

YENİDOĞAN İSHALLİ BUZAĞILARDA BOVİNE ROTAVİRÜS İNFEKSİYONUNUN TEŞHİSİNDE ELISA VE VİRÜS İZOLASYON METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Veli GÜLYAZ, Nesrin TURAN, Selma ÖZDEMİR, İrem GÜLAÇTI
Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 34890 Pendik/İstanbul

Geliş Tarihi: 20.09.2007

Özet: Bu araştırmada, ishal semptomu gösteren buzağılardan alınan gaita örneklerinden bovine rotavirüs (BRV) etkenlerinin saptanmasında Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile virüs izolasyon metodu karşılaştırıldı. Trakya bölgesinde halk elinde bulunan 22 yetiştiriciye ait ishal belirtileri gösteren 140 buzağıdan alınan gaita örneklerinden 38'inde (%27.1) ELISA ile BRV yönünden pozitiflik saptanırken, fetal kidney rhesus monkey (MA-104) hücre kültüründe 79 adet gaita örneğinden (%56.4) BRV izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen suşların titrasyonu sonucu (doku kültürü infektif doz 50)DKID₅₀ 10⁴ /0.1ml titreden daha düşük titrelerde (10³, 10², 10¹ /0.1ml) BRV antijenleri içeren sulandırılmalarda ELISA ile BRV varlığı yönünden negatif sonuçlar elde edildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan standart BRV (RV-A) strain : B 223 (grup A, serotip 7) suşu ile yapılan çalışmada ise DKID₅₀ 10⁴ ve 10³/0.1ml titrelerde virüs sulandırmalarında ELISA ile pozitif sonuç elde edilirken, 10², 10¹ /0.1ml titrelerde BRV antijenleri içeren sulandırmalarda ELISA testi ile BRV varlığı yönünden negatif sonuçlar elde edildi. Elde edilen sonuçlardan yeni doğan buzağılarda ishallerine neden olan etkenler arasında BRV varlığının saptanmasında ticari olarak kullanılan ELISA kitlerinin duyarlılığının az olduğu, BRV teşhisi amacıyla ELISA ile negatif çıkan gaita örneklerine polimerase chain reaction (PCR) testi uygulama imkanı yoksa gaita örneklerinin MA-104 hücre kültüründe 3-6 kör pasajı takiben ELISA ile değerlendirilmelerinin uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler : Buzağı, rotavirüs, ELISA, izolasyon, karşılaştırma.

The comparison of sensitivities between ELISA and virus isolation methods on detection of Rotaviruses from newborn calves with diarrhea

Summary : In this study, rotavirus antigen detection ELISA and rotavirus isolation methods were used and compared in order to detect rotavirus antigens in the samples of calf feces, one hundred forty feces samples that were obtained from calves with diarrhea from Thrace region were used. Thirty eight samples (27,1%) were found positive by ELISA and 79 samples (56,4%) were found as bovine rotavirus (BRV) positive by virus isolation method. Bovine rotaviruses that were isolated from samples and bovine rotavirus (RV-A)-strain:B 223 which was used as positive control were titrated by ten fold dilution. From per dilution 100 µl virus suspensions were taken and used for rotavirus antigen detection ELISA as described by manufacturer. According to the results of ELISA, all isolated viruses were found as positives at the titers of TCID₅₀ 10⁴/0.1ml. But at the titers of TCID₅₀ 10³, 10² and 10¹ /0,1 ml, rotavirus antigens were not detected from clinical samples by ELISA. BRV (RV-A)-strain:B 223 was found as positive at the titers of TCID₅₀ 10⁴ and 10³ /0.1ml. According to these results, the rotavirus antigen detection ELISA that has been used for detection of BRV antigen were not sensitive to detect rotavirus antigens under titers of 10⁴ / 0,1ml. In order to show exactly the existence bovine rotaviruses in the samples from newborn calves with diarrhea found as negative by ELISA, if there is no possibility to do polymerase chain reaction (PCR) test, the samples should be inoculated on MA-104 cell cultures followed by 3-6 passages by and the ELISA should be performed again.

Key words: Calf, rotavirus, ELISA, isolation, comparison.

GİRİŞ

Bovine rotavirüsler (BRV) özellikle sonbahar ve kış aylarında yeni doğan buzağılarda ishallerle sebep olan en önemli viral etkenler arasında yer almaktadır (8,22,23).

Rotavirüsler Reoviridae familyasında yer alan çift iplikçikli, pozitif polariteli RNA'ya sahip virüslerdir. Etken 60-80 nm çapında olup, zar içermez (8).

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

Bovine rotavirüsü ilk kez ishalleri buzağılardan alınan gaitalar ile kolostrum almamış buzağılarda deneysel olarak enfeksiyon oluşturulması ile buzağuların ishal etkeni olarak tanımlandığını belirtmiştir (2).

Ülkemizde yeni doğan buzağılarda ölümlere sebep olan bovine rotavirüs varlığının saptanmasında rutin olarak ELISA kullanılmaktadır. Son yıllarda polimerase chain reaction (PCR) testi yaygın şekilde kullanılmaya başlanmakla beraber özellikle yeni doğan buzağılarda ishallerle neden olan BRV etkeninin tespit edilmesinde PCR testi yapma imkanı olmayan laboratuvarlarda BRV antijen ELISA yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışma ile ELISA testinin klinik materyallerde BRV hastalığının teşhisinde virüs izolasyonu ile duyarlılığının saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Gaita örnekleri: Çalışmada kullanılan 140 adet gaita örneği Trakya bölgesinde halk elinde bulunan 22 farklı sığır yetiştiriciliği yapılan işletmeden ishal semptomu gösteren 0-1 aylık buzağılardan elde edildi.

Hücre kültürü: Virüs izolasyonu ve serum nötralizasyon testleri için fetal kidney rhesus monkey hücre kültürü (MA-104/42. pasajı) ABD Ohio Tarımsal Araştırma ve Kalkınma Merkezinden te-

min edildi.

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

Bovine rotavirüs hiperimmun serumu: Bovine rotavirüs (RV-A) strain : B 223 (grup A, serotip 7) suşu kullanılarak 2002 yılında tavşanlarda hazırlanmış BRV immun serumu kullanıldı.

Vasat: Hücre kültürü ve virüs üretimi amacıyla Glasgow minimum essential medium (GMEM-Biochrom- Almanya) kullanıldı.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Bu amaçla ticari rotavirüs antijen detection ELISA test kiti kullanıldı (Bio-X Rotavirus ELISA kit).

Metot

Gaita örneklerinin hazırlanması: İshalli buzağılara ait 140 adet dışkı örneği pankreatin, penicillin, streptomycin ve partricine içeren GMEM vasatı ile %10 oranında sulandırıldı. Sulandırılan gaita örnekleri 3000 devirde 30 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı ve 0.22µm por çaplı selluloz asetat filtrelerden süzüldü. Elde edilen süzüntü 1'er ml olarak cryoviallere taksim edilerek -70 °C'de muhafaza edildi (7,13,14,16).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Bu amaçla ticari ELISA kiti kullanıldı. 140 adet dışkı örneği ve hücre kültüründe CPE meydana getiren virüslerin BRV yönünden identifikasyonu amacıyla her virüs içeriği üretici firma tarafından belirlenen uygulama yönergesi doğrultusunda işlendi ve 450nm filtre absorbanları okunmak suretiyle sonuçlar değerlendirildi.

Hücre kültüründe Rotavirüsün izolasyonu ve üretilmesi: İshal semptomu gösteren buzağılardan elde edilen 140 gaita örneğinden hazırlanan süpernatantlardan, flaklarda üretilen MA-104 hücre kültürlerine ekimler yapıldı. Bu amaçla %90 monolayer olarak üreyen MA-104 hücre kültürlerinin vasatları döküldü, 3 kez 10µg/ml pankreatin, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin ve 10 µl/ml partricine içeren GMEM vasatı ile yüzeyleri yıkandı ve MA-104 hücre kül-

türü kaplı 25 cm²'lik flaslara 7.5 ml pankreatinli GMEM vasatı konarak 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilirken, gaita örnekleri de 1 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodu sonunda flaslardaki vasatlar döküldü ve her gaita örneğinden dört flask olacak şekilde 0.5 ml ayrı ayrı hücre kültürlerine ekimleri yapıldı. Örnekler 1 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodu sonunda flaslardaki hücrelerin yüzeyleri 3 kez pankreatinli GMEM vasatı ile yıkandı ve her flaskta 10µg/ml pankreatin içeren 7.5 ml GMEM vasatı konarak 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücre kültürlerinin 10 gün süreyle her gün sitopatik etki (CPE) oluşumları yönünden kontrolleri yapıldı. CPE görülmeyen örneklerin 6 kez kör pasajları yapıldı. (6,7,13,14,16).

Virüs titrasyon testi: Yirmidört gözlü pleytlerde monolayer MA-104 hücre kültürü hazırlandı. Kuyuculardaki hücrelerin yüzeyi 100 IU/ml penisillin, 100µg/ml streptomycin ve 10µl/ml partisine içeren GMEM vasatı ile 3 kez yıkandı. İzole edilen virüslerin log₁₀ cinsinden dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 4 kuyucuğa 100'er µl kondu ve 1 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodu sonunda hücre yüzeyleri 3 kez GMEM ile yıkandı ve her kuyucuğu 1'er ml 10µl/ml pankreatinli GMEM vasatı eklenerek 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 10 gün süreyle her gün hücrelerin CPE oluşumları yönünden kontrolleri yapıldı. Sonuçlar Sperman-Kaerber metoduna göre değerlendirildi (3,5,7).

Virüs nötralizasyon testi: Üretilen virüslerin identifikasyonu amacıyla 24 gözlü pleytlerde monolayer MA-104 hücre kültürü hazırlandı. Kuyuculardaki hücrelerin yüzeyi 100 IU/ml penisillin, 100µg/ml streptomycin ve 10 µl/ml partisine içeren GMEM vasatı ile 3 kez yıkandı. İzole edilen ve titreleri saptanan virüsün 100 DKID₅₀/0.1ml değerleri saptandı ve 100 µl virüs içeriği ile 100 µl rotavirüs hiperimmün serumu karıştırıldı, 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodu sonunda her karışımdan 24 gözlü kuyucuklarda hazırlanan ve hücre yüzeyleri 3 kez GMEM ile yıkanan hücre kültürlerine ekimleri yapıldı. 37 °C'de 1 saatlik periyod sonunda hücre yüzeyleri tekrar GMEM vasatı ile yıkanarak her kuyucuğu 1'er ml 10µl/ml pankreatinli GMEM vasatı eklendi ve 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak saf virüs ekimleri yapıldı. 10 gün süreyle her gün hücrelerin CPE oluşumları yönünden kontrolleri yapıldı (3,4).

İzole edilen virüslerin ELISA ile identifikasyonu: Bu amaçla ticari ELISA (Bio-X Rotavirüs ELISA Kit) kullanıldı. Hücre kültüründe CPE meydana getiren virüslerin Rotavirüs yönünden identifikasyonu amacıyla her virüs içeriği üretici firma tarafından belirlenen uygulama yönergesi doğrultusunda işlendi ve 450nm filtre absorbsansları okunmak suretiyle sonuçlar değerlendirildi.

ELISA ve hücre kültürü izolasyon tekniklerinin duyarlılıklarının tespiti: ELISA'nın duyarlılığının tespit edilmesi amacıyla, izole edilen bovine rotavirüs suşlarından Hasöksüz ve ark. (yayınlanmamış) genotipleri belirlenen 10 ade-di (Genotip G10 P11) ile pozitif kontrol olarak kullanılan bovine rotavirüs (RV-A) strain: B 223 (grup A, serotip 7) suşu 10 katlı olacak şekilde 7 basamak sulandırıldı. Her sulandırma basamağında ELISA kuyucuklarının ilgili gözlerine konuldu ve test prosedürü üretici firma tarafından tarif edildiği şekilde tamamlandı. Sonuçların değerlendirilmesi sırasında, her virüs sulandırmasından elde edilen OD değerleri kit kullanım kılavuzunda belirtilen hesaplama işlemine tabi tutuldu ve en son pozitif OD değerini veren virüs sulandırması kaydedildi. ELISA'nın duyarlılığının virüs izolasyon tekniği ile karşılaştırılması amacıyla ELISA için hazırlanan virüs sulandırmalarından 24 gözlü pleytlerde önceden monolayer olarak üretilen duyarlı MA-104 hücre hattına adsorbsiyon metodu ile inokülasyon yapıldı. 5-7 gün süreyle yapılan mikroskop değerlendirmeleri neticesinde en son CPE veren virüs sulandırması dışkı örneklerindeki nihai enfektif virüs titresini olarak kaydedildi. Her iki teknikten elde edilen ve virüs varlığını gösteren son sulandırma değerleri birbiri ile karşılaştırıldı (14).

BULGULAR

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): ELISA ile 140 dışkı örneğinden 38'inin (%27.1) BRV antijeni içerdiği saptandı.

Hücre kültüründe rotavirüs izolasyonu ve identifikasyonu: MA-104 hücre kültüründe izolasyon çalışması yapılan 140 adet gaita örneğinin 79 adetinde BRV izolasyonu gerçekleştirildi. ELISA ve serum nötralizasyon testi ile BRV olarak identifiye edildi. İzolatlardan 72 adedi 1. pasajda CPE oluştururken, 4 adetinin 4. ve 3. adedinin ise 6. pasajda CPE ile karakterize üreme gösterdikleri saptandı.

Virüs titrasyon testi: İzole edilen bovine rotavirüs saha suşlarının titreleri Sperman-Kaerber metoduna göre $DKID_{50}/0.2 \text{ ml } 10^{5.0}$ (35 adet), 10^6 (39 adet), $10^{7.0}$ (5 adet), olduğu saptandı.

ELISA ve hücre kültürü izolasyonu tekniklerinin duyarlılıkları: İzole edilen bovine rotavirüs suşlarının $DKID_{50}/0.1 \text{ ml } 10^4$ titreden daha az 10^3 , 10^2 , $10^1/0.1 \text{ ml}$ bovine rotavirüs antijenleri içeren sulandırılmalarda rotavirüs antijen detection ELISA ile rotavirüs varlığı yönünden negatif sonuçlar elde edildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan standart suş BRV (RV-A) strain: B 223 (grup A, serotip 7) ile yapılan çalışmada ise $DKID_{50} 10^4$ ve $10^3/0.1 \text{ ml}$ titrede virüs sulandırılmalarında rotavirüs antijen detection ELISA ile pozitif sonuç elde edilirken, 10^2 , $10^1/0.1 \text{ ml}$ rotavirüs antijenleri içeren sulandırılmalarda rotavirüs varlığı yönünden negatif sonuçlar elde edildi.

TARTIŞMA

Bovine rotaviral enteritiser çoğunlukla 1-8 haftalık buzağlarda sulu, sarı renkli ishaller ile karakterizedir (1,2,22,23). Ülkemizde yaygın şekilde görülen rotavirüslere bağlı enteritis vakalarında yenidoğan buzağların hastalaktan korunması amacıyla gebe sığırların gebeliklerin son dönemlerinde uygun rotavirüs suşları ile hazırlanmış aşılama ile kolostrum yoluyla yenidoğan buzağların korunmasına çalışılmaktadır. Rotavirüslere bağlı ishal vakalarında kısa zaman ve kesin teşhis hastalık ile mücadelede önem arz etmektedir (9,10,22,23).

Hastalığın teşhisinde ishallerde vakalardan bovine rotavirüslerin tespiti; Elektron mikroskopi (EM), Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Immuno Electro Osmophoresis (IEO), Immuno diffusion (ID), Latex immunoassay (LI), Enzyme

Immunoassay (EI), Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), Revers Passive Haemagglutination (RPHA) testi, Immuno Fluorescent Test (FAT) ve virüs izolasyonu metodları ile yapılmaktadır (2,8,12,17,18,19). Araştırmacılar yeni doğan buzağı ishallerinde BRV varlığının ortaya konulmasında kullanılan ELISA, EM, RPHA, PCR ve PAGE testlerinin farklı duyarlılıklara sahip olduklarını bildirmişlerdir (2,8,12,17-19).

Damızlık sürülerde yeni doğan buzağlarda hastalık etkeninin saptanması, hastalıkla mücadelede önemli noktayı oluşturmaktadır. İshal belirtileri gösteren buzağlarda etkenin en kısa sürede tespit edilmesi yanında, kesin varlığının ortaya konulması sürüde hastalığın önlenmesinde önem arz etmektedir. Genel olarak ELISA, EM, RPHA ve PAGE testleri hızlı teşhisinde önemli yer tutması yanında gaita örneklerinde belli sayıda virüs varlığında pozitiflik vermeleri nedeniyle ishallerde buzağlarda geç dönemde alınan gaita örneklerinde rotavirüs var olmasına rağmen negatif sonuçlar vermektedir. Rotavirüs enfeksiyonlarının kısa sürede ve daha yüksek oranda tespitinin PCR testi ile yapıldığı değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Ülkemizde hayvan hastalıklarının teşhisi yapılan laboratuvarlarda rota viral enteritiserin teşhisinde ELISA testi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışma ile yeni doğan buzağlarda görülen ishal vakalarında rotavirüs teşhisinde ELISA ve virüs izolasyon teknikleri karşılaştırılmıştır. Edwards ve ark. (11), neonatal gastroenteritisli buzağlara ait gaita örneklerinde rotavirüs antijen varlığının tespitine yönelik olarak RPHA, ELISA ve PAGE tekniklerini karşılaştırdıkları çalışma sonucu 209 saha örneğinden 69 adetinde RPHA ve PAGE ile pozitiflik saptanırken aynı örneklerden ELISA ile diğer iki testten daha düşük oranda, yalnız 49 adetinde pozitiflik tespit edildiğini bildirmişlerdir. Reynolds ve ark. (19), bovine gaita örneklerinde coronavirüs ve rotavirüslerin saptanmasında ELISA ve elektron mikroskopi metodlarının değerlendirilmesine yönelik yaptıkları çalışmada, deneysel olarak rotavirüs ile infekte edilen buzağların gaita örneklerinde rotavirüs saptanmasında elektron mikroskopi ile ELISA metodlarının benzer sonuçlar verdiğini, deneysel infekte edilen buzağlarda inokülasyondan sonra 3-6 gün içinde her iki testle %100 benzer pozitif sonuçla-

rın elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (19) aynı çalışmada sahadan toplanan rotavirüs şüpheli 75 örnek üzerinde ELISA ve elektron mikroskopisi ile yaptıkları analizlerde elektron mikroskopisi ile pozitif bulunan örneklerin %82'sinde ELISA ile pozitif sonuçların elde edildiği, sahadan toplanan numunelerde ELISA ile daha az saptanan pozitiflik oranının saha suşları ile deneysel infeksiyonda kullanılan patojen suşun antijenik olarak farklılığından kaynaklanabileceğini, aynı çalışmada yalnız elektron mikroskopisi ile yapılan analizlerde rota virüs partiküllerinin spesifik antikorlar ile kompleksler oluşturmuş şekilde saptandığını, ELISA ile negatif sonuçlar alınmasında rotavirüslerin antikorlar ile kompleks yapısı oluşturmasının önemli bir faktör oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Gülyaz ve ark.(13), yaptıkları çalışmada, ishalleri buzağılara ait gaita örneklerinde BRV oranını ELISA ile %23.5 olarak bulurken, hücre kültüründe %47 oranında BRV izolasyonu gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada ishal semptomu gösteren 140 buzağıya ait dışkı örneğinden ELISA ile 38 adetinde (%27.1) pozitiflik saptanırken hücre kültürlerinde 79 adet (%47) BRV izole edilmiş ve ELISA ile elde edilen sonuçlar hücre kültürü ile % 48 oranında yakınlık gösterdiği saptanmıştır. Gülyaz ve ark. (13) tarafından bildirildiği gibi ELISA ile elde edilen rotavirüs pozitiflik oranının hücre kültürüne göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Deneysel olarak rotavirüs ile infekte edilen buzağılara ait gaita örneklerinde epruvasyon sonrası 3-6. günlerde ELISA ile yüksek oranda pozitiflik saptanırken saha örneklerinde düşük pozitiflik oranlarının tespit edilmesinde, sahadan analizler için gaita örneklerinin infekte buzağılardan belli bir klinik tedaviden sonra genellikle ishallerin şiddetinin azaldığı ve antikor yanıtının oluşmaya başladığı dönemlerde alınması rol oynadığı düşünülebilir. Elde edilen verilerden rotavirüslere bağlı ishal semptomları gösteren buzağıların bağırsaklarında rotavirüslere karşı oluşan spesifik antikorlar ile virüs partiküllerinin immun kompleks oluşturmalarından dolayı meydana geldiği kanaati ortaya çıkmaktadır. İmmun kompleksler oluşturan rotavirüs partiküllerinin ELISA kitlelerinde pleytlere tespit edilen spesifik antikorlar ile reaksiyona girememesinden dolayı negatif sonuçlar alınması muhtemeldir.

Rubenstein ve ark. (21), rotavirüs partiküllerinin enzim immunoassay ve elektron mikrosko-

pik testler ile karşılaştırmalı olarak saptanmasına yönelik yaptıkları çalışmada, her iki testin sensitivitesinin aynı, buna karşın konvansiyonel elektron mikroskopisi metodundan daha duyarlı olduğu, her iki metot ile rotavirüs partiküllerinin tespit limitlerinin simian rotavirüs SA-11 için 10^6 ve human rotavirüs için 10^7 /ml olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. Hughes ve ark. (15) tarafından neonatal buzağılara ait gaita örneklerinde rotavirüs antijenlerinin latex immunoassay ve rotazyme testleri ile saptanmasına yönelik yapılan çalışmada, her iki testin gaita örneklerinde rotavirüs saptama limitlerinin sırasıyla 9.0×10^5 ve 4.5×10^5 partikül olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmamızda rotavirüs saha suşlarını içeren örneklerde ELISA metodu ile virüs partikülü tespit limiti 10^4 /0.1ml olarak tespit edilmiş olup ELISA testinin latex immunoassay ve rotazyme testlerinden daha duyarlılığı olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak ELISA ile rotavirüs antijenlerinin tespiti için yapılan analizlerde testin uygulandığı ülkelerdeki lokal suşlar ile kitle kullanılan rotavirüs antijenleri arasındaki genomik yakınlıkların dikkate alınmasının uygun olacağı, rotavirüse bağlı ishal semptomları gösteren buzağılara ait gaita örneklerinin hastalığın ileri aşamalarında alınmış olabileceği göz önüne alınarak ELISA ile negatif çıkan dışkı örneklerinin PCR ile test edilmesi mümkün olmadığı vakalarda hücre kültüründe 3-6 kör pasajı takiben ELISA ile tekrar analiz yapılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Alkan, F., Pulat, H., Yazıcı, Z. ve Burgu, İ. (1992): Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon (RPHA) testi ile ishalleri buzağıların gaitalarında rotavirüslerin tespiti. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 39(1-2),238-246.
2. Alkan, F. (1998): Buzağı ishallerinde rotavirüs ve coronavirusların rolü. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 45, 29-37.
3. Anon (1995): Supplemental assay method for titration of bovine rotavirüs in vaccine. United states department of agriculture animal and plant health inspection service. Veterinary services laboratorie.

4. Andrus, J.K. (2004): Rotavirus vaccines Lancet 364: 245-246.
5. Babiuk, L.A., Mohammed, K., Spence, L., Fauvel, M. and Petro R. (1977): Rotavirüs isolation and cultivation in the presence of tripsin. J. Clin. microbiol. 6 (6), 610-617.
6. 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. J. Virol. 62 (7), 2238-2242.
7. Bohl, E.H., Theil, K.W. and Saif, L.J. (1984): Isolation and serotyping of porcine Rotaviruses and antigenic comparasion with other Rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 19 (2), 105-111.
8. Burgu, İ., Akça Y., Alkan, F., Özkul, A. ve Karaoğlu, T. (1995): Yeni doğan ishalleri buzağılarda 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.
9. 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.
10. 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.
11. Edwards, S., Chasey, D., Napthine, P., Banks, J., Hewitt-Taylor C. and Cranage M.P. (1987): A comparison of three rapid diagnostic methods for the detection of rotavirus infection in calves. Vet. Microbiol. 13, 19-25.
12. Falcone, E., Tarantino, M., Trani, L.D., Cordioli, P. Lavazza A. and Tollis M. (1999): Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. J. Clin. Microbiol. 37 (12), 3879-3882.
13. Gülyaz, V, Hasöksüz, M. ve Özku, İ.A. (2005): Türkiye’de yeni doğan ishalleri buzağılarda ilk rotavirüs izolasyonu. Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg., 36 (1-2), 3-6.
14. 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.
15. Hughes, J.H., Tuomari, A.T., Mann, D.R and Hamparian V.V. (1984): Latex immunoassay for detection of rotavirus. J. Clin. Microbiol. 20 (3), 441-447.
16. Linda, J.S., Smith, K.L., Bonnie, J.L. Edward, H.S., Kenneth W.T. and Debra A.T. (1983): Immune response of pregnant cows to bovine rotavirüs immunization. Am. J. Vet. Res. 45, 49-58.
17. Mulholland, E.K. (2004): Global control of rotavirüs disease: Hot topics in infection and immunity in children: Kluwer academic/plenum publishers, Newyork.
18. Özkul, A., Yeşilbağ, K., Karaoğlu, T. ve Burgu, İ. (2002): Electrophoretotypes of bovine Rotavirüs detected in Turkey. Turk J. Vet. Anim. Sci. 26, 359-362.
19. Reynolds, D.J., Chasey, D., Scott, A.C. and Bridger, J.C. (1984): Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirüs and rotavirüs in bovine faeces. The Vet. Rec. 21,397-400.
20. Rodriguez, C.A.R., Brandao, P.E., Ferreira, F., Gregori, F., Buzinaro, G. and Jerez, J.A. (2004): Improved animal rotavirüs isolation in MA105 cells using different tripsin concentration. Arq.Inst.Biol. 71(4), 437-441.
21. Rubenstein, A.S. and Miller, M.F. (1982): Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for de-

tecting rotavirus. J. Clin. Microbiol. 15(5),
938-944.

- 22.** Şahna, K.C. ve Alkan, F. (2003): Sığırlarda Rotavirüs enfeksiyonunun epidemiyolojisinde gebeliğin rolü. F.Ü. Sağlık Bil. Derg. 17 (3), 203-209.
- 23.** Yazıcı, Z. (1992): Buzağılarda rotavirüs enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirüs antijenlerinin identifikasyonu. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi.