



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEONATAL BUZAĞI İSHALLERİNE KARŞI TİCARİ
BOVİNE ROTAVİRUS AŞISI İLE AŞILANAN
GEBE SIĞIRLARDAN DOĞAN BUZAĞILARDA
PASİF BAĞIŞIKLIK DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim İbrahim Oktay KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER VİROLOJİ ANA BİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Yakup YILDIRIM

BURDUR-2023

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEONATAL BUZAĞI İSHALLERİNE KARŞI TİCARİ
BOVİNE ROTAVİRUS AŞISI İLE AŞILANAN
GEBE SIĞIRLARDAN DOĞAN BUZAĞILARDA
PASİF BAĞIŞIKLIK DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim İbrahim Oktay KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER VİROLOJİ ANA BİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Yakup YILDIRIM

*Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0774-YL-21 proje numarası ile desteklenmiştir.*

BURDUR-2023

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli zamanını, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım, kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yakup YILDIRIM'a ve bu süreçte bana destek olan; meslektaşlarım İhsan BALLAN ve Ferit Kemal YENİ'ye, yine her zaman yardımlarını esirgemeyen Derya YENİ, doktora öğrencileri Ayşegül USTA ve Özge Sevinç KORKMAZ AKAR'a, laboratuvar çalışmam sırasında desteklerinden dolayı veteriner hekim Zehra COŞKUN'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu günlere gelebilmem için maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, sevgili aileme varlıkları ve destekleri için teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca bu araştırmaya katkılarından dolayı Dollvet A.Ş.'ye teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etiyoloji	3
2.2. Epidemiyoloji	6
2.3. Klinik Semptomlar	8
2.4. Patogenez	8
2.5. Teşhis	10
2.6. İmmunite	12
2.7. Koruma ve Kontrol	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Örneklenen Hayvanlar	15
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Örneklerin Toplanması	18
3.1.3. Viruslar	18
3.1.4. Fötal Dana Serumı	19
3.1.5. Hücre Kültürü	19
3.1.6. Konjugat	19
3.1.7. Mikropleyt	19
3.1.8. Polietilen Glikol (Polyethylene Glycol (PEG-6000))	19
3.1.9. Yıkama Solüsyonu (Wash Buffer)	20
3.1.10. Blocking Buffer	20
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	20
3.2.2. Virusların Üretilmesi	20
3.2.3. Virusların Mikrotitrasyon Yöntemi ile Enfeksiyözite Güçlerinin Belirlenmesi	21
3.2.4. PEG-6000 Yöntemi ile Viral Proteinlerin Konsantre Edilmesi ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay Sisteminin Hazırlanması	22
3.2.5. Hazırlanan ELISA Sistemiyle Çalışma Numunelerde Spesifik Antikor Varlığının Araştırılması	23
3.2.6. Pozitif Kan ve Süt/Kolostrum Serumlarında Antikor Titre Değerinin ELISA Yöntemi ile Saptanması	24

3.2.7. ELISA Cut-off Değerinin Tespiti ve Sonuçların Değerlendirilmesi	25
3.2.8. Sonuçların İstatistik Değerlendirilmesi	25
4. BULGULAR	26
4.1. Virusların Enfeksiyözite Güçleri	26
4.2. ELISA Sonuçları	26
4.3. Pozitif Kan ve Süt Serumlarının Antikor Titre Sonuçları	26
4.4. İstatistik Değerlendirme Sonuçları	35
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Rotavirus yapısı	4
Şekil 3.1.	Pozitif serumların $\log_2$ tabanına göre sulandırma metodu	24



TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Araştırmada kullanılan sığırların yaş dağılımları	15
Tablo 3.2.	Araştırmada kullanılan sığırların ırk dağılımları	16
Tablo 3.3.	Araştırma numunelerinin örnekleme zamanına göre dağılımı	17
Tablo 4.1.	Grup I'de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kan örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı	29
Tablo 4.2.	Grup I'de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kolostrum/süt örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı	30
Tablo 4.3.	Grup I'de yer alan sığırların buzağılarından örnekleme zamanına göre alınan kan örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı	31
Tablo 4.4.	Grup II'de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kan serumlarında, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı	32
Tablo 4.5.	Grup II'de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kolostrum/süt örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı	33
Tablo 4.6.	Grup II'de yer alan sığırların buzağılarından örnekleme zamanına göre alınan kan örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı	34

SİMGELER ve KISALTMALAR

BRV	Bovine Rotavirus
RNA	Ribonükleik Asit
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
NCDV	Neonatal Calf Diarrhea Virus
pH	Power of Hydrogen
NAHMS	National Animal Health Monitoring System
EM	Elektron Mikroskobi
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PCR	Polymerase Chain Reaction
FDS	Fötal Dana Serumu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Fosfat Buffer Salin
BSA	Bovine Serum Albumin
PEG	Polyethylen Glikol
OD	Optik Dansite

ÖZET

Neonatal Buzağı İshallerine Karşı Ticari Bovine Rotavirus Aşısı ile Aşılanan Gebe Sığırlardan Doğan Buzağılarda Pasif Bağışıklık Düzeyinin Araştırılması

Bu araştırmada, inaktif polivalan ticari aşı (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) ile aşılanan gebe sığırlarda Bovine Rotavirus (BRV) spesifik bağışıklığın düzeyi ile bunların yeni doğan buzağılarında BRV'ye özgü pasif bağışıklığın durumu incelendi. Bu amaçla, gebelik yaşlarına göre seçilen, 10 adedi aşı (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) uygulanan (Grup I) ve 10 adedi aşı uygulanmayan (Grup II) (kontrol grubu) olmak üzere toplam 20 gebe sığır kullanıldı. Grup I'deki sığırlar ticari aşı (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) prospektüsüne göre gebeliğin son trimesterinde aralarında 21 gün (3 hafta) olacak şekilde iki kez aşılandı. Her iki aşılama paralel olarak Grup I ve Grup II'deki sığırlardan doğum yaptıkları gün (1. gün) ve doğum sonrası 3. 7. 14. 21. 28. günlerde kan ve kolostrum/süt ve bu hayvanlardan doğan buzağılardan kolostrum almadan önce (1. gün) ve 3. 7. 14. 21. 28. günlerde kan örnekleri alındı. Toplanan bütün kan ve kolostrum/süt örnekleri BRV spesifik antikor varlığı/titresi yönünden ELISA yöntemi ile kontrol edildi. Belirlenen verilere göre, aşı uygulanmayan ve aşı uygulanan gebe sığırlara ait kan serumu ve kolostrum/süt numunelerindeki antikor düzeyi ile yeni doğan buzağının da pasif bağışıklık seviyesi ve aşılanmayan hayvanlarda hastalığa maruz kalma durumu değerlendirildi. Aşı uygulanan bütün gebe sığırlarda BRV ye spesifik antikor yanıtta belirgin bir artış ($\geq 1/1024 - 1/256$) tespit edildi. Buna paralel olarak aşı sığırların kolostrum almış yeni doğan buzağılarında da BRV pasif bağışıklık seviyesinin yüksek ($1/1024 - 1/128$) olduğu belirlendi. Aşı uygulanmayan grupta yer alan üç gebe sığırdan doğal BRV enfeksiyonu şekillendiği ve bu hayvanlarda da pasif immunizasyon olduğu belirlendi. Sonuç olarak, maternal bağışıklık yoluyla BRV kaynaklı neonatal buzağı ishallerini önlemek için sığırlara gebeliğin son döneminde, prosedüre uygun şekilde iki doz BRV aşı uygulamasının yararlı olduğu ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Aşı, Bovine Rotavirus, Maternal Bağışıklık, Neonatal Buzağı, Sığır

ABSTRACT

Investigation of Passive Immunity Level in Calves from Pregnant Cattle Vaccinated with Bovine Rotavirus Vaccine for Neonatal Calf Diarrhea

In this study, the level of Bovine Rotavirus (BRV) specific immunity in pregnant cattle vaccinated with the inactive polyvalent commercial vaccine (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) and the status of BRV-specific passive immunity in their newborn calves were investigated. For this purpose, a total of 20 pregnant cattle, 10 of which were vaccinated (Group I) and 10 of which were not vaccinated (Group II) (control group), selected according to their gestational age, were used. Cattle in Group I were vaccinated twice in the last trimester of pregnancy, 21 days (3 weeks) apart, according to the commercial vaccine (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) package insert. Parallel to both vaccinations, before receiving blood and colostrum/milk from cattle in Group I and Group II on the day of birth (1st day) and postpartum 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th days, and colostrum from calves born from these animals (1 Blood samples were taken on the 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th days. All collected blood and colostrum/milk samples were checked for BRV specific antibody presence/titer by ELISA method. According to the determined data, the antibody level in blood serum and colostrum/milk samples of unvaccinated and vaccinated pregnant cattle, passive immunity level of newborn calves and exposure to the disease in unvaccinated animals were evaluated. A significant increase in BRV-specific antibody response ($\geq 1/1024 - 1/256$) was detected in all pregnant cattle administered the vaccine. In parallel, it was determined that the passive immunity level of BRV was high ($1/1024 - 1/128$) in newborn calves of vaccinated cattle that received colostrum. It was determined that natural BRV infection was formed in three pregnant cattle in the group that was not vaccinated, and passive immunization occurred in these animals. In conclusion, it has been demonstrated that it is beneficial to administer two doses of BRV vaccine in accordance with the procedure in cattle at the end of pregnancy to prevent BRV-induced neonatal calf diarrhea through maternal immunity.

Keywords: Bovine Rotavirus, Cattle, Maternal Immunity, Neonatal Calf, Vaccine

1. GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde ana hedef sağlıklı ve verimli hayvanlar yetiştirmektir. Bunun sağlanabilmesinde ise ırk özelliklerinin arttırılması, besleme ve barındırma koşullarının iyileştirilmesi, enfeksiyöz ya da enfeksiyöz olmayan hastalıklar ile mücadele önemli bir rol oynamaktadır. Viral hastalıklar hayvan sağlığını ve refahını tehdit etmekle beraber özellikle büyük ruminant yetiştiriciliğinde verim üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı üreticinin ve hayvancılık sektörünün ekonomik kayıplar yaşamasına neden olmaktadır. Yeni doğan buzağı ishali altı haftalıktan küçük hayvanlarda en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri sayılmaktadır. Tedavinin maliyeti, diğer enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artması, büyüme oranlarının düşmesi ve buzağların ölümü gibi sonuçlar doğuracağından ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cho ve Yoon, 2014).

Buzağılarda meydana gelen ishal olgularında başlıca viruslar, bakteriler, protozoalar ve işletme şartları (besleme, bakım, hijyen koşulları) gibi etkenler rol oynamaktadır. Bovine Rotavirus (BRV) yeni doğan buzağı ishallerinin primer etiyolojik ajanlarının içerisinde yer almaktadır. Yeni doğan buzağılarda ishal etkeni olan Bovine Rotavirus erişkin sığırlarda da subklinik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Erişkin sığırlarda meydana gelen doğal enfeksiyon ya da aşılama sonucu oluşan BRV spesifik antikorların kolostrum ile yeni doğan buzağılara aktarıldığına yönelik çalışmalar mevcuttur ve bu yeni doğanların BRV enfeksiyonlarından korunmasında önemli rol oynamaktadır (Kahrs, 2001).

Planlanan bu araştırmada bir ticari aşı (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) ile gebeliğin 3. Trimesterinde aşılanan sığırlarda, doğum zamanında ve doğum sonrasında (28 gün) kan serumu ve kolostrum/sütteki bovine rotavirus spesifik antikor düzeyi ve bunlardan doğan buzağılarda pasif bağışıklık düzeyinin tespiti amaçlanmıştır. Böylece kullanılan aşının yeni doğanların bovine rotavirus enfeksiyonundan korumadaki etkinliği de belirlenecektir. Araştırma sonucunda elde edilen veriler ışığında, aşılama sonucu meydana gelen spesifik antikorların maternal olarak aktarımı ve bu aktarılan spesifik antikor titresinin düzeyi belirlenmiş olacaktır.

Bu doğrultuda söz konusu enfeksiyon ile mücadele hususunda bilimsel yaklaşımlar ortaya konulacaktır. Yapılacak bu araştırma ile hayvancılık sektöründe ciddi ekonomik kayıpların başlıca nedenlerinden biri olan rotavirusa karşı aşılamanın pasif bağışıklığa etkisi değeriendirilecek ve enfeksiyonla mücadelede BRV aşılmasının önemi belirlenecektir. Bunun yanı sıra rotavirus çalışmalarına dayalı literatür bilgisine de katkı sağlanacağı düşünölmektedir.



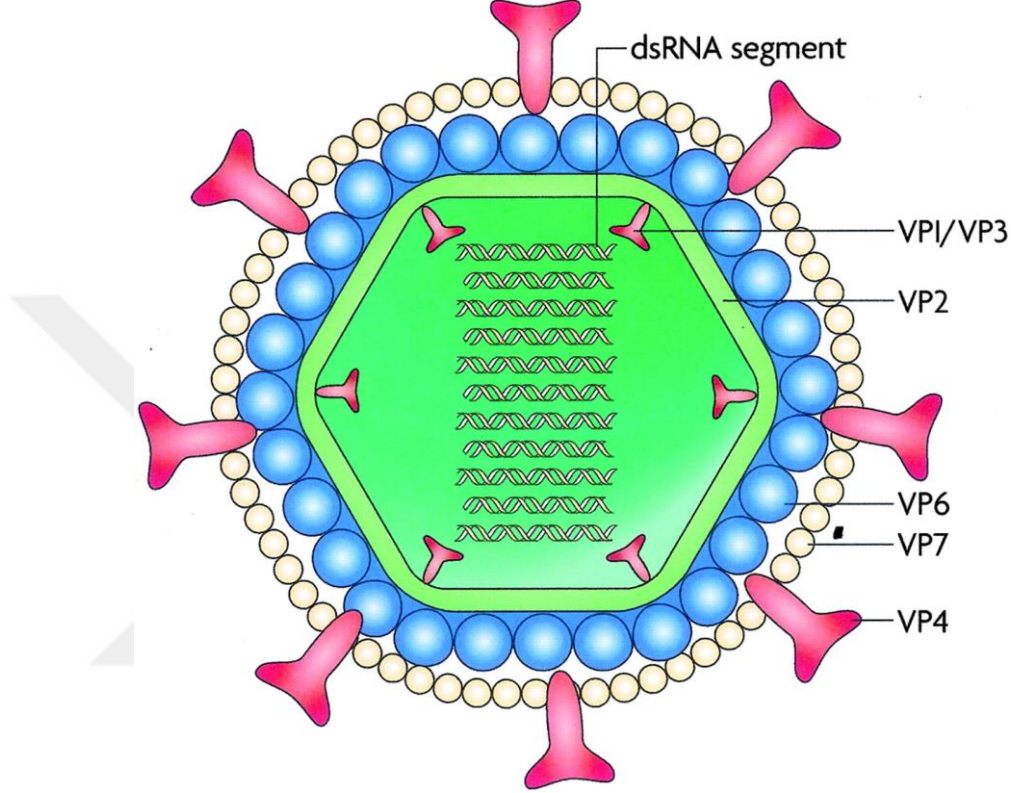
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

BRV ilk olarak 1969 yılında, ishalli buzağılardan alınan dışkı ve kolostrum almamış hayvanlarda deneysel olarak hastalığın oluşturulmasıyla daha önce tanımlanmamış bir virus olarak tespit edilerek yenidoğan buzağı ishalleri etiyojisine dahil edilmiştir (Mebus ve ark., 1969). BRV'ların bir RNA virus olduğu ve Reoviridae ailesinde yer aldığı keşfi 1973 yılında yapılmıştır (Woode ve ark., 1974). Ardından 1977 yılında McNulty ve ark., tripsin katkılı MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücrelerinde BRV'ları başarı ile üretmişlerdir. Matsuna ve ark., (1977) Afrika yeşil maymun embriyonik böbrek (MA104) hücreleri ile yaptıkları plak test sonucunda Neonatal Calf Diarrhea Virus (NCDV)'unun varlığını rapor etmişlerdir. Ülkemizde BRV enfeksiyonlarına yönelik olarak gerçekleştirilen ilk çalışma, Burgu ve Akça tarafından 1983 yılında erişkin hayvanlarda yapılan serolojik bir araştırmadır. Daha sonra yenidoğan ishalli buzağılarda BRV enfeksiyonunun varlığı, yapılan hücre kültürü virus izolasyonu ve moleküler düzeydeki araştırmalarda bildirilmiştir (Alkan, 1992; Burgu ve ark., 1995).

Rotaviruslar, dsRNA barındırma özelliğine sahip virusları içeren Reoviridae familyasının bir cinsi olarak sınıflandırılmaktadır. Etken zarfsız, çift zincirli ve 11 segmentten oluşan bir RNA genomuna sahiptir. Her bir segment en az bir viral genomun kodlanmasından sorumludur. Genomik segmentler, altı yapısal (VP1-4, VP6 ve VP7) ve altı yapısal olmayan (NSP1-NSP6) toplam 12 protein kodlamaktadır. Virion, üç tabakalı partikülden (Triple-Layered Particle, TLP) oluşan bir yapıya sahiptir. Bu tabakalar dış kapsid, iç kapsid ve öz bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Kalica ve ark., 1978). Rotavirus'a ait yapısal proteinlerden olan VP1, VP2 ve VP3 virus partikülü içerisindeki öz bölgesinde bulunmaktadır. VP7 ve VP4 dış kapsid içerisinde yer alan yapısal proteinlerdir. İç kapsidde yer alan ve virusun en önemli immunojenik proteini olan VP8 ise grup spesifik antijen özelliği göstererek öz bölgeyi çevrelemektedir (Estes ve Cohen, 1989). VP1, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz görevi yapmaktadır (Dhama ve ark., 2009). VP2 ise translasyon aşaması sırasında viral mRNA'ya bağlanarak çift iplikçikli RNA

segmentlerinin replikasyonunda görev almaktadır (Brüssow ve ark., 1990). Dış kapsid proteinini olan VP4 virusun yüzeyinde bulunan bir çıkıntı (spike) proteinidir. VP4'ün penetrasyon, nötralizasyon, hemagglütinasyon ve virulans gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Kalica ve ark., 1983). Diğer bir dış kapsid proteinini olan VP7 kuvvetli bir immunojen olup nötralizan atikor seviyesini arttırmaktadır.



Şekil 2.1. Rotavirus yapısı (Dennehy, 2008)

Rotavirus'a ait yapısal olmayan proteinler NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 ve NSP6'dır. NSP3 viral replikasyon esnasında protein sentezi translasyonunun arttırılmasında görevlidir. NSP4 ise plazma membranının permeabilitesini ve epitel hücre yüzeyleri arasındaki bağlantıların yapsını değiştirerek hücrelerin kalsiyum salınımını uyarak, sıvı ve elektolit dengesini etkilemektedir. Bu rotavirusun ishal semptomlarına katkıda bulunan temel mekanizmadır.

VP4 ve VP7, nötraliz edici antikorların üretimini ve koruyucu bağışıklığı indüklediğinden, bu proteinler aşı üretiminde suş seçimi için merkezi bir rol oynamaktadır ve ikili bir sınıflandırma sisteminin yani G (glikoprotein) ve P (proteaz duyarlı) temelini oluşturmaktadırlar. VP7 G serotipini temsil ederken VP4 ise P

serotipini temsil etmektedir. Rotavirusun bilinen 27 farklı G ve 37 farklı P serotipi bulunmaktadır (Cho ve Yoon, 2014). Sığırlarda tanımlanan rotavirusların ana G tipleri G6, G8 ve G10'dur, fakat buzağılarda diğer G türleri (G1, G2, G3, G7, G11 ve G15) de belirlenmiştir. Sığır rotaviruslarının en yaygın P tipleri ise P[1], P[5] ve P[11] olmaktadır (Timurkan ve Alkan, 2020).

Rotaviruslar iç viral kapsid proteini VP6'nın antijenik özelliklerine ve nükleotid dizi çeşitliliğine göre 9 gruba (A-H) ayrılmaktadırlar. Grup A rotavirus (RVA), Grup B rotavirus (RVB), Grup C rotavirus (RVC), Grup D rotavirus (RVD) ve Grup E rotavirus E (RVE). Üç ek tür denemesi vardır: Grup F rotavirusu (RVF), Grup G rotavirusu (RVG) ve Grup H rotavirusu (RVH). Son zamanlarda, köpeklerde yeni bir Grup I rotavirus (RVI) ve Grup İ rotavirusu tanımlanmıştır (Choudhary ve ark., 2017; Matthijnssens ve ark., 2012).

Grup A, B, C rotavirusları insan ve hayvanlarda ortak olarak bulunurken, grup D, E, F sadece hayvanlarda bulunmaktadır (Estes ve Cohen, 1989). Grup A özellikle insanlarda çocukluk çağı ishallerinin önde gelen nedenlerindendir ve viral patojenleri %40'ını oluşturur (Bernstein, 2009). Ayrıca genç çiftlik hayvanlarında, pek çok memeli ve kuş türünde önemli enfeksiyöz ishal etkenidir. Dış kapsid proteinlerindeki antijenik farklılıklara dayanarak, A grubu rotaviruslar en az 20 farklı P (VP4) tipi ve 14 G (VP7) tipi olarak sınıflandırılmıştır. Yenidoğan buzağı ishallerinde de Grup A rotavirusları ön plana çıkmaktadır. Grup A ve B rotavirusları buzağı ve kuzuları enfekte etmekle birlikte Grup A daha yaygın olarak karşılaşılmakta ve klinik olarak daha çok önem taşımaktadır (Alfieri ve ark., 2004). Bununla beraber, B grubu rotaviruslar genellikle ishalleri yetişkin buzağılardan izole edilmektedir. Bazı buzağı rotavirus izolatları, insan eritrositlerini hemaglutine etme özelliğine de sahiptir. Pararotaviruslar olarak da adlandırılan Grup C ilk olarak 1980 yılında Saif ve ark. tarafından domuzlarda tespit edilmiştir. Ardından 1982 yılında C grubu rotavirusların insanda tespiti gerçekleştirilmiştir (Rodger ve ark., 1982). Albert ve ark., (1987) hayvanlarda enfeksiyon oluşturan rotavirus etkenleri ile insanlarda enfeksiyon oluşturan rotavirus etkenlerinin arasındaki çapraz reaksiyonun varlığını PAGE tekniği kullanarak ortaya koymuşlardır. Rotavirus enfeksiyonlarına yönelik yapılan epidemiyolojik çalışmalar, insan ve hayvanlar arasında sürekli

dolaşım halinde bulunan suş çeşitlerinin arttığını göstermektedir. Bu artışın temel sebepleri arasında nokta mutasyonlarının zaman içerisindeki birikimi ile açıklanabilmektedir (Iturriza Gmara ve ark., 2003).

Rotaviruslar geniş bir konakçı dağılımına sahip olmasının yanı sıra, dış etkenlere dirençlidir. Etken dış ortamda aylarca varlığını sürdürebilmektedir. Bu sebeple enfekte haldeki ishalleri buzağıların gaitaları ciddi bir kontaminasyon kaynağı oluşturmaktadır (Murphy ve ark., 1999). Yüksek pH'ın spike proteini olan VP4'n yapısını bozduğu bildirilmiştir (Anthony ve ark., 1991). Ayrıca virusa ait hemaglnitasyon aktivitesi 45°C'de kaybolmaktadır. Tekrarlayan dondurma ve zdrme işlemleri ile de enfektivite ve hemaglnitasyon aktivitelerinin bozulabildiği tespit edilmiştir (Estes ve ark., 1979). Ayrıca fenol, klorin ve formalin gibi dezenfektan maddeler ile virusun enfeksiyzitesinin inaktive edilebileceği bildirilmiştir (Kurtz, 1980).

2.2. Epidemiyoloji

Sığır yetiştiriciliğinde verimin önemli bir ölçüsü olan sağlıklı buzağı yetiştiriciliğinde doğumu takiben ilk 0-28 günler neonatal dönem olarak geçmektedir ve bu dönem BRV enfeksiyonu için en kritik dönemdir (Mickelsen ve Evermann, 1994). Buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde iki etken oldukça önemlidir. İlk olarak, virus partikülleri enfekte olmuş dışkıda fazla miktarlarda (10^{10} - 10^{12} partikül/ml) bulunmaktadır. İkincisi, virus inaktivasyona dirençlidir. Buzağı rotavirusunun oda sıcaklığında dışkıda 9 ay yaşayabildiği ve 60 °C'ye bir saat dayanabildiği gösterilmiştir (Geletu ve ark., 2021). Ayrıca rotaviruslar, yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar tarafından kolayca inaktive edilemez. Bu, evre kirliliğinin hem ağır hem de kalıcı olduğu anlamına gelir. Bu nedenle, kontamine bir ortamda bir buzağılama mevsiminden diğerine hayatta kalan rotavirus meydana gelen bir salgında enfeksiyon kaynağı olabilmektedir (McNulty ve ark., 1983).

Rotaviruslar oldukça bulaşıcıdır, çevreye dışkı ile saçılımı yüksektir. Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde, klinik enfekte yeni doğanların yanı sıra subklinik enfekte yetişkin hayvanlar da enfeksiyon kaynağı olmaktadır (Soltan

ve ark., 2016). Rotavirus bulaşmasının birincil yolu fekal-oral bulaştır ancak bazı çalışmalarda solunum yolu salgılarında ve diğer vücut sıvılarında düşük titrelerde virus bildirilmiştir. Bu durum rotavirusun aerosol, ikincil nesneler ve gıda-su alımı ile bulaşma olasılıklarına işaret etmektedir (Castrucci ve ark., 1994; Dennehy, 2000; Asadi ve ark., 2015). Rotavirus atılım süresi literatürde bulunan çalışmalarda değişkenlik göstermektedir. Brezilya’da bir sütçü süründe ishal oluşumunun boylamsal değerlendirmesine ilişkin yakın tarihli bir rapor, rotavirusun dışkıyla atılımının 1-3 gün sürdüğünü belirtmiştir (Coura ve ark., 2015). Deneysel çalışmalarda da rotavirus atılımının 10 güne kadar sürdüğü bildirilmiştir (Fernandez ve ark., 1998).

Yeni doğan buzağı ishali yaygın olarak bildirilen bir hastalıktır ve sığır yetiştiriciliğinde ortaya çıkan ekonomik kaybın önemli bir nedenidir. ABD Ulusal Hayvan Sağlığı İzleme Sistemi (NAHMS) 2007 yılında buzağı ölümlerinin yaklaşık olarak %57’sinin ishal kaynaklı olduğunu bildirmiştir (Anonim, 2023). Yakın zamanda Kore’de süt buzağılarında ishal nedeni ölüm oranını %53.4 olarak bildirmiştir (Hur ve ark., 2013). Buzağı üretiminin yılda yaklaşık 280.000 baş olduğu Norveç’te ise buzağı ölümleriyle ilişkili ekonomik kaybın 2006 yılında 10 milyon ABD dolarına yakın olduğu tahmin edilmektedir (Østerås ve ark., 2007). Yeni doğan buzağı ishalleri altı haftalıktan küçük hayvanlarda en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden birisidir (Rocha ve ark., 2017). Bu buzağılarda, ishal enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan nedenlerle ilişkili olan çok faktörlü bir durumdur. Yeni doğan buzağı ishalleri etiyolojisinde yer alan bakteri, virus ve protozoa etkenlerinden en yaygın karşılaşılan viral ajan Brezilya, Hollanda, Avustralya, ABD ve Yeni Zelanda’da yapılan çalışmalarda da bildirildiği üzere Bovine Rotavirus Grup A’dır (Al Mawly ve ark., 2015; Bartels ve ark., 2010; Cho ve ark., 2013; Cho ve Yoon, 2014; Izzo ve ark., 2011; Langoni ve ark., 2004).

Ülkemizde de ishal semptomlu sığır ve buzağılarda BRV etkenli enteritislerin varlığı çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Alkan, 1992; Burgu ve ark., 1995). Burgu ve Akça (1983)’nın gerçekleştirdiği çalışmada BRV seropozitiflik oranı %28,3 olarak bildirilirken daha sonra Burgu ve ark., (1995) bu oranı %31 olarak tespit etmişlerdir. Yazıcı (1992), sağlıklı ve ishal semptomlu buzağılardan topladığı

kan ve dışkı örneklerinde %22,86 rotavirus antikoru ve %17,8 oranında da rotavirus antijeni tespit etmiştir. Ardından Alkan ve ark. tarafından 1999 yılında ileri gebe sığırlarda gerçekleştirilen bir araştırmada %43,8 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Daha yakın tarihte Kuzeydoğu bölgesindeki aşılanmamış sığırlardan alınan 498 adet kan serum numunesinde BRV seropozitiflik oranı %29,31 (146/498) olarak bildirilmiştir (Yıldırım ve ark., 2008).

2.3. Klinik Semptomlar

Klinik semptomlar genellikle 1 aylıktan küçük genç buzağılarda daha yaygın olarak ortaya çıkar (Alfieri ve ark., 2006). Rotavirus enfeksiyonları çoğunlukla subklinik ya da hafif şiddetli seyreder ve 3-5 gün içerisinde bulgular tamamen kaybolur (Fields ve ark., 1996). Enfeksiyonun şiddetini arttıran faktörlerin varlığında ise klinik belirtiler belirginleşebilir ve prognozu etkileyebilir (Holland ve ark., 1990).

Klinik tablonun orta şiddetli ve şiddetli seyrettiği durumlarda sulu diareye bağlı olarak sıvı ve elektrolit kaybı şekillenir ve bu durum elektrolit dengesizliklerine, bağırsaklarda bikarbonat kaybıyla ortaya çıkan metabolik asidoza, anoreksiye ve sistemik dehidrasyona yol açar (Holland ve ark., 1990). Medikal şartlara ve tedavinin durumuna bağlı olarak farklı sistemlerde çeşitli komplikasyonlar görülebilir. Merkezi sinir sisteminde menenjit, ensefalit veya ensefalopati ortaya çıkabilir (Nakagomi ve Nakagomi, 2005). Şiddetli elektrolit dengesizliği ve hipovolemi prognozu kötüleştirerek kardiyak arreste sebep olabilir (Holland ve ark., 1990).

2.4. Patogenez

Farklı rotavirus tipleri solunum yolu sekresyonunda ve diğer vücut sıvılarında tespit edilmiş olması hava ve su yoluyla da bulaşmanın mümkün olduğunu gösterse de, temel bulaşma fekal-oral yolla olur (Dennehy, 2000). Sığırlarda görülen rotavirus grubu suşları enteropatojen ajanlardır ve oral yolla vücuda alınmalarından sonra özellikle ince bağırsakların üst ve orta villuslarındaki enterositlere affinite göstererek yerleşirler (Lungden ve Svensson, 2001). Ardından özellikle ince bağırsak villuslarındaki emilimde ve enzim üretiminde rol oynayan enterositlerin

sitoplazmalarında çoğalarak dejenerasyona yol açarlar. Yerleştikleri hücrelerin ölümüyle beraber diğer hücreleri enfekte ederler. (Geletu ve ark., 2021). Yapılan çalışmalar virusun hücrelere direkt veya kalsiyum kanalları yoluyla giriş yaptığını göstermiştir (Martella ve ark, 2010).

Enterositlerde çoğalan viruslar, villuslarda kısalmaya ve yapısal dejenerasyona neden olur (Ball ve ark, 1996). Mikroskopik olarak villuslarda atrofi, mononükleer hücre infiltrasyonu ve vakuoler dejenerasyon gibi bulgular tespit edilir (Davidson ve Barnes, 1979). Rotavirusların bir diğer etkisi çoğalırken ürettikleri NSP4 tipi enterotoksinlerdir ve enterotoksinler klinik semptomların ortaya çıkmasında önemli rol oynar (Morris ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalar rotavirus kaynaklı diarenin mekanizmasını tam olarak ortaya koyamamıştır. Villuslardaki hasar nedeniyle bağırsaklardaki tuz ve su emiliminde gerçekleşen azalmanın diarenin temel sebebi olduğu düşünülmektedir. Bu konuda birden fazla görüş ortaya atılmıştır (Geletu ve ark., 2021). Birincisi disakkaritlerin emiliminde ve hidrolizinde gerçekleşen bozulma nedeniyle ortaya çıkan ozmotik diare görüşüdür (Anderson ve Weber, 2004). Bir diğer görüşe göre salgılanan NSP4 enterotoksinleri kalsiyum kanallarını açarak sodyum ve su sekresyonunda artışa sebep olmakta ve bu yüzden sekretorik diare gelişmektedir (Jayaram ve ark., 2004). Üçüncü görüş ise enterositlerdeki kalsiyum artışının neden olduğu hücresel ölümlerin, yeni hücre oluşumundan daha hızlı olması nedeniyle villusların kısalması ve buna bağlı olarak malabsorbsiyonun gelişmesi sürecini ortaya koymuş ve diareyi bununla ilişkilendirmiştir (Hagbom, 2015). Bu çalışmalar rotavirus diarelerinde birden fazla faktörün rol oynama ihtimalinin en kapsayıcı görüş olduğunu ortaya koymaktadır.

Viremi dönemi konağın yaşına, immunolojik kapasitesine, beslenme durumuna, çevresel faktörlere, viral yüke ve konakta başka herhangi bir enfeksiyon olup olmamasına bağlı olarak 12 saat ile 96 saat arasında şekillenebilir (Crawford ve ark., 2017). Her ne kadar mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, yapılan çalışmalar antikorların oynadığı rolü, sistemik ve lokal immunitenin önemini ortaya koymuştur (Desselberger ve Huppertz, 2011). IgA, IgG ve IgM antikorlarının varlığı

rotavirus enfeksiyonuna karşı önemli bir bariyer oluşturmaktadır (Ramig, 2004; Desselberger ve Huppertz, 2011). Özellikle maternal IgG antikorlarının yeni doğanların korunmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir, dolayısıyla yeterli kolostrum alımı ve pasif transferin neonatal buzağların enfeksiyona karşı direncini büyük ölçüde etkilemektedir (Chan ve ark., 2011)

Buzağlarda enfeksiyonun şiddeti kolostrum alımı ve diğer enfeksiyonların varlığıyla doğrudan ilişkilidir (Steele ve ark., 2004). Normalde yüksek morbidite ve düşük mortalite ile seyreden rotavirus enfeksiyonlarında *Escherichia coli* ya da coronavirus enfeksiyonunun varlığı mortaliteyi arttırabilir (Geletu ve ark., 2021). Enfeksiyonun şiddetini etkileyen diğer faktörler arasında hijyenik olmayan barınma şartları, yeterli havalandırmanın sağlanamaması, yüksek gece-gündüz sıcaklık farkı, iklim şartları gibi çevresel faktörler ile virusun suşu, vücuda alınan viral yük gibi etiyolojik faktörler bulunur (Holland ve ark, 1990; Dama ve ark., 2009).

2.5. Teşhis

Rotavirus enfeksiyonuna bağlı hastalık salgınlarının yönetimi ve kontrolü için rotavirusun laboratuvar tanısı çok önemlidir. Viral gastroenterite, coronavirus, noroviruslar, astroviruslar ve adenoviruslar gibi farklı viral etkenler neden olmaktadır. Spesifik enfeksiyöz ajanları klinik muayene ile teşhis etmek çok zordur, bu nedenle laboratuvar teşhisi kesin teşhis için önemli bir role sahiptir (Geletu ve ark., 2021).

Etkenin laboratuvar tanısı için enfeksiyonun erken döneminde dışkıda direkt yöntemler ile antijen tespiti, etkene spesifik antikorların tespiti ve hücre kültüründe virus izolasyonu yöntemleri kullanılabilir. Direkt yöntemler ile antijen tespitinde elektron mikroskobu (EM) ve ELISA yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. EM yöntemi pahalı donanım ihtiyacı ve sınırlı pratik kullanımı ile rutin teşhiste çok tercih edilmemektedir. Klinik örneklerin teşhisinde laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntem ELISA yöntemidir. Bu yöntemlere ek olarak viral nükleik asitin belirlenmesi ve virus identifikasyonu amacı ile yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntem Polimeraz Zincir Reaksiyon (Polymerase Chain

Reaction-PCR)'dur. Virus izolasyon testi, örneklerde viral patojenlerin varlığını tespit etmek için hala "altın standart" olarak kabul edilen doğrulayıcı bir teşhis testidir.

Rotavirus'a karşı oluşmuş spesifik antikorların tespiti amacıyla serum nötralizasyon testi, hemaglütinasyon-inhibisyon ve ELISA gibi serolojik testler de uygulanmaktadır (Estes ve Cohen, 1989). Serum nötralizasyon testi BRV spesifik antikorlarının tespitinde uluslararası alanda kabul gören bir test olmasına rağmen ELISA ile karşılaştırıldığında, bazen numunelerde yer alan nötralizasyon inhibe edici antikor faktörlerinin bulunması yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Ustaçelebi ve Us, 2008).

Hücre kültürü teknikleri yaygın olarak tanı amaçlı virus izolasyonu, ayrıca aşı üretimi için virus yayılımı ya da antijenik varyasyon gibi daha fazla virus karakterizasyonu için kullanılmaktadır. BRV'nin izolasyonu, rotavirusa özgü birincil hücre kültürlerinde (buzağı böbrek hücreleri) ve hücre hatlarında (MA 104-Simian orijinli, MDBK, HT-29 ve PK15) gerçekleştirilir. Hücre kültürü sisteminde hücrelerin yuvarlanması ve ayrılması da dahil olmak üzere sitopatik etkinin (CPE) ortaya çıkmasıyla BRV varlığı ortaya koyulmaktadır. Hücre kültüründe rotavirusun dışkı örneklerinden izolasyonu, enfeksiyonunun doğrulayıcı teşhisinin en geleneksel yoludur ve hastalıkla virus ilişkisinin nihai kanıtını verir, ancak hassasiyet oranı çok düşüktür ve işleme süresi oldukça zaman alıcıdır. CPE artışının, ortama küçük miktarlarda tripsin dahil edilmesiyle ve dışkı örneklerinin tripsin ile ön işleme tabi tutulmasıyla arttığı gösterilmiştir. Bu konuda yapılmış ilk çalışma Spendlove ve Schaffer tarafından 1965 yılında gerçekleştirilmiştir. Proteolitik enzimlerin (tripsin, pankreatin) eklendiği hücre kültürlerinde virus enfektivitesinin arttığını gösteren bu çalışma reovirüsler üzerinde yapılmıştır. Ardından rotavirus üretimi amacı ile gerçekleştirilen birçok çalışma sonucunda da aynı sonuç bildirilmiştir (Almeida ve ark., 1978; Babiuk ve ark., 1977). Bir örnekte hedef virusun yaşayabilirliği, virus izolasyonunun başarısı için kritik öneme sahiptir (Geletu ve ark., 2021).

2.6. İmmunite

BRV enfeksiyonu genellikle lokal olarak seyreden bir enfeksiyondur. Enfeksiyonun seyrinde iki farklı immunolojik görüş bulunmaktadır. Bu görüşlerin temelinde bağırsak lümeninde bağışıklık mevcut ise immün mekanizmanın etkili olması ve hastalığın prognozunda serumdaki antikorların sekonder olarak görev alması bulunmaktadır (Burgu ve ark.,1995). Gastroenteritise sebep olan viral etkenlerden en çok etkilenen gastrointestinal yüzey ince bağırsaklardır. İnce bağırsaklarda meydana gelen immunizasyon esnasında peyer plaklarında yer alan lenfositler oldukça büyük bir öneme sahiptir. Burada oluşan lenfositlerin %80'ini B lenfositler, %20'sini ise T lenfositler meydana getirmektedir. Bağırsakların lamina propria katmanında bulunan ve immunglobulinlerin (Ig) üretiminden soorumlu olan B lenfositler çoğunlukla IgA ve daha az miktarda IgM üretmektedir ve bu üretim BRV enfeksiyonundan korunmada etkilidir (Bachmann ve Hess, 1983).

Yeni doğan buzağılarda aktif bağışıklık gelişmeden önce kolostrum ile aktarılan pasif maternal antikorlar, BRV enfeksiyonunun kontrolü açısından önemli bir yer tutmaktadır (Burgu, 1988). Postnatal dönemde sütte bulunan antikor titresi 3-7 gün içerisinde hızlı bir azalma göstermekte ve buna bağlı olarak buzağılarda enfeksiyon riski artmaktadır (Snodgrass ve ark., 1980). Doğal enfekte sığırlardan doğan buzağılara aktarılan antikor titresi, annenin enfeksiyonu geçirdiği döneme ve maruz kaldığı antijen miktarı gibi faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Ancak doğal enfeksiyon sonrasında oluşan serum antikor düzeyinin çok yüksek seviyelerde olmadığı ve dolayısıyla kolostrum yolu ile yavruya aktardığı maternal antikorların yeni doğanı BRV enfeksiyonundan korumada yetersiz kaldığı belirtilmiştir (Kohara ve Tsunemitsu, 2000; Can Şahna ve Alkan, 2003). Sığırların gebelik dönemi süresince aşılması ile sütteki/kolostrumdaki antikor titresinin artması ve maternal antikor atılım süresinin uzamasına yönelik yapılan birçok çalışma mevcuttur (Mebus ve ark., 1973; Snodgrass ve ark., 1980; Le Rousic ve ark., 2000). Yetişkin sığırlar da herhangi bir klinik semptom göstermeden subklinik bir şekilde BRV ile enfekte olabilmekte ve virusun saçılımını sağlayabilmektedir. BRV'ye karşı oluşturulan aşılama çalışmaları hem subklinik enfeksiyonların önlenmesinde hem de maternal

antikorlar ile yeni doğanların enfeksiyona maruziyetini önemli ölçüde azaltmaktadır (Atlı ve ark., 2018).

2.7. Koruma ve Kontrol

Rotavirus ile enfekte olan ishalleri hayvanların dışkılarında çok fazla miktarda antijen bulunması ve etkenin dış ortam şartlarına dirençli olması hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır. Enfeksiyonun kontrol altına alınmasında, hayvanların yetiştirildiği ortamın hijyen koşullarına, seronegatif hayvanlar ya da hastalığa duyarlı halde bulunan yeni doğanların hijyen, bakım-besleme ve aşılama gibi koruma yöntemlerine yönelik yapılacak iyileştirmeler BRV enfeksiyonuna bağlı ekonomik kayıpların önüne geçilmesine olanak sağlayacaktır.

Yeni doğanların BRV enfeksiyonundan korunmasında gebe sığırların gebeliğin geç dönemlerinde aşılması ile annelerde elde edilen yüksek antikor titresinin maternal antikorlar yoluyla enfeksiyona yönelik etkin korunmanın sağlanması ve buzağuların aktif bağışıklığa geçme sürecinde ticari aşılar ile aşılmasının önemli olduğu bildirilmiştir (Snodgrass ve ark., 1980; Fernandez ve ark., 1998). Ancak maternal antikorların etkin olduğu dönemde buzağılara uygulanan oral aşılardan, maternal antikorlar tarafından engellendiği bilinmektedir. Bu nedenle enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde, BRV'ye spesifik antikorların kolostrum/süt yolu ile aktarımının olduğu durumlarda oral aşılamadan gereksiz olduğu düşünülmektedir (Radostits ve ark., 2007).

BRV enfeksiyonunun şekillendiği durumlarda etkene spesifik bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Hastaların bağışıklık sistemlerinin güçlendirilmesi, ishal kaynaklı meydana gelebilecek olan dehidrasyon ve elektrolit dengesizliklerinin yerine konması amacı ile sıvı tedavisi yapılmalıdır. Meydana gelebilecek olan sekonder enfeksiyonlara yönelik olarak antibiyotik tedavisi ile destekleyici bir tedavi protokolü oluşturulmalıdır (Kaplun ve ark., 2013).

Ülkemizde ve dünyada finansal olarak önemli kayıplara neden olan yeni doğan buzağı ishallerine bağlı ölümlerin azaltılmasına/önlenmesine yönelik yapacağımız araştırmada, gebeliğin takriben son 6 haftasında bulunan ticari BRV aşısı (6'lı karma inaktif aşı) ile aşılanan sığırlardan doğan yavruların, aşının içeriğinde bulunan BRV'nin G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşlarına karşı maternal yol ile aldıkları antikorların titrelerinin doğumdan itibaren belirli aralıklarla tespiti yapılacaktır. Böylece buzağılardaki BRV pasif bağışıklık seviyesinin zamana bağlı titresi de belirlenecektir. Elde edilen sonuçlar ülkemizde ishale neden olan BRV'nin G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşlarının sebep olduğu buzağı ishallerinin profilaktik olarak engellenmesi, söz konusu enfeksiyona karşı aşılanmanın öneminin belirlenmesi ve ülkemizdeki rotavirus kaynaklı buzağı ishalleri hakkında bilgilerin güncellenmesi bakımından önem arz etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklenen Hayvanlar

Bu çalışmada, yaşları 3 ile 8 arasında değişkenlik gösteren ve gebelik dönemlerine göre seçilen toplam 20 adet gebe sığır kullanıldı. 20 adet gebe sığırdan 10 adedine deri altı yolla 5 ml inaktif polivalan aşı (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) uygulandı ve Grup I (Deney Grup) olarak sınıflandırıldı. Diğer 10 adedine ise aşı uygulaması yapılmayarak Grup II (Kontrol Grup) olarak sınıflandırıldı. Karma olarak hazırlanan ticari inaktif aşının içeriği 3 adet BRV suşu (G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11)), 2 adet E. Coli suşu ve bovine coronavirusdan (BCoV) oluşmaktadır. Grup I'deki gebe sığırların aşılması ticari aşının prospektüsünde belirtildiği üzere gebeliğin takriben son 6 haftasında (gebeliğin son trimesterinde) ve iki aşılamasının arasında 21 gün olacak şekilde uygulandı. Yani birinci aşı doğumdan takriben 42 gün önce, ikinci aşı uygulaması ise yaklaşık olarak doğumdan 21 gün önce uygulandı. Aşılamalar öncesinde gruplardaki sığırlardan kan örnekleri alındı. Ayrıca Grup I ve Grup II'deki doğum yapan hayvanlardan ve yeni doğan buzağılardan doğumun gerçekleştiği gün (1. gün), doğum sonrasında 3.7.14.21. ve 28. günlerde kan örnekleri toplandı. Ek olarak doğum yapan sığırların belirtilen günlerde kolostrum/süt örnekleri de toplanarak çalışmaya dahil edildi (Tablo 3.3).

Grup I ve Grup II de yer alan sığırların ırk ve yaşları ile ilgili bilgiler Tablo 3.1 ve Tablo 3.2 de verildi.

Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan sığırların yaş dağılımları

Yaş aralığı	Grup I	Grup II
3-4	4	4
5-6	4	4
7-8	2	2
Toplam	10	10

Tablo 3.2. Araştırmada kullanılan sığırların ırk dağılımları

İrk	Grup I	Grup II
Holstein	8	8
Simental	2	2
Toplam	10	10

Grup I ve II deki' hayvanların tamamı araştırma süresince birbirleri ile ve diğer hayvanlarla temas etmeyecek şekilde ayrı ayrı bölümlerde barındırıldılar.

Bu araştırmanın yapılabilmesi için gerekli izin, Burdur İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nden alındı (Tarih: 03.09.2021, Sayı: E-69877819-325.04.02-2559637).

Ayrıca bu tez çalışmasının yürütülmesi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi'nin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MAKÜ-HADYEK, 15.09.2021/805) tarafından uygun görülmüştür.

Tablo 3.3. Araştırma numunelerinin örnekleme zamanına göre dağılımları

		Doğum Öncesi			Doğum Sonrası						
Grup I (Deney Grubu)		Alınan Numune	1. Aşı (n)	2.Aşı (n)	1. Gün (n)	3. Gün (n)	7. Gün (n)	14. Gün (n)	21. Gün (n)	28. Gün (n)	Toplam Numune
		Kan	10	10	10	10	10	10	10	10	80
	Anne	Kolostrum/Süt			10	10	10	10	10	10	60
	Buzağı	Kan	10	10	10	10	10	10	10	10	60
	Anne	Kan			10	10	10	10	10	10	80
		Kolostrum/Süt			10	10	10	10	10	10	60
	Buzağı	Kan			10	10	10	10	10	10	60
										Toplam	400

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Örneklerin Toplanması

Araştırma planına uygun olarak belirlenen zamanlarda deney grubu 10 sığırdan toplam 80 kan serumu, toplam 60 kolostrum/süt serumu ve bu sığırlara ait 10 buzağıdan toplam 60 kan serumu olmak üzere Grup I'den 200 adet örnek toplandı. Benzer şekilde kontrol grubu 10 sığırdan da belirtilen zamanlarda toplam 80 kan serumu, toplam 60 kolostrum/süt serumu ve bu sığırlara ait 10 kontrol buzağıdan toplam 60 kan serum örneği olmak üzere Grup II'den de 200 adet örnek toplandı (Tablo 3.3).

Tez çalışmasında kullanılan kan örnekleri hayvanların klinik muayenelerini takiben usulüne uygun olarak *vena jugularis* 'ten steril koagülanlı tüplere alınarak soğuk zincir şartlarında laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen kan numuneleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan serum kısmı stok tüplerine koyuldu. Daha sonra bu serum örnekleri 56°C de 30 dakika inaktivasyona tabi tutuldu ve sterilite kontrolü yapıldıktan sonra test aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

Kolostrum/süt örnekleri ise steril cam tüplere alınarak soğuk zincir şartlarına uygun bir şekilde laboratuvara getirildi. 3000 rpm'de 20 dakika santrifüjden sonra, üst tarafta toplanan yağ tabakası steril bir pastör pipeti ile alınarak yağ tabakasının altında bulunan sıvı kısım stok tüplerine aktarıldı. Bu işlemten sonra 56°C'de 30 dakika inaktive edilerek test aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

3.1.3. Viruslar

Araştırmada uygulanan indirekt ELISA yönteminde Bovine Rotavirus'un A grubunda bulunan G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşları kullanıldı. Söz konusu viruslar ticari firma olan Dollvet Biyoteknoloji A.Ş. stoklarından temin edilmiştir.

3.1.4. Fötal Dana serumu

Hücrelerin kültivasyonu sırasında vasat desteği olarak, hücre çoğalmasını ve tutunmasını etkileyen çok sayıda büyüme faktörü, mineral, lipit ve hormonları içeren fötal dana serumu (FDS, Biochrom S0113, 101 Bio-P761-1) kullanıldı.

3.1.5. Hücre Kültürü

Bovine Rotavirus'un G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşlarının üretilmesi, titrelerinin belirlenmesi ve bu suşlara spesifik antikorların tespiti amacıyla uygulanacak olan serum nötralizasyon testinde Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre hattından yararlanıldı. Hücre üretme vasatı olarak %10 inaktif fötal dana serumu (FDS, Biochrom S0113, 101 Bio-P761-1) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma, ABD- RNBj9368) vasatı kullanıldı.

3.1.6. Konjugat

ELISA yönteminde sekonder antikor olarak, rotavirusa özgü HRPO işaretli goat anti-bovine rotavirus konjugatı (ViroStat, 0504, USA) kullanıldı.

3.1.7. Mikropleyt

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sisteminde 96 gözlü, düz tabanlı, antijen/antikor tutuculuğu yüksek özel mikropleytler (Greiner, Bio-one, 655061, Germany) kullanıldı.

3.1.8. Polietilen Glikol (Polyethylene Glycol (PEG-6000))

ELISA sisteminde BRV G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşlarının konsantre edilmesinde (çöktürülmesinde) amacıyla ticari PEG (PEG-6000, Merck, Germany) kullanıldı.

3.1.9. Yıkama Solüsyonu (Wash Buffer)

Yıkama solüsyonu olarak fosfat buffer salin (PBS) + %0,5 Tween-20 (polyethylene glycol sorbitan monolaurate, Merck, Germany) karışımı (PBST) kullanıldı.

3.1.10. Blocking buffer

Hazırlanan ELISA sisteminde spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloklama pleyt gözlerine bloklama yapıldı. Bu amaçla, çalışmada kullanılan mikropleytlerin gözlerinin antijenle kaplanması sonrasında PBST karışımına %3 oranında sığır serum albümin (Bovine Serum Albumin (BSA), Capricorn, BSA-PF-1U) ilave edilerek hazırlanmış “bloking buffer” kullanıldı.

Aynı zamanda çalışmadaki kan serumlarının analizleri sırasında sulandırılmalarının hazırlaması amacıyla da hazırladığımız bu blocking buffer’dan yararlanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) Hücre Kültürlerinin

Hazırlanması

Araştırmada kullanılacak MDBK hücreleri 75 cm² lik flasklarda %10 FDS, 100 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin eklenmiş DMEM içerisinde 37°C de, %5 CO₂’li inkubatörde monolayer olarak üretildi. Hücreler üreme yüzeyini %85-90 oranında kapladıklarında subkültürü yapıp, 37°C de, %5 CO₂’li inkubatörde inkübasyona bırakıldı.

3.2.2. Virusların Üretilmesi

Bovine Rotavirus’un G6 P(1), G10 P(11) ve G8 P(5) (Grup A) suşları MDBK hücre kültüründe üretildi. Bu amaçla MDBK hücreleri 75 cm² lik doku

kültürü flasklarında %85 oranında ürediklerinde hücre üretme vasatı döküldü. BRV'nin G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşlarından flasklara şişe hacminin %1'i oranında ilave edildi ve 37°C'lik etüvde 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyondan sonra virus üretme vasatı ilave edilerek, 37°C'lik %5 CO₂'li etüve kaldırıldı. Her gün doku kültürü mikroskobu ile kontrol edilen hücre kültürlerinde %90 oranında sitopatik değişiklikler saptanmasını takiben (4-8. günün sonunda) virus inokule edilmiş doku kültürü flasklarına -80°C lik derin dondurucuda dondurma ve 37°C'lik su banyosunda çözündürme işlemi uygulandı. Daha sonra hücre üretme flaskı içindeki materyal santrifüj tüpüne aktararak 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan virus içeren süspansiyonlar alındı ve ihtiyaca göre 1 ml lik hacimlerde stok tüplere paylaştırıldı. Stok virus kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. Virusların Mikrotitrasyon Yöntemi ile Enfeksiyözite Güçlerinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan BRV suşlarının enfeksiyözite güçlerinin belirlenmesi amacıyla Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yöntemden yararlanıldı. Çalışmada kullanılan her bir suş için bu yöntem ayrı ayrı uygulandı.

Test virusları (BRV, Grup A, G6 (P1), G8 (P5) G10 (P11)) DMEM içinde logaritma 10 tabanına göre sulandırıldı. Her sulandırma basamağından mikrotitrasyon tabletinin aynı sırada bulunan dört kuyucuğuna 0,1 ml konuldu. Virus kontrol amacıyla dört kuyucuğa serumsuz DMEM vasatından 0,05 ml ve saf virustan 0,05 ml, hücre kontrol amacıyla ayrılan dört kuyucuğa ise %10 oranında fetal serum içeren DMEM vasatından 0.1 ml konuldu. Daha sonra tüm kuyucuklara 0,05 ml MDBK hücre süspansiyonundan (300.000 hücre/ml) eklendi ve mikrotitrasyon tabletleri 37°C lik, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Tabletler her gün doku kültürü mikroskobunda CPE yönünden incelendi ve süre sonunda virus titreleri Kaerber (1964) tarafından bildirilen yöntemle göre hesaplandı.

3.2.4. PEG-6000 Yöntemi ile Viral Proteinlerin Konsantre Edilmesi ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sisteminin Hazırlanması

Gebe sığırlardan/annelerden alınan kan serumu ve kolostrum/süt örneklerinin yanı sıra yeni doğan buzağılardan alınan kan serumu örneklerinde bovine rotavirusun G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşlarına karşı oluşmuş spesifik nötralizan antikorlar ve maternal olarak aktarılmış spesifik antikorların tespiti amacıyla ELISA yönteminden yararlanıldı.

Çalışmada hücre kültürü flaskaları içerisinde üretilen ve idame vasatı ihtiva eden BRV suşlarına ait süspansiyonların santrifüjleri sonucu elde edilen süpernatantların konsantre edilmesi amacıyla, Kangro ve Mahy (1996) tarafından bildirilen polietilen glikol (Polyethylen glikol (PEG))-6000 çöktürme metodu kullanıldı.

PEG ile viral proteinlerin çökeltilmesi işlemi öncesinde, üç BRV suşuna ait viral süspansiyonlar derin dondurucudan çıkarılarak 3 kez dondurup-çözme işlemi uygulandı ve daha sonra toplam hacimleri 2000 ml olan flask içerigi, 15 ml'lik flakonlara koyularak +4°C de 8000-10000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar bir beher içerisine aktarıldı ve manyetik karıştırıcı düzeneği kurulan bir buz kovası içerisine koyuldu. Bunun üzerine %0,8 olacak şekilde ayarlanan NaCl, beher içerisine azar azar eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde düşük devirde karıştırıldı. Daha sonra bunun üzerine konsantrasyonu %8 olacak şekilde PEG-6000 ilave edildi. Bu amaçla toplam virus süspansiyonunun %8 oranında hesaplanan PEG-6000, bir miktar PBS içerisinde (2000 ml total virus hacmi için; 160 gr PEG: 200 ml PBS) ısıtılarak çözdürüldü yavaşça bu karışıma eklendi. Daha sonra final karışım, PEG'in tam olarak çözülmesi için 1 saat daha karıştırılmaya devam edildi. Süre sonunda karışım +4°C de bir gece dinlendirilmeye bırakıldı. Üç farklı BRV suşu için ayrı ayrı düzenekler kurularak tamamlanan bu işlem sonucunda viral proteinlerin çökeltmesi sağlandı. Viral proteinlerin çökeltilmesi için gerekli olan süre tamamlandıktan sonra, santrifüj tüplerine aktarılan viral süspansiyonlar, 10000

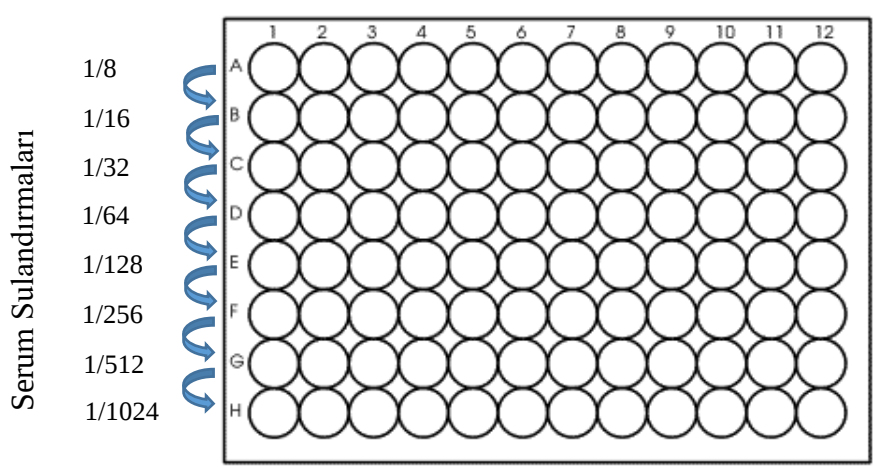
rpm de, +4°C de 30 dk santrifüj edilerek PEG ortamdan uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası süpernatantlar atılarak dipte kalan pelet karbonat-bikarbonat buffer (Carb/Bicarb pH 9,5) ile 1:1000 oranında sulandırıldı ve pipetleme işlemi uygulanarak karışması sağlandı. Daha sonra sulandırılan bu antijenlerden pleytlerin (Nunc-maxisorp, 96 gözlü, düztabanlı ELISA pleyti) tüm gözlerine 100 µl koyularak +4°C'de 1 gece bırakılarak kaplandı. Süre sonunda pleyt gözleri yıkama (washing) solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama sonrası spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için pleytlerin her bir gözüne 150 µl blocking buffer koyulduktan sonra 37°C de 90 dk etüvde bekletildi. Bloklamadan sonra pleyt gözleri 3 kez daha yıkandı ve araştırma örneklerinde antikor taramalarına geçildi.

3.2.5. Hazırlanan ELISA Sistemiyle Çalışma Numunelerde Spesifik Antikor Varlığının Araştırılması

Söz konusu antijenlerle kaplanıp hazırlanan ELISA pleytleri, daha sonra amaca göre, 1/8 oranında DMEM (25 µl serum + 175 µl DMEM) ile sulandırılmış G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) bovine rotavirus suşlarına spesifik antikor varlığı araştırılacak olan kan ve süt/kolostrum serumları ile referans pozitif ve negatif serumlar pleytin ikişer gözüne 100 µl koyuldu ve 37°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde etüvden çıkarılan pleytlerin gözleri yıkama solüsyonu ile yıkandı ve daha önceden 1/10000 oranında hazırlanmış konjugattan 100 µl eklendikten sonra 37°C de 1 saat tekrar inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan pleytlerin gözleri washing solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Pleytler kâğıt havlu üzerine ters çevrilerek 1-2 defa hafifçe vurulmak suretiyle gözlerde kalan yıkama sıvısının uzaklaşması sağlandı. Yıkama sonrasında pleytin her bir gözüne substrattan (TMB solüsyonundan) 100'er µl ilave edilerek 20-30 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. Belirtilen zaman sonrasında pleytin tüm gözlerine 100 µl stop solüsyonu (2 M H₂SO₄) eklenerek reaksiyon durduruldu. Test, ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda filtre absorbansları (optik dansite-OD) ölçülerek değerlendirildi.

3.2.6. Pozitif Kan ve Süt/Kolostrum Serumlarında Antikor Titre Değerinin ELISA Yöntemi ile Saptanması

Pozitif serum örneklerindeki antikor titre değerlerinin belirlenmesi amacıyla, bölüm 3.2.4.'de anlatılan yöntemle göre ELISA pleytlerinin tabanları bovine rotavirusun G6 P(1), G8 P(5) ve G10 P(11) suşları ile kaplandı. Daha sonra Crowther (2009) tarafından raporlanan 'dama tahtası' (checkerboard) titrasyon metodu uygulandı. Boş steril tabletlerde pozitif serumların 1/8'den başlamak üzere $\log_2$ tabanına göre 8 basamak (1/8 -1/1024 arasındaki sulandırma) sulandırmaları hazırlandı ve her bir sulandırmadan antijen kaplı ELISA pleytlerinin 2'şer gözüne 100 μ l aktarıldı ve 37°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde etüvden çıkarılan pleytlerin gözleri yıkama solüsyonu ile yıkandı ve daha önceden 1/10000 oranında hazırlanmış konjugattan 100 μ l eklendikten sonra 37°C de 1 saat tekrar inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan pleytlerin gözleri washing solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Pleytler kâğıt havlu üzerine ters çevrilerek 1-2 defa hafifçe vurulmak suretiyle gözlerde kalan yıkama sıvısının uzaklaşması sağlandı. Yıkama sonrasında pleytin her bir gözüne substrattan (TMB solüsyonundan) 100'er μ l ilave edilerek 20-30 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. Belirtilen zaman sonrasında pleytin tüm gözlerine 100 μ l stop solüsyonu (2 M H_2SO_4) eklenerek reaksiyon durduruldu. Test, ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda filtre absorbansları (OD) ölçülerek değerlendirildi.



Şekil 3.1. Pozitif serumların $\log_2$ tabanına göre sulandırma metodu

3.2.7. ELISA Cut-off Değerinin Tespiti ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Test sonuçlarının değerlendirilmesi, ticari firmanın kullandığı optimizasyon prosedürü takip edildi. Buna göre pleytdeki negatif kontrol optik dansite (OD_{NK}) değerlerinin ortalamasının 2 katı hesaplandı ve çıkan sonuç cut-off değeri olarak kabul edildi. Örnekler/örnek sulandırılmalarına ait OD değerleri ($OD_{\text{örnek}}$) cut-off değerinden büyük veya eşitse pozitif, küçükse negatif olarak değerlendirildi.

$$\text{cut-off} = \frac{(OD_{NK} + OD_{NK})}{2} \times 2$$

$$OD_{\text{örnek}} \geq \text{cut-off} = \text{pozitif}$$

$$OD_{\text{örnek}} < \text{cut-off} = \text{negatif}$$

3.2.8. Sonuçların İstatistik Değerlendirilmesi

Araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 21 paket programı kullanılarak yapıldı (IBM SPSS Software, USA). Deney grubunda (Grup I) bulunan anneler ve yavrularında tespit edilen BRV G6, G8, G10 suşlarının antikor titre oranları arasındaki farklılığın ve suşlara göre seropozitif oranları arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için; benzer şekilde Grup I ve Grup II de yer alan hayvanlarda tespit edilen BRV antikor titre oranları arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için Ki-Kare (chi-square χ^2) testi kullanıldı. Araştırmada $p < 0,05$ değeri elde edilen veriler anlamlı (önemli) olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Virusların Enfeksiyözite Güçleri

Mikrotitrasyon yöntemi ile BRV G6 (P1) suşunun enfeksiyözite gücü (titresi) $DKID_{50} = 10^{-6}/0,1$ ml, BRV G8 (P5) suşunun titresi $DKID_{50} = 10^{-5,5}/0,1$ ml ve G10 (P11) suşunun titresi de $DKID_{50} = 10^{-5,5}/0,1$ ml olarak tespit edildi.

4.2. ELISA Sonuçları

Test sonuçları metot bölümünde belirtildiği gibi hesaplanan cut-off değerine göre değerlendirildi. Bu hesaplama sonucunda testimizin cut-off değeri BRV G6 (P1) için 0.2220 ± 0.0145 ; BRV G8 (P5) için 0.2569 ± 0.0264 ; BRV G10 (P11) için ise 0.2274 ± 0.0187 olarak belirlendi.

Her bir suş için örnekler ayrı ayrı değerlendirildi. Numune / numune sulandırma OD değeri bu değerden büyük veya eşit ise pozitif, küçük ise negatif kabul edildi.

Deney grubunda yer alan sığırlar ve bunlardan doğan buzağılardan alınan örneklerde farklı oranlarda BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşlarına spesifik antikor varlığı tespit edildi. Bu veriler Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3 da gösterildi.

Araştırmada kontrol grubu (Grup II = 10 sığır + 10 buzağı) hayvanlardan ve bunların kolostrum almış buzağılarından çalışma zamanına göre alınan kan ve kolostrum/süt örneklerinin üçünde BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşlarına spesifik antikor varlığı tespit edildi (Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6).

4.3. Pozitif Kan ve Süt Serumların Antikor Titre Sonuçları

ELISA dama tahtası titrasyon metoduna göre optik dansite (OD) değerleri dikkate alınarak cut-off değerine göre, örneklerin en yüksek pozitiflik verdiği sulandırma basamakları antikor titreleri olarak değerlendirildi. Araştırmada

kullanılan BRV suşlarına göre sığır ve buzağılarda bu durum ayrı ayrı değerlendirildi.

Aşı uygulanan sığırlarda (n=10) BRV G6 (P1) suşuna özgü antikor titrelerinin ikinci aşılama sonrası 3.-4. haftada (doğum sırasında) alınan kan serumlarında 8 sığırda $\geq 1/1024$, 2 sığırda ise $1/512$ oranında olduğu tespit edildi. Bu sığırların doğum sonrasında 3.7.14.21. ve 28. günlerde alınan kan serum örneklerinde bu suşa karşı tespit edilen atikör titrelerinin de yüksek seyrettiği hatta bazı hayvanlarda doğum sırasındaki değeri korudukları belirlendi (Tablo 4.1).

BRV G8 (P5) suşuna özgü antikor titrelerinin ikinci aşılama sonrası 3.-4. haftada (doğum sırasında) alınan kan serumlarında 7 sığırda $\geq 1/1024$, 3 sığırda ise $1/512$ oranında olduğu tespit edildi. Bu sığırların doğum sonrasında 3.7.14.21. ve 28. günlerde alınan kan serum örneklerinde G8 (P5) suşuna karşı tespit edilen atikör titrelerinin de yüksek seyrettiği bazı hayvanlarda doğum sırasındaki değeri korudukları bazılarında ise orantılı bir azalış (yarılanma ömrü) gösterdiği belirlendi (Tablo 4.1).

BRV G10 (P11) suşuna özgü antikor titrelerinin ikinci aşılama sonrası 3.-4. haftada (doğum sırasında) alınan kan serumlarında 6 sığırda $\geq 1/1024$, 2 sığırda $1/512$ ve 2 sığırda $1/256$ oranında olduğu tespit edildi. Bu sığırların doğum sonrasında 3.7.14.21. ve 28. günlerde alınan kan serum örneklerinde diğer suşlarda olduğu gibi atikör titrelerinin de yüksek seyrettiği bazı hayvanlarda doğum sırasındaki değeri korudukları bazılarında ise orantılı bir azalış (yarılanma ömrü) gösterdiği belirlendi (Tablo 4.1).

Grup I de yer alan sığır kolostrum/süt serum serumlarında BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşlarına spesifik antikor titreleri incelendiğinde, ilk gün çok yüksek olduğu ($\geq 1/1024$) ilerleyen günlerde (3. 7. 14. 21. 28.) ise titrenin çok hızlı düştüğü ve 14. Günden sonra ise koruyuculuk değeri yok denecek seviyelere geldiği tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Grup I'deki sığırların buzağılarında BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için doğum sırasında seronegatif oldukları ve kolostrum alımı sonrasında antikör titrelerinin yaşamlarının ilk üç gününde çok hızlı arttığı ve koruyucu titrelerle ulaştığı ilerleyen 1.- 3. haftalarda bu titre değerinin korunduğu veya bir yarılanmaya uğradığı tespit edildi. Dört haftalık (28 gün) yaşa ulaşan buzağılarda söz konusu titre değerlerinin önemli ölçüde azalmalarına rağmen halen 1/8 ile 1/256 arasında olduğu görüldü (Tablo 4.3) .

Kontrol grubunda (Grup II) bulunan sığırlardan üçünde çalışma sırasında doğal rotavirus enfeksiyonunun geliştiği ($\geq 1/1024$ – 1/256) ve bunların buzağılarında kolostrum almalarına bağlı olarak pasif bağışıklığın (1/512 – 1/8) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.4., Tablo 4.5., Tablo 4.6.).

Tablo 4.1. Grup I' de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kan serumlarında, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı

	Hayvan No	BRV Suşu	1. Aşı Öncesi (Doğuma ~45 gün varken)	2. Aşı Öncesi (Birinci aşıdan ~21 gün sonra)	1. Gün	3. Gün	7. Gün	Doğum Sonrası 14. Gün	21. Gün	28. Gün
Grup I (Deney Grubu)	1	G-6	-	≥1/1024	1/512	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
		G-8	-	1/512	1/256	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512
		G-10	-	≥1/1024	1/512	≥1/1024	≥1/1024	1/512	1/512	1/256
	2	G-6	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512
		G-10	-	≥1/1024	1/512	1/512	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
	3	G-6	-	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512
		G-10	-	≥1/1024	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/128
	4	G6	-	1/512	≥1/1024	1/512	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
		G8	-	1/256	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
		G10	-	1/512	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
	5	G-6	-	≥1/1024	1/128	1/512	1/512	1/512	1/256	1/256
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/256	1/128	1/256	1/256
		G-10	-	≥1/1024	1/512	1/512	≥1/1024	1/512	1/512	1/512
	6	G-6	-	1/512	1/512	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256
		G-8	-	1/256	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
		G-10	-	1/512	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
	7	G-6	-	≥1/1024	1/512	1/512	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
		G-8	-	1/512	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024
		G-10	-	≥1/1024	1/256	1/512	1/512	1/512	≥1/1024	≥1/1024
	8	G-6	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/512	1/256	1/256	1/256
		G-8	-	1/512	1/256	1/256	1/512	1/256	1/256	1/256
		G-10	-	≥1/1024	1/256	1/256	1/512	1/256	1/256	1/256
	9	G-6	-	≥1/1024	≥1/1024	1/512	1/256	1/512	1/512	1/512
		G-8	-	1/512	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256
		G-10	-	≥1/1024	1/512	1/512	≥1/1024	1/512	1/512	1/512
	10	G-6	-	≥1/1024	1/256	1/256	1/512	≥1/1024	1/512	1/512
		G-8	-	≥1/1024	1/256	1/256	1/256	1/512	1/512	1/512
		G-10	-	≥1/1024	1/256	1/256	1/256	1/512	1/512	1/512

Tablo 4.2. Grup I' de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kolostrum/süt örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı

	Hayvan No	BRV Suşu	Kolostrum	3. Gün Süt	7. Gün Süt	14. Gün Süt	21. Gün Süt	28. Gün Süt
Grup I (Deney Grubu)	1	G-6	≥1/1024	1/128	1/32	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/64	1/32	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
	2	G-6	≥1/1024	1/128	1/8	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
	3	G-6	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/64	1/8	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/64	1/8	-	-	-
	4	G-6	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/64	1/8	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/128	1/8	-	-	-
	5	G-6	≥1/1024	1/256	1/16	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/32	-	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/128	1/8	-	-	-
	6	G-6	≥1/1024	1/64	1/8	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/64	1/8	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/128	1/8	-	-	-
	7	G-6	1/512	1/32	-	-	-	-
		G-8	1/512	1/16	-	-	-	-
		G-10	1/512	1/32	-	-	-	-
	8	G-6	≥1/1024	1/64	1/16	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/64	1/16	-	-	-
	9	G-6	≥1/1024	1/64	1/16	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/32	-	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/64	-	-	-	-
	10	G-6	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/128	1/8	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/128	1/8	-	-	-

Tablo 4.3. Grup I’de yer alan sığırların yeni doğan buzağlarından örnekleme zamanına göre alınan kan örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı

	Buzağı No	BRV Suşu	Kolostrum Öncesi 1. gün	Kolostrum Sonrası				
				3. Gün	7. Gün	14. gün	21. Gün	28. gün
Grup I (Deney Grubu) Sığırların Buzağları	B1	G-6	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/512	1/64
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/512	1/64
		G-10	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/256	1/32
	B2	G-6	-	≥1/1024	1/512	1/256	1/256	1/16
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/256	1/16
		G-10	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/256	1/8
	B3	G-6	-	≥1/1024	1/512	1/256	1/256	1/64
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/256	1/256	1/32
		G-10	-	1/512	1/256	1/256	1/256	1/32
	B4	G-6	-	1/512	1/256	1/256	1/256	1/32
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/256	1/256	1/64
		G-10	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/512	1/128
	B5	G-6	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/256
		G-8	-	1/512	1/512	1/256	1/128	1/8
		G-10	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/128
	B6	G-6	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/256
		G-8	-	1/512	1/512	1/256	1/256	1/64
		G-10	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/256
	B7	G-6	-	1/512	1/256	1/256	1/256	1/128
		G-8	-	1/512	1/256	1/128	1/128	1/64
		G-10	-	1/512	1/512	1/256	1/256	1/64
	B8	G-6	-	≥1/1024	1/512	≥1/1024	1/512	1/64
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/512	1/256	1/8
		G-10	-	≥1/1024	1/512	1/256	1/128	1/8
	B9	G-6	-	≥1/1024	≥1/1024	1/512	1/256	1/16
		G-8	-	1/512	1/512	1/256	1/128	1/8
		G-10	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/256	1/32
	B10	G-6	-	≥1/1024	≥1/1024	1/512	1/256	1/16
		G-8	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/256
		G-10	-	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	≥1/1024	1/256

Tablo 4.4. Grup II' de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kan serumlarında, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı

	Hayvan No	BRV Suşu	(Doğuma ~45 gün varken)	(Doğuma ~24 gün varken)	1. Gün	3. Gün	7. Gün	Doğum Sonrası 14. Gün	21. Gün	28. Gün
Grup I (Deney Grubu)	1	G-6	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	G-6	-	1/512	1/512	1/512	1/512	1/256	1/512	1/512
		G-8	-	1/256	1/256	1/128	1/128	1/256	1/256	1/64
		G-10	-	1/512	1/256	1/128	1/256	1/256	1/512	1/256
	3	G-6	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	G6	-	-	-	-	-	-	-	-
		G8	-	-	-	-	-	-	-	-
		G10	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	G-6	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	G-6	-	1/256	1/256	1/256	1/512	1/512	1/512	1/512
		G-8	-	1/256	1/128	1/128	1/256	1/256	1/128	1/128
		G-10	-	1/256	1/128	1/128	1/256	1/256	1/128	1/32
	7	G-6	-	≥1/1024	≥1/1024	1/512	1/512	1/512	≥1/1024	≥1/1024
		G-8	-	≥1/1024	1/512	1/256	1/256	1/256	1/512	1/512
		G-10	-	≥1/1024	1/512	1/256	1/256	1/256	1/128	1/128
	8	G-6	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	G-6	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	G-6	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.5. Grup II' de yer alan sığırların örnekleme zamanına göre alınan kolostrum/süt örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı

	Hayvan No	BRV Suşu	Kolostrum	3. Gün Süt	7. Gün Süt	14. Gün Süt	21. Gün Süt	28. Gün Süt
Grup I (Deney Grubu)	1	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	2	G-6	1/512	1/128	1/8	-	-	-
		G-8	1/256	1/16	-	-	-	-
		G-10	1/512	1/64	1/8	-	-	-
	3	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	4	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	5	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	6	G-6	1/256	1/64	1/8	-	-	-
		G-8	1/256	1/32	1/8	-	-	-
		G-10	1/256	1/8	-	-	-	-
	7	G-6	≥1/1024	1/128	1/16	-	-	-
		G-8	≥1/1024	1/128	1/8	-	-	-
		G-10	≥1/1024	1/64	1/8	-	-	-
	8	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	9	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	10	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.6. Grup II’de yer alan sığırların yeni doğan buzağılarından örnekleme zamanına göre alınan kan örneklerinde, BRV G6 (P1), G8 (P5) ve G10 (P11) suşları için seropozitiflik durumları ve antikor pozitiflik tespit edilen en son serum sulandırma basamağı

	Buzağı No	BRV Suşu	Kolostrum Öncesi	Kolostrum Sonrası				
			1. gün	3. Gün	7. Gün	14. gün	21. Gün	28. gün
Grup I (Deney Grubu) Sığırların Buzağıları	B1	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	B2	G-6	-	1/256	1/64	1/64	1/32	1/32
		G-8	-	1/128	1/64	1/64	1/32	1/32
		G-10	-	1/256	1/128	1/128	1/64	1/64
	B3	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	B4	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	B5	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	B6	G-6	-	1/128	1/64	1/64	1/32	1/32
		G-8	-	1/128	1/64	1/64	1/32	1/32
		G-10	-	1/128	1/64	1/32	1/16	1/8
	B7	G-6	-	1/512	1/256	1/256	1/128	1/64
		G-8	-	1/512	1/128	1/128	1/64	1/64
		G-10	-	1/512	1/256	1/256	1/256	1/128
	B8	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	B9	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-
	B10	G-6	-	-	-	-	-	-
		G-8	-	-	-	-	-	-
		G-10	-	-	-	-	-	-

4.4. İstatistik Değerlendirme Sonuçları

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, örneklemelerin yapıldığı deney grubunda (Grup I) bulunan anneler ve yavrularında tespit edilen BRV G6, G8, G10 suşlarının antikor titre oranları arasındaki farklılığın ve suşlara göre seropozitif oranları arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemsiz ($p>0,05$) olduğu tespit edildi. Grup I ve Grup II de yer alan hayvanlarda tespit edilen antikor titre oranlarındaki farklılığın anlamlı ($p<0,05$) olduğu belirlendi.



5. TARTIŞMA

Dünyada sığır yetiştiriciliğinde yenidoğan buzağı ishalleri önemli ekonomik kayıplar oluşturması nedeni ile büyük önem taşır. Yenidoğan buzağı ishallerinin etiyolojisinde kolostrum almama, besleme bozuklukları, çevre ısısı, yetiştirme şartlarının elverişsiz olması, enfeksiyöz etkenler, stres gibi faktörler yer almaktadır. Koruyucu sağlık tedbirlerinin uygulandığı modern işletmelerde bile bu faktörlerin birinin ya da birkaçının aynı anda etkili olmasından kaynaklanan ishal olayları ile karşılaşılabilir (De La Fuente ve ark., 1998; Kahrs, 2001).

Aile işletmelerinde ve modern işletmelerde neonatal buzağı ishalleri direkt olarak meydana getirdiği mortalite ve indirekt olarak da klinik hastalık tablosuna istinaden tedavi giderleri ve büyümenin yavaşlamasına bağlı olarak iktisadi zararlar oluştururlar (De La Fuente ve ark., 1998). Üç haftalıktan küçük süt emen buzağılarda neonatal ishallerden kaynaklanan ölüm oranları işletmelerde %75'lere kadar varabilmektedir (Radostits ve ark., 1994). Özellikle neonatal ishallerinin bu derece mortal seyretmesinde virus, bakteri ve protozoonların miks enfeksiyonlar oluşturması başlıca rol oynar. Her bir patojen ajanın sebep olduğu hastalığın insidensi ve enfeksiyonun prevalansı sürü büyüklüğüne, çiftliklerin yönetim sistemine, stres faktörlerinin durumuna ve ülkede/bölgede uygulanan koruyucu aşı politikasına göre farklılıklar göstermektedir (Kohara ve Tsunemitsu, 2000; Cho ve Yoon, 2014).

Bu kapsamda bovine rotavirus (BRV), yenidoğanlarda yaşamın ilk birkaç haftasında aktif bağışıklık gelişmeden önce görülen ishalin etiyolojisinde önemli bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. BRV'lar özellikle 1-10 günlük buzağılarda ince barsak mukozasında enterosit kaybı ve villus atrofilerine neden olarak sıvı elektrolit dengesinin bozulması ve sekonder enfeksiyonların da etkisi ile yüksek mortaliteye neden olurlar (Torres Medina ve ark., 1985). Bu nedenle, kolostrum yoluyla yeni doğan buzağılara aktarılan pasif maternal antikorların hastalığın önlenmesinde oldukça büyük rolü bulunmaktadır.

Enfekte erişkin sığırların gebeliğin geç dönemleri ve özellikle doğum yaptıkları gün BRV saçtıkları, bu sığırlardan doğan buzağların muhtemelen annelerinden saçılan bu viruslar ile enfekte oldukları ve bu hayvanlarla birlikte barındırılan diğer yenidoğan buzağlar için de enfeksiyon kaynağı olabilecekleri ortaya koyulmuştur. Özellikle subklinik enfekte sığırlar uzun süre virusu saçarak sürüde virusun varlığının devamlılığında önemli rol oynarlar. Bundan dolayı erişkin sığırlarda bu enfeksiyonların epidemiyolojilerinin incelenmesi ve bunlara dönük koruyucu tedbirlerin alınması BRV ile mücadelede önemlidir (Crouch ve Acres, 1984; Goto ve ark., 1986; Collins ve ark., 1987; Can Şahna ve Alkan, 2003; Geletu ve ark., 2021).

BRV'nin dünyada ve Türkiye'deki durumunu ortaya koymak için çok sayıda serolojik araştırma yapılmıştır. (Crouch ve Acres, 1984; Alkan ve ark., 1999; Brandao ve ark., 2002; Alkan ve ark., 2004; Çabalar, 2004; Yıldırım ve ark., 2008). Crouch ve Acres (1984) 121 adet erişkin sığırlarda BRV seroprevalansını %44 oranında tespit etmişlerdir. Alonso ve ark. ise 1984 yılında yaptıkları çalışmada 16 farklı çiftlikten topladıkları sığır kan serum örneklerinde BRV ve bovine coronavirus (BCV) seroprevalansını sırası ile %94 ve %96 oranlarında olduğunu bildirmişlerdir. Yine benzer şekilde farklı araştırmacılar tarafından farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda (Schlafer ve Scott, 1979; Schwerts 1984; Brandao ve ark., 2002) BRV enfeksiyonunun seroprevalansı %65.9-98.1 oranları arasında olduğu, bu seropozitiflik cinsiyet ile ilişkilendirildiğinde (Brandao ve ark., 2002) ise 1 yaşından büyük erkeklerde %85.4, dişilerde %69.9 oranlarında olduğu ortaya koyulmuştur. Türkiye'de yapılan çalışmalarda (Burgu ve Akça, 1983; Alkan ve ark., 1999; Can-Sahna ve Alkan, 2003; Çabalar 2004; Tan ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2008) ise BRV enfeksiyonunun seroprevalansı %31-54.1 oranları arasında bildirilmiştir. Bu sonuçlar buzağı sağlığını ciddi derecede etkileyen BRV'nin yaygın olarak görüldüğünü ortaya koymaktadır.

Erişkin sığırlarda oldukça yaygın olarak rotavirus antikoru belirlenmesine rağmen bunun kolostrum yolu ile yenidoğan buzağlara koruyucu yüksek titrede aktarılması oldukça önemlidir. Yenidoğan buzağı doğumu takiben ilk altı saat

içerisinde birinci öğünde buzağı vücut ağırlığının takriben %5'i kadar ve birinci gün ise üç dört öğünde buzağının vücut ağırlığının yaklaşık %10'u civarında kolostrum alması sağlanmalıdır. Aynı zamanda birkaç gün içinde kolostrum/süt içindeki antikor miktarı da hızlı bir şekilde azalır. Belirtilen miktar ve süreçte buzağı kâfi miktarda kolostrum alamaması durumunda antikor alım miktarındaki düşüşe bağlı olarak pasif transfer yetmezliği oluşur. Bu durum buzağı refahı, verimliliği ve sağlığı ile ilgili problemlerin yaşanmasına sebep olur. Bu nedenle neonatal dönemde uygun bakım besleme, hijyen tedbirlerinin alınmasının yanı sıra doğru zamanda ve yeteri miktarda kolostrum yoluyla antikor aktarımı da hayati önem taşımaktadır (Kapikian ve Chanock 1990; Kozat 2019). Bunun yanı sıra buzağının aktif immunizasyonu da alternatif bir yol gibi değerlendirilse de bu durumun pratikte sonuçları istendiği gibi olmamış ve korumada daha düşük oranda başarı sağlanmıştır. Bu nedenle doğuma 6 hafta kala rapelli aşı uygulaması ile annelerin aşılansak yüksek titrede antikor oluşumunun sağlanması ve kolostrum yoluyla yenidoğan buzağılara bu antikorların aktarılması ile buzağının rotavirus enfeksiyonlarından korunması daha olası bir seçenek olarak değerlendirilmektedir. Bu sayede BRV'ye karşı aşılama ile elde edilen koruyuculuk, hem sürüde meydana gelebilecek subklinik enfeksiyonların önlenmesine hem de yenidoğanlarda maternal antikor ile sağlanan koruma süresinin uzamasına katkı sağlayacaktır. Bu aşamada kullanılacak aşılarsın etkinliği ve saha suşları ile ticari aşı suşlarının antijenik yakınlığı önemli bir husus olarak karşımıza çıkmaktadır (Le Rousic ve ark., 2000; Kim ve ark., 2002; Alkan ve ark., 2004; Tan ve ark., 2007; Şahal ve ark., 2018).

Günümüzde sığırlarda yaygın olarak rotavirus, coronavirus ve Escherichia coli etkenlerinin farklı antijenik suşlarından oluşan ticari kombine aşılar, sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerde koruma ve mücadele programlarında kullanılmaktadırlar. Bu aşılar da BRV'nin Grup A içerisinde yer alan P1, P5, P11, G6, G8 ve G10 genotiplerinden birisi veya birkaçı bulunmaktadır.

Ticari aşı preparatlarının etkinliklerinin belirlenmesi adına birçok araştırma yapılmıştır. Çalışmaların bazılarında başarılı sonuçlar elde edilmişken bazı araştırmalarda antikor titresinde artış sağlanmasına rağmen yenidoğan

ishallerinin önlenmesinde istenen seviyede koruyuculuk maalesef tespit edilememiştir. Bunun yanı sıra tek doz aşı uygulaması sonrasında yeteri miktarda antikor titre artışı sağlanamadığı, gebeliğin son dönemlerinde (doğuma 45 gün varken birinci doz ve bundan 21 gün sonra ikinci doz) üç hafta ara ile tekrarlanan aşılamalarda kan serumunda ve doğumu takiben kolostrumda yüksek titrede antikor bulunduğu belirlenmiştir (Kim ve ark., 2002; Alkan ve ark., 2004).

Gebe sığırlara BRV aşısı uygulanması ile ilgili yapılan birçok araştırmada (Thurber ve ark., 1977; Saif ve ark., 1984; Castrucci ve ark., 1993; Cornaglia ve ark., 1992; Kohara ve ark., 1997) hem anneyi hem de yavruyu söz konusu enfeksiyondan korumada yararlı sonuçlar sağladığı belirlenmiştir. Bu amaçla yaygın olarak aktif ve inaktif hazırlanmış aşılar kullanılmaktadır. Saif ve ark., (1984)'nın aktif rotavirus aşısını uyguladıkları gebe sığırların kan serumu, kolostrum ve süt serumlarında yüksek seviyede antikor titresi tespit etmişlerdir. Bu aşı uygulamasının da buzağuları rotavirusa bağlı neonatal ishallere korumada önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada Kohara ve ark. (1997) bovine rotavirus'ta içeren ticari polivalan bir inaktif aşığı uyguladıkları gebe sığırların, doğum sonrasında kan ve kolostrum serumlarında yüksek titrede BRV antikorları saptamışlardır. Yine bu hayvanların kolostrum alan buzağılarında 28 günlük yaşlarında da kan serumlarında yüksek titrede BRV antikorları bulunduğu raporlanmıştır. Ülkemizde Alkan ve ark. (2004)'nın ticari aşı ile aşılanan sığırlardan doğan yavrularında yaptıkları çalışmada ise aşı uygulanan ve aşı uygulanmayan annelerden doğan buzağuların enfeksiyona maruz kalma oranlarını sırasıyla %30 ve %54.5 olarak ortaya koymuşlar fakat aşı uygulanan annelerde belirgin bir antikor yanıtı belirleyememişlerdir. Aynı çalışmada aşı uygulanmayan sığırlardan doğum öncesi ve doğum sonrasında çeşitli dönemlerde aldıkları serum örneklerinde BRV seroprevalansını %72.7-90.9 oranları arasında tespit etmişlerdir. BRV, BCoV ve E.coli etkenlerine karşı hazırlanmış kombine inaktif aşının kullanıldığı başka bir araştırmada ise kolostral immünoglobülin konsantrasyonlarının takibi yapılmış ve önemli derecede antikor artışı belirlenmiştir. Bununla söz konusu enfeksiyonlardan buzağuların korunmasında önemli olduğunu bildirmişlerdir (Chambers ve ark., 2022).

Klasik aşılar dışında Gonzalez ve ark., (2010)'nın BRV C-486 suşunun (G6 (P1)) VP6 proteininden hazırlanan rekombinant aşı kullanarak yaptıkları çalışmada, gebeliğin son üçte birlik bölümünde aşılanan annelerin kolostrum alan buzağılarında rotavirüsden korunma oranını kayda değer seviyede yüksek bulmuşlardır. Bu buzağılarda virüs saçma oranını da buna paralel olarak düşük bulmuşlardır.

Bizim araştırmamızda Grup I deki sığırlardan I. II. aşılama sonrasında ve doğum sonrasında (1. 3. 7. 14. 21. 28. gün) alınan kan örneklerinin tamamında BRV (G6 (P1), G8 (P5) G10 (P11)) seropozitiflik belirlendi. Deney grubundaki sığırların kan serum örneklerinde ikinci aşılama takiben önemli ölçüde antikor artışı şekillendiği ve doğum sonrası bu antikorların 28. güne kadar antikor seviyesini korudukları tespit edildi. Bu sığırların doğum sonrasında kolostrum ve süt örneklerinde de kan serum örneklerine paralel olarak yüksek antikor titreleri saptandı. Özellikle deney grubundaki bir hayvanın kolostrum numunesi hariç diğer annelerin örneklerinde yüksek titrede BRV antikorları belirlendi ve takip eden günlerde (3. 7. 14. 21. 28. gün) süt serumlarında hızlı bir antikor titresinde düşme gerçekleştiği tespit edildi. Deney grubundaki sığırların kolostrum almış buzağılarının kan serumlarında da annelerinkine benzer olarak BRV antikor titreleri yüksek bulundu. Bu sonuçlar aşılanan sığırlarda BRV ye karşı etkin antikor cevabın (IgG) oluştuğu ve kolostrum yolu ile bunu buzağılara aktararak onların söz konusu enfeksiyondan korunmasında çok önemli olduğunu göstermiştir. Kontrol grubunda (Grup II) yer alan üç sığırın kan ve kolostrum/süt örneğinde BRV (G6 (P1), G8 (P5) G10 (P11)) antikor varlığı belirlenmiştir. Bu üç sığırın kolostrum alan buzağılarının kan örneklerinde de annelerinkine benzer şekilde BRV antikor titresini belirlenmiştir. Bu durum annelerin subklinik enfekte olduklarını ve sürü içerisinde mevcut bir bovine rotavirüs enfeksiyonunun varlığını göstermektedir. Çalışmamızın amaçları arasında yer almadığı için, Rocodoll aşı etkenleri içerisinde bulunan BCV ve *E. coli* ye karşı oluşmuş spesifik antikorlarının durumu değerlendirilmemiştir.

Neonatal buzağı ishallerinden korunmada pasif bağışıklığın önemini araştırılmasında klinik enfeksiyon oranlarının karşılaştırmalı tespiti ve buzağılarının

doğum sonrası etkene maruz kalma oranlarının da değerlendirilmesi önemli bir husustur. Aşılı annelerin aşısızlara göre düşük oranda BRV saçması, sürü içerisinde enfeksiyonun kontrol altına alınmasında dikkat edilmesi gereken diğer önemli bir durumdur.

Diğer taraftan dünyada yaygın olan rotavirusların geniş bir konakçı yelpazesi bulunmaktadır. Birçok hayvan türünün yanında insanlarda da hastalık tablosuna neden olurlar. A ve C grubunda yer alan rotavirusların hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. Son yapılan çalışmalarda, bazı hayvan ve insan rotavirus suşlarının antijenik benzerlikler taşıdığı tespit edilmiştir. Bu durum, hayvanların insanlarda rotavirus enfeksiyonu kaynağı olarak rol oynadığının bir göstergesi olabileceği şüphesi uyandırmıştır (Geletu ve ark., 2021). Bu nedenle bundan sonra yapılacak çalışmaların bovine rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisine yoğunlaşması ve zoonotik durumunun tam olarak açıklanmasının ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada ticari bir polivalan inaktif (Rocodoll, Dollvet, Türkiye) aşısı ile gebeliğin son ~45 ve ~24. gününde iki doz olarak aşılanan gebe sığırlarda, BRV G6 (P1), G8 (P5), G10 (P11) suşlarına karşı yüksek titrede spesifik antikor oluştuğu, bu antikorların yüksek titrede kolostruma geçtiği tespit edildi. Neonatal buzağların BRV'ye bağlı ishalinin önlenmesi ve kontrol altına alınmasında pasif bağışıklığın çok önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aşılanan hayvanlarda aşılama sonrası herhangi bir yan etki görülmedi.

Çalışmamızda aşı uygulanmamış kontrol grubunda (Grup II) bulunan üç sığırdan ve bunların kolostrum almış buzağlarında BRV antikor varlığı tespit edildi. Bu durum sürü içerisinde devam eden bir subklinik BRV enfeksiyon varlığının kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

Sığırlarda BRV'ye karşı koruyucu aşı uygulamaları, hem sürü içerisindeki subklinik enfeksiyonların önüne geçerek subklinik enfekte hayvanlardan klinik enfeksiyona duyarlı hayvanlara bulaşmayı önleyebilmesi, hem de sütteki antikor sekresyonunun miktar ve süresini uzatabilmesi nedeniyle önemli bulunmuştur.

Özellikle enfeksiyona açık seronegatif hayvanlar ile BRV'ye daha duyarlı olan birkaç günlük buzağların BRV enfeksiyonuna karşı hijyen ve aşılama gibi koruma/kontrol önlemlerinin uygulanması, işletmelerde hastalığa bağlı ekonomik kayıpların önüne geçilebilmesi açısından önemlidir.

Araştırmamız sınırlı sayıda gebe sığırlar üzerinde gerçekleştirildiği için, BRV kaynaklı neonatal buzağı ishallerinin önlenmesine yönelik, aşı uygulamaları sonrasında pasif bağışıklığın etkinliğini ortaya koymak adına daha fazla sayıda hayvanlarda gerçekleştirilecek ileriki zamanlarda yapılacak kapsamlı çalışmalar yarar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Albert MJ, Unicom LE, Barnes GL, Bishop RF (1987). Cultivation and characterization of rotavirus strains infecting newborn babies in Melbourne, Australia, from 1975 to 1979. *Journal of clinical microbiology*, **25(9)**, 1635-1640.

Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF (2006). Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Tropical Animal Health and Production*, **38**, 521-526.

Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MAB, Leite JPG, Richtzenhain LJ (2004). G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. *Veterinary microbiology*, **99(3-4)**, 167-173.

Alkan F (1992). Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon (rpha) testi ile ishali buzağların gaitalarında rotavirüslerin tespiti. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **39**, 238-246.

Alkan F (1999). Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde erişkin sığırların rolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **46(01)**, 85-92.

Alkan F, Bilge-Dağalp S, Oguzoğlu Ç, Yeşilbağ K (1999). Rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde erişkin sığırların rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **46**, 85-92.

Alkan F, Burgu İ, Can Şahna K, Çokçalışkan C (2004). Yeni doğan buzağı ishallerine karşı ticari aşı ile aşılanan sığırlardan doğan yavrualarda pasif bağışıklık düzeyi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **51**, 47-53

Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, French N (2015). Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. *New Zealand Veterinary Journal*, **63(3)**, 147-152.

Almeida JD, Hall T, Banatvala JE, Totterdell BM, Chrystie IL (1978). The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *Journal of General Virology*, **40(1)**, 213-218.

Alonso JL, Muzquiz JL, Valencia S, Gelabert JL, Negro P (1984). [Serologic survey on BVD virus (bovine viral diarrhea), bovine rotavirus and coronavirus in the Ebro valley [Spain]].[Spanish]. *Medicina Veterinaria*.

Anderson EJ, Weber SG (2004). Rotavirus infection in adults. *The Lancet infectious diseases*, **4(2)**, 91-99.

Anonim (2023). Erişim Adresi:

https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy_07_dr_PartII_rev_1.pdf Erişim tarihi: 13.01.2023

Anthony ID, Bullivant S, Dayal S, Bellamy AR, Berriman JA (1991). Rotavirus spike structure and polypeptide composition. *Journal of virology*, **65(8)**, 4334-4340.

Asadi AH, Baghinezhad M, Asadi H (2015). "Neonatal calf diarrhea induced by rotavirus and coronavirus." *International Journal of Biosciences*, **6.2**, 230-236.

Atlı K, Yıldırım Y, Hasircioğlu S, Bulut O, Avcı O (2018). Buzağılarda ishale neden olan başlıca viral etkenler. *Ayrıntı Dergisi*, **6(61)**, 70-74.

Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R (1977). Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *Journal of Clinical Microbiology*, **6(6)**, 610-617.

Bachmann PA, Hess RG (1983). Local immunity in rotaviral infections. *In Annales de Recherches Veterinaires*, **14 (4)**, 502-506.

Ball JM, Tian P, Zeng CQY, Morris AP, Estes MK (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, **272(5258)**, 101-104.

Bartels CJ, Holzhauer M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive veterinary medicine*, **93(2-3)**, 162-169.

Bernstein DI (2009). Rotavirus overview. *The Pediatric infectious disease journal*, **28(3)**, S50-S53.

Brandao PE, Cortez A, Ferreira F, Ferreira Neto JS, Gregori F, Heinemann MB, Homem VSF, Rodriguez CAR, Jarez JA (2002). Seroprevalence of antibodies against group A rotavirus in cattle from a pioneer frontier in Brazilian amazon. *Braz J Vet Res Anim Sci, Sao Paulo*, **39(1)**, 18-20.

Brüssow H, Bruttin A, Marc-Martin S (1990). Polypeptide composition of rotavirus empty capsids and their possible use as a subunit vaccine. *Journal of virology*, **64(8)**, 3635-3642.

Burgu İ (1995). Yenidoğan ishalleri buzağılarda rota virusların elektron mikroskopi (em), enzyme linked immunosorbent assay (elisa) ve polyacrylamide gel electrophoresis (page) teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **42(04)**, 491-498.

Burgu İ, Akça Y (1983). Sığırlarda rotavirus antikorlarının dağılımı üzerinde serolojik araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **30**, 35-44.

Castrucci, G., Ferrari, M., Angelillo, V., Rigonat, F., Capodicasa, L. (1993). Field evaluation of the efficacy of Romovac 50, a new inactivated, adjuvanted

bovine rotavirus vaccine. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **16**(3), 235–239.

Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, F., Traldi, V., & Angelillo, V. (1994). A study on neonatal calf diarrhea induced by rotavirus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **17**(3-4), 321-331.

Chambers GP, Kelton W, Smolenski G, Cuttance E. (2022). Impact of prepartum administration of a vaccine against infectious calf diarrhea on nonspecific colostral immunoglobulin concentrations of dairy cows. *Journal of animal science*, **100**(8): skac212.

Chan J, Nirwati H, Triasih R, Bogdanovic-Sakran N, Soenarto Y, Hakimi M, Danchin MD (2011). Maternal antibodies to rotavirus: could they interfere with live rotavirus vaccines in developing countries?. *Vaccine*, **29**(6), 1242-1247.

Cho YI, Han JI, Wang C, Cooper V, Schwartz K, Engelken T, Yoon KJ (2013). Case control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary microbiology*, **166**(3-4), 375-385.

Cho YI, Yoon KJ (2014). An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of veterinary science*, **15**, 1-17.

Choudhary P, Minakshi P, Ranjan K, Basanti B (2017). Zoonanthroponotic transmission of rotavirus in Haryana State of Northern India. *Acta Virol*, **61**(1), 77-85.

Collins JK, Riegel CA, Olson JD, Fountain A (1987). Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. *Am J Vet Res*, **48**(3), 361-365.

Cornaglia, E. M., Fernández, F. M., Gottschalk, M., Barrandeguy, M. E., Luchelli, A., Pasini, M. I., Saif, L. J., Parraud, J. R., Romat, A., Schudel, A. A. (1992). Reduction in morbidity due to diarrhea in nursing beef calves by use of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus-Escherichia coli vaccine in the dam. *Veterinary microbiology*, **30**(2-3), 191–202.

Coura FM, Freitas MD, Ribeiro J, de Leme RA, de Souza C, Alfieri AA, et al. (2015). Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic Escherichia coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Tropical animal health and production*, **47**, 3-11.

Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, Estes MK (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, **3**(1), 1-16.

Crouch CF, Acres SD (1984). Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. *Can J Comp Med*, **48**, 340-342.

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

Çabalar M (2004). Van yöresindeki bazı süt sığırcılığı işletmelerinde Rotavirus enfeksiyonunun serolojik araştırılması. *YYÜ Vet Fak Derg*, **15(1-2)**, 33-35.

Davidson GP, Barnes GL (1979). Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. *Acta Paediatrica*, **68(3)**, 181-186.

De La Fuente R, Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Luzon M, Cid D, Garcia S, Orden JA, Gomez-Bautista M (1998). Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Vet Med*, **36**, 145-152.

Dennehy PH (2000). Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *The Pediatric infectious disease journal*, **19(10)**, S103-S105.

Desselberger U, Huppertz HI (2011). Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *Journal of Infectious Diseases*, **203(2)**, 188-195.

Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik S (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Veterinary research communications*, **33**, 1-23.

Estes MK, Cohen J (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological reviews*, **53(4)**, 410-449.

Estes MK, Graham DY, Smith EM, Gerba CP (1979). Rotavirus stability and inactivation. *Journal of General Virology*, **43(2)**, 403-409.

Fernandez FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, Saif LJ (1998). Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine*, **16(5)**, 507-516.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Everiss KD, Kung HJ (1996). *Fundamental virology* Philadelphia ePA PA: Lippincott-Raven, s: 401-402.

Geletu US, Usmael MA, Bari FD (2021). Rotavirus in calves and its zoonotic importance. *Veterinary Medicine International.*, 6639701.

Gonzalez DD, Mozgovej MV, Bellido D, Rodriguez DV, Fernandez FM, Wigdorovitz A, Parreño VG, Dus Santos MJ (2010). Evaluation of a bovine rotavirus VP6 vaccine efficacy in the calf model of infection and disease. *Veterinary immunology and immunopathology*, **137(1-2)**, 155–160.

Goto Y, Kurogi HL, Inaba Y, Matsuno M (1986). Sequential isolation of rotavirus from individual calves. *Vet. Microbiol.*, **11**, 177-184.

Hagbom M (2015). Rotavirus disease mechanisms diarrhea, vomiting and inflammation: how and why (Doctoral dissertation, Linköping University Electronic Press).

Holland RE (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical microbiology reviews*, **3(4)**, 345-375.

Hur TY, Jung YH, Choe CY, Cho YI, Kang SJ, Lee HJ, Ki KS, Baek KS, Suh GH (2013). The dairy calf mortality: the causes of calf death during ten years at a large dairy farm in Korea. *Korean J Vet Res*, **53**, 103-108.

Iturriza Gómara M, Desselberger U, Gray J (2003). II, 12. Molecular epidemiology of rotaviruses: Genetic mechanisms associated with diversity. *Perspectives in Medical Virology*, **9**, 317-344.

Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunn AA, House JK (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Australian veterinary journal*, **89(5)**, 167-173.

Jayaram H, Estes MK, Prasad BV (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus research*, **101(1)**, 67-81.

Kaerber G (1964). Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease. *Public Health Association*, **3**, 48-50.

Kahrs RF (2001). *Varial diseases of cattle*, 2nd ed. Iowa State University Press/Ames.

Kalica AR, Flores J, Greenberg HB (1983). Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology*, **125(1)**, 194-205.

Kalica AR, Wyatt RG, Kapikian AZ (1978). Detection of differences among human and animal rotaviruses, using analysis of viral RNA. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **173(5 Pt 2)**, 531-537.

Kangro HO, Mahy BW (Eds.) (1996). Virology methods manual. Elsevier.

Kapikian ZA, Chanock MR (1990). *Rotaviruses*,. In Fields, NB, Knipe MD. Virology, Second Edition, Raven Press, New York, ABD, s: 1353-1404.

Kaplon J, Fremy C, Bernard S, Rehby L, Aho S, Pothier P, Ambert-Balay K (2013). Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine*, **31(20)**, 2433-2440.

Kim A, Nielsen PR, Hodgins D, Chang KO, Saif LJ (2002). Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. *Vaccine*, **15**, 20(7-8),1248-1258.

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

Kohara J, Tsunemitsu H (2000). Correlation between maternal serum antibodies and protection against bovine rotavirus diarrhea in calves. *J Vet Med Sci*, **62** (2), 219-221.

Kozat S (2019): Yenidoğan Buzağılarda Kolostrum Yönetiminin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, **14**(3), 343-353, 2019.

Kurtz JB, Lee TW, Parsons AJ (1980). The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *Journal of Hospital Infection*, **1**(4), 321-325.

Langoni H, Linhares AC, Avila FAD, Da Silva AV, Elias AO (2004). Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **41**, 313-319.

Le Rousic S, Klein N, Houghton S, Charleston B (2000). Use of colostrum from rotavirus-immunised cows as a single feed to prevent rotavirus-induced diarrhoea in calves. *The Veterinary Record*, **147**(6), 160-161.

Lundgren O, Svensson L (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and infection*, **3**(13), 1145-1156.

Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary microbiology*, **140**(3-4), 246-255.

Matsuno S, Inouye S, Kono R (1977). Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *Journal of Clinical Microbiology*, **5**(1), 1-4.

Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*, **157**, 1177-1182.

McNulty MS (1983). The Etiology, Pathology And Epidemiology Of Viral Gastroenteritis Rotavirus Infections In Calves. *Ann Rech. Vet.*, **14**(4), 427-432.

McNulty MS, Allan GM, McFerran JB (1977). Cell culture studies with a cytopathic bovine rotavirus. *Archives of virology*, **54**(3), 201-209.

Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ (1969). Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak.

Mebus CA, White RG, Bass EP, Twiehaus MJ (1973). Immunity to neonatal calf diarrhea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.

Mickelsen WD, Evermann JF (1994). In utero infections responsible for abortion, stillbirth, and birth of weak calves in beef cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **10(1)**, 1-14.

Morris AP, Scott JK, Ball JM, Zeng CQY, O'Neal WK, Estes MK (1999). NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca²⁺ mediated I⁻ influx into intestinal crypts of CF mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **277(2)**, G431-G444.

Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC (1999). Student MJ Veterinary Virology. A Division of Harcourt Brace Company.

Nakagomi T, Nakagomi O (2005). Rotavirus antigenemia in children with encephalopathy accompanied by rotavirus gastroenteritis. *Archives of virology*, **150**, 1927-1931.

Østerås O, Gjestvang MS, Vatn S, Sølvørød L (2007). Perinatal death in production animals in the Nordic countries - incidence and costs. *Acta Vet Scand*, **49 (1)**, S14.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th Edition, Elsevier Saunders, London, s: 966-994.

Radostits OM, Leslie KE, Fetrow J (1994). *Health management of dairy calves*. Herd Health Food Animal Production Medicine. 2ed edn. Saunders, Philadelphia, s: 184-213.

Ramig RF (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of virology*, **78(19)**, 10213-10220.

Rocha TG, Silva FDF, Gregori F, Alfieri AA, da Glória Buzinaro M, Fagliari JJ (2017). Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. *Tropical animal health and production*, **49(4)**, 783-790.

Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH (1982). Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *Journal of Clinical Microbiology*, **16(4)**, 724-726.

Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA (1980). Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *Journal of clinical microbiology*, **12(1)**, 105-111.

Saif LJ, Smith KL, Landmeier BJ, Bohl EH, Theil KW, Todhunter DA. (1984). Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. *American journal of veterinary research*, **45(1)**, 49-58.

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

Schwiers A, Mahin L, Pastoret PP, Dewulf M, Mazouz A, Maenhoudt M, Michaux C (1984). Prevalence of antibody to rotavirus in moroccan cattle. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, **7**, 69-73.

Snodgrass DR, Fahey KJ, Wells PW, Campbell I, Whitelaw A (1980). Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk. *Infection and Immunity*, **28(2)**, 344-349.

Soltan MA, Tsai YL, Lee P, Tsai CF, Chang HFG, Wang HTT, Wilkes RP (2016). Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *Journal of virological methods*, **235**, 99-104.

Spendlove RS, Schaffer FL (1965). Enzymatic enhancement of infectivity of reovirus. *Journal of Bacteriology*, **89(3)**, 597-602.

Steele AD, Geyer A, Gerdes GH (2004). Rotavirus infections. *Infectious diseases of livestock*, 1256-1264.

Şahal M, Terzi OS, Ceylan E, Kara E (2018). Buzağı ishalleri ve korunma yöntemleri. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2018; **58**, 41-49.

Can Şahna K, Alkan F (2003). Sığırlarda rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde gebeliğin ve maternal antikorların rolü. *FÜ Sağlık Bil Derg*, **17**, 203-209.

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

Thurber E T, Bass EP, Beckenhauer WH. (1977). Field trial evaluation of a reo-coronavirus calf diarrhea vaccine. *Canadian journal of comparative medicine: Revue canadienne de medecine comparee*, **41(2)**, 131-136.

Timurkan MÖ, Alkan F (2020). Identification of rotavirus A strains in small ruminants: first detection of G8P [1] genotypes in sheep in Turkey. *Archives of Virology*, **165(2)**, 425-431.

Torres Medina A, Schlafer DH, Mebus CA (1985). Rotaviral and coronaviral diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **1(3)**, 471-493.

Ustaçelebi Ş, Us AD (2008). *Genel Viroloji*. 2. baskı, Pelikan yayınları 239-255.

Woode GN, Bridger JC, Hall G, Dennis MJ (1974). The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum-deprived calves in Great Britain. *Research in Veterinary Science*, **16(1)**, 102-105.

