgu ve ark. (7) 'ları EM,ELISA ve PAGE testleri ile %33.6 bulurken, Alkan (1,2) RPHA testi ile %26.8 ve ELISA testi ile %44.5 saptamışlardır. Bu çalışmada ishal semptomu gösteren 17 buzağıdan alınan dışkı örneklerinden 8 adet (%47) oranında rotavirusu izole edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen %47'lik rotavirus pozitiflik oranı ile Alkan (2) tarafından bildirilen %53'lik pozitiflik oranının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Son yıllarda yapılan bu iki çalışma ülkemizde rotavirusların sebep olduğu buzağı ishal oranlarının yüksek olduğunu göstermektedir.

Rota virusunun izolasyonu amacıyla diğer ülkelerde çeşitli çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (4,6,14). Rotavirusun hücre kültüründe ilk izolasyonu mebus ve ark.(7) ları tarafından yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda özellikle MA-104 hücre kültürünün kullanımı ile rotavirusunun izolasyon oranları artmıştır. Bohl ve ark. (6) , yaptıkları çalışmada ishalleri domuz yavrularından elde edilen gaita örneklerinden rotavirus izolasyonu amacıyla hücre kültürü olarak MA-104 ve domuz böbrek hücre kültürü (PK 15) ile virusun üremesini arttırmak amacıyla pankreatin enzimini kullanmışlar ve sonuçta MA-104 hücre kültürünün ve pankreatin enziminin rotavirus izolasyonunda uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, rotavirus izolasyonunda hücre kültürü olarak MA-104 ve enzim olarak pankreatin kullanılmış ve %47 ile çok yüksek izolasyon oranı elde edilmiştir. Ayrıca hücre kültürüne rotavirus ekimini takiben inkubasyon süresinin 2. gününde pankreatin enziminin ilave edilmesinin virusun üremesinde ve net şekilde CPE odaklarının görülmesinde etkili olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma ile ülkemizde yeni doğan buzağılarda ölümlere sebep olan Rotavirusların %47'lik oran ile en önemli etkenlerden biri olduğu görülmüştür. Ayrıca yeni doğan buzağılarda Rotavirus enfeksiyonlarının önlenmesi amacıyla gebe sığırlara yapılan rotavirus aşılarda bulunan suşlar ile izole edilen yerel suşların antijenik yakınlıkların tespit edilmesi ve aşılarda yerel aşı suşlarının kullanılmasının bu hastalık ile mücadele kullanılan aşılarda etkinliğini arttıracak kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Alkan F., Pulat H. Yazıcı Z. ve Burgu İ. (1992).** Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon (RPHA) testi ile ishallerde buzağuların gaitalarında rotavirusların tespiti. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg. 39 (1-2) , 238-246.
2. **Alkan F. (1998).** Buzağı ishallerinde Rotavirus ve coronavirusların rolü. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg. 45, 29-37.
3. **Andrus J.K.(2004).** Rotavirus vaccines : Lancet 364 , 245-246.
4. **Babiuk L.A., Mohammed K., Spence L., Fauvel M. And Petro R. (1977).** Rotavirus isolation and cultivation in the presence of tripsin. Journal of clinical Microbiology. 6(6), 610-617.
5. **Beser T.E., gay C.C., Mcguire T.C. and Evermann J.F. (1988).** Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody in to the intestinal lumen. Journal of virol. 62(7), 2238-2242.
6. **Bohl E.H., Theil K.W. and Saif L.J. (1984).** Isolation and serotyping of porcine Rotaviruses and antigenic comparasion with other Rotaviruses. Journal of clinical Microbiology. 19(2), 105-111.
7. **Burgu İ., Akça Y., Alkan F., Özkul A. ve Karaoğlu T. (1995).** Yeni doğan ishallerde buzağularda Rotavirusların elektron mikroskopi (EM), enzim linked immunosorbent assay (ELISA) ve polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg. 42, 491-498.
8. **Castrucci G. , frigeri F., Angelili V., Ferrari M., Cilli V. and Aldrovandi V. (1987)** Field trial evaluation of an inactivated Rotavirus vaccine against neonatal diarrhea of calves : Eur.J. Epidemiol. 3(1),5-9.
9. **Çabalar M., Boynukara B., Gülhan T. ve Ekin İ.G. (2001).** Prevalence of Rotavirus, Escherichia coli K99 and 0157:H7 in healthy dairy cattle herds in van, Turkey. Turk J. Vet. Anim. Sci. 25, 191-196.
10. **Hasöksüz M., Lathrop S.L., Gadfield K.L. and Saif L.J. (1999).** Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. AJVR, 60(10)1227-1233.
11. **Linda J.S., Smith K.L., Bonnie J.L. Edward H.S., Kenneth W.T., debra A.T.**

- 0). İmmune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. Am. J. Vet. Res.45, 49-58.
12. **Mulholland E.K.(2004).**Global control of rotavirus disease: Hot topics in infection and immunity in children : Kluwer academic/plenum publishers, newyork.
 13. **Özkul A., Yeşilbağ K., Karaoğlu T. ve Burgu İ. (2002).** Electrophoretotypes of bovine Rotaviruses detected in Turkey. Turk J. Vet. Anim. Sci. 26, 359-362.
 14. **Rodriguez C.A.R., Brandao P.E., Ferreira F., Gregori F., Buzinaro G. And Jerez J.A. (2004).** Improved animal Rotavirus isolation in MA105 cells using different tripsin concentration. Arq.inst.Biol. 71(4), 437-441.
 15. **Şahna K.C. ve Alkan F. (2003).** Sığırlarda Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde gebeliğin rolü. F.Ü. Sağlık Bil. Derg. 17(3), 203-209.
 16. **United states department of agriculture animal and plant health inspection service.** Veterinary services laboratorie. 9 CFR 113. (1995).Supplemental assay metod for titration of bovine rotavirus in vaccine.
 17. **Yazıcı Z.(1992).** Buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiyolojisi ve ELİSA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi.