

YENİ DOĞAN BUZAĞILARIN İŞHAL OLGULARINDA ROTAVİRUS VE CORONAVİRUS ARAŞTIRILMASI

Mehmet ÇABALAR^{1*}

Abdullah KAYA²

Sezai ARSLAN³

Investigation of Rotavirus and Coronavirus in Neonatal Diarrheic Calves

Özet: Bovine rotavirus (BRV) ve bovine coronavirus (BCV) yeni doğan buzağılarda ishal olgularının başlıca viral etkenleridir. Bu çalışma, buzağılarda ishal olgularında BRV ve BCV enfeksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla, Van yöresindeki 89 ishallerli buzağıdan alınan dışkı örnekleri, BRV için polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) tekniği ve BCV için enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kiti kullanılarak test edildi. Araştırma sonucunda, 89 ishallerli buzağıdan 16 (%17.97)'si rotavirus ve yalnızca 1 (%1.12) tanesi coronavirus yönünden pozitif tespit edildi. Elde edilen bulgular ile BRV ve BCV'nin yeni doğan buzağılarda ishal olgularında etiyolojik faktör olarak rol oynayabileceği ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Rotavirus, Coronavirus, Buzağı, İshal

Summary: Bovine rotavirus (BRV) ve bovine coronavirus (BCV) are the major causes of neonatal calf diarrhea. The objective of this study was to determine the prevalence of BRV and BCV in faecal samples from diarrhoeic calves. For this purpose, faecal samples collected from 89 calves with diarrhea in Van province were tested using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique for the presence of BRV and using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit for BCV. In conclusion, out of the 89 diarrhoeic calves, 16 (17.97%) were found to be positive for rotavirus and only 1 (1.12%) for coronavirus. These findings provide evidence for BRV and BCV in aetiology of neonatal calf diarrhea cases.

Key Words: Rotavirus, Coronavirus, Calf, Diarrhea

Giriş

Yeni doğan buzağılarda ishal olgularında enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan çok sayıda etken rol oynamaktadır. Enfeksiyöz viral etkenler arasında bovine rotavirus (BRV) ve bovine coronavirus (BCV) yeni doğan buzağılarda ishalin başta gelen nedenlerindedir. Ayrıca, BCV genç danalarda solunum sistemi ve erişkin sığırlarda "winter dysentery" olarak adlandırılan sindirim sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Reynold ve ark., 1986; Saif ve ark., 1991).

BRV ve BCV enfeksiyonları erişkin sığırlarda genellikle subklinik seyrederek ve bu hayvanlar hastalığın sürü içinde yayılmasında ve özellikle yeni doğan buzağılarda etkeni edinmesinde önemli rol oynarlar (Kodituwakku ve Harbour, 1990; Saif ve ark., 1991). Bu virusların bulaşması dışkı-ağız yolu ile meydana gelir. Buzağılarda rotavirus ve coronavirus enfeksiyonlarında klinik bulgular birbirine benzerdir. Her iki enfeksiyonda da sulu ishal, ateş, halsizlik ve dehidrasyon sonucu ölüm şekillenebilir. Kolostrum almamış buzağılarda ishal çok daha şiddetli gelişir ve bakteriyel, protozoa, kötü hijyen gibi komplikasyonlar mortalitenin artmasına neden olur (Snodgrass ve ark.,

1986; Murphy ve ark., 1999).

İshallerli buzağılarda rotavirus ve coronavirusların varlığı dünyanın değişik ülkelerinde (Reinhardt ve ark., 1989; Abraham ve ark., 1992; Beldali ve ark., 1999; Garcia ve ark., 2000) ve Türkiye'de (Burgu ve ark., 1995; Alkan, 1998; Çabalar ve ark., 2001; Erdoğan ve ark. 2003) yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bu çalışmada, Van yöresindeki yeni doğan buzağılarda ishal olgularında BRV ve BCV enfeksiyonlarının birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Dışkı örnekleri: Araştırmada, 2002-2003 yılları arasında YYÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğine getirilen ve Van ili merkez köylerinde tespit edilen ishal semptomlu 1-30 günlük buzağılardan toplanan 89 adet dışkı örneği materyal olarak kullanıldı. Örnekler test edilinceye kadar -20C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE): Rotavirus nükleik asidinin ekstraksiyonu, elektroforezi ve gümüş nitrat boyama aşamaları Herring ve ark. (1982) tarafından bildirilen yöntemle yapıldı. Bu

Geliş Tarihi: @: mcabalar@harran.edu.tr

1. Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

2. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van.

3. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van.

amaçla, her bir dışkı örneği %1 sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren ekstraksiyon buffer içinde 1:4 oranında sulandırıldı ve bu karışım üzerine eşit hacimde 8-hydroxy-quinoline içeren fenol-kloroform ilave edildi. Santrifüj işleminden sonra üst berrak kısım alınarak, % 7.5 olacak şekilde hazırlanan poliakrilamid jel (akrilamid:bisakrilamid, 37.5:1) kuyucuklarına, özel enjektör yardımıyla konuldu. Güç kaynağı 20 mA'e ayarlandı ve +4C'de 16 saat süreyle elektroforez (Hoefler Scientific Instruments, USA) işlemi uygulandı. Elektroforez işlemi sonunda küvet içine alınan jele gümüş boyaması (AgNO₃) yapıldı.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Coronavirus tespiti için ticari ELISA kiti (Bio-X Diagnostics, Belgium) kullanıldı. Bu amaçla, üretici firmanın yönergesi doğrultusunda her bir dışkı örneği 1:2 oranında sulandırıldı ve tabletin gözlerine 0.1 ml konuldu. Benzer şekilde pozitif-negatif kontrolleri konulan tablet oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda tablet gözleri 3 kez yıkandı ve sonra her göze anti-coronavirus-peroksidaz konjugat dilusyonundan 0.1 ml konularak oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkube edildi. Tekrarlanan yıkama işleminden sonra substrat solüsyonu içinde hazırlanan tetrametil benzidin kromojeni tabletin her gözüne 0.1 ml konuldu. Yaklaşık 20 dakika sonra reaksiyon 1M fosforik asit ile durdurularak spektrofotometrik olarak 450 nm absorbansa sahip filtre ile okuma yapıldı.

Bulgular

Ishal semptomu gösteren 89 buzağıdan elde edilen dışkı örneklerinden 16 (%17.97)'si BRV ve yalnızca 1 (%1.12) tanesi BCV yönünden pozitif bulundu. Hiç bir örnekte BRV ve BCV birlikte tespit edilmedi (Tablo 1). PAGE tekniği ile BRV pozitif bulunan örneklerin viral genom analizlerine göre 11 RNA segmentine sahip A tipi rotavirus oldukları belirlendi.

Tablo 1. İshalli buzağılarda saptanan BRV ve BCV pozitiflik oranları

İshalli buzağı sayısı	BRV (+)	BRV (-)	BRV (+)
	BCV (-)	BCV (+)	BCV (+)
89	16 (%17.97)	1 (%1.12)	-

Tartışma ve Sonuç

Buzağı ishalleri süt sığırcılığı işletmelerinde görülen önemli problemlerden birisidir. Bu hayvanların tedavi giderleri ve gelişme geriliği işletmelerde önemli ekonomik kayıplar meydana getirir. Buzağı ishalleri farklı nedenleri olan karmaşık bir hastalıktır. Bu karmaşıklık hastalığın önlenmesi, tedavi edilmesi ve

kontrolünü güçleştirir. Hastalığın enfeksiyöz nedenleri arasında viruslar, bakteriler ve parazitler bulunmaktadır (Busato ve ark., 1998; Murphy ve ark., 1999). Yapılan araştırmalarda, ishale neden olan enfeksiyöz etkenler arasında özellikle rotavirus, coronavirus, E. coli ve cryptosporidium olduğu bildirilmektedir. (Snodgrass ve ark. 1986; Eskiizmirli ve ark, 2001). Brandao ve ark. (2007), Brezilya'da şiddetli ishal semptomlu yeni doğan buzağuların dışkı örneklerinde rotavirus, coronavirus ve cryptosporidium parvum belirlemişlerdir. Enfeksiyöz olmayan nedenler ise daha çok çevre ve beslenme kaynaklıdır. Ağız sütünün alınmadığı veya az miktarda alındığı durumlar, ve ayrıca yetersiz temizlik ve havalandırma ile aşırı kalabalık barınak gibi olumsuz çevre koşulları buzağuların ishal olgularını artırıcı etkenlerdir. BRV ve BCV ile meydana gelen sindirim sistemi enfeksiyonlarında etkenlerin bulaşması, enfekte dışkı ile bulaşık su ve yemler vasıtasıyla olur. Erişkin sığırlar BRV ve BCV ile genellikle subklinik enfekte olurlar ve etkenin çevreye yayılmasında önemli rol oynarlar (Collins ve ark., 1987; Şahna ve Alkan, 2003). Collins ve ark. (1987), sağlıklı erişkin sığırların dışkıları ile coronavirusları çevreye saçtıklarını tespit etmişlerdir. Kodituwakku ve Harbour (1990), subklinik enfekte sığırların gebelik boyunca aralıklı olarak rotavirus saçtıklarını ve barınaklara uygulanan dezenfeksiyona rağmen bu hayvanların bir sonraki buzağılama sezonuna kadar virusun devamlılığında rol oynayarak yeni doğan buzağular için enfeksiyon kaynağı olabileceklerini göstermişlerdir.

Yeni doğan buzağuların ishal olgularında rotavirus ve coronavirus varlığı dünyanın farklı ülkelerinde yapılan araştırmalarda bildirilmiştir. Snodgrass ve ark.(1986), İskoçya'da yaptıkları çalışmada ishalli buzağuların %35.4'ünde rotavirus, %3.6'ında coronavirus saptamışlardır. Garcia ve ark.(2000) İspanya'da ishalli buzağılardan elde edilen gaitaların %41.9'unda rotavirus, %10.7'inde coronavirus; Bendali ve ark.(1999), Fransa'nın güney batı bölgesinde ishal semptomlu buzağılardan %47.4'ünde rotavirus, %16.5'inde coronavirus tespit etmişlerdir. Lu ve ark.(1991) Çin'de bir sığırcılık işletmesinde %10.1 oranında mortalite ve % 98.9 oranında ishal morbidite saptanan yeni doğanların ishal salgınına coronavirusların neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Abraham ve ark.(1992) Etiyopya'da yaptıkları araştırmada ishalli buzağı olgularında % 38.9 oranında coronavirus, %16.7 oranında rotavirusu belirlemişlerdir. Reynolds ve ark. (1984) 74 ishalli buzağı gaitasından 37 (%49.3)' sinde rotavirus ve 16 (%21.3)' sında coronavirus saptamışlardır.

İshalli buzağılarda rotavirus enfeksiyonu Türkiye'de ilk olarak Yazıcı ve Akça (1993) tarafından %17.8 olarak tespit edilmiştir. Burgu ve ark. (1995) ishalli buzağı dışkılarında %33.6 oranında rotavirus

bulmuşlar, karşılaştırmalı yaptıkları araştırmada, PAGE ile %28.3, ELISA ile %27.1 ve elektron mikroskopi (EM) ile %8.4 oranında rotavirus yönünden pozitiflik saptamışlardır. Alkan (1998), 83 adet ishali buzağı gaitasının ELISA ile %53'ünde rotavirus, %18'inde coronavirus tespit etmiştir. Çabalar ve ark. (2000), ishali buzağılarda rotavirus yönünden PAGE ile %18.3, latex aglutinasyon (LA) ile %14.2 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Eskiizmirli ve ark. (2001) ishali buzağıya ait 185 gaita örneğinden %25.9'unda rotavirus, %13'ünde coronavirus bulunduğunu bildirmişlerdir. Erdoğan ve ark. (2003), Kars yöresindeki ishal semptomlu buzağılardan topladıkları dışkı örneklerinin %25'inde rotavirus, %1'inde coronavirus saptamışlardır. Hasöksüz ve ark. (2005), 1-30 günlük ishal semptomlu 35 buzağıdan 13 (%37.1)'ünde coronavirus tespit etmişlerdir.

Bu araştırmada, 1-30 günlük ishal semptomlu 89 buzağıdan alınan gaita örneklerinin 16 (%17.97)'sında rotavirus, 1 (%1.12)'inde coronavirus saptanmıştır. Türkiye'de yeni doğan buzağılarda ishal etkeni olarak rotavirus ve coronavirusların varlığının araştırılması üzerine daha önce yapılan çalışmalarda rotavirus için %8.4 ile %53, coronavirus için %1 ile %37.1 arasında değişen oranlarda pozitiflik saptanmıştır. Bu araştırmadaki %17.97 rotavirus varlığı Yazıcı ve Akça (1993)'in bulgusuna benzer, diğer araştırma bulgularından ise daha düşük bulunmuştur. Araştırmamızda saptanan %1 coronavirus varlığı ise, Alkan (1998); Eskiizmirli ve ark. (2001) ve Hasöksüz ve ark. (2005)'in bulgularından düşük, Erdoğan ve ark. (2003)'in bulgusuna benzer bulunmuştur.

Bu araştırmadaki sonuçlar ve daha önce Türkiye'de yapılan araştırmalar buzağuların ishal olgularında rotavirus ve coronavirusların önemini ortaya koymakta ve ishallerden kaynaklanan kayıpların ekonomik açıdan dikkate alınmasının gerekliliğini göstermektedir. Buzağılarda ishale neden olan viral kaynaklı enfeksiyonlara karşı spesifik tedavi söz konusu olmadığından, mücadele ancak sekonder enfeksiyonlara olmakta ve sıvı-elektrolit desteği yapılabilmektedir. Diğer taraftan; yapılan araştırmalarda, viral enfeksiyonlara karşı aşılama ile annelerde oluşturulan bağışıklığın, doğum sonrası yeni doğanlara kolostrum vasıtasıyla aktarılmasının, buzağılarda korunma ve hastalık insidensinin azalmasında önemli düzeyde rol oynayabileceği ortaya konmuştur (Castrucci ve ark., 1994; Kohora ve ark., 1997).

Sonuç olarak; yeni doğan buzağuların ishal olgularının çok farklı nedenlerden kaynaklanması, çözümün tek yönlü olamayacağını göstermektedir. Bu nedenle, ishal etkenlerine karşı korunmada kapsamlı bir program hazırlanarak; buzağuların 1)

bakım ve besleme koşullarının düzeltilmesi, 2) direkt olarak yeterli miktarda kolostrum almalarının sağlanması ve 3) özellikle enfeksiyonun yoğun olarak görüldüğü işletmelerde gebe ineklere aşı yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Abraham, G., Roeder, P.L., Zewdu, R. (1992). Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 24, 74 - 80.
- Alkan, F. (1998). Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 45, 29 - 37.
- Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F., Sanaa, M. (1999). Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet. Res.*, 30, 61 - 74.
- Brandao, P.E., Villareal, L.Y.B., de Souza S.L.P., Richtzenhain L.J., Jerez, J.A. (2007). Mixed infections by bovine coronavirus, rotavirus and cryptosporidium parvum in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. *Arq. Inst. Biol.*, 74, 33 - 34.
- Burgu, İ., Akça, Y., Alkan, F., Özkul, A., Karaoğlu, T. (1995). Yenidoğan ishali buzağılarda rotavirusların elektron mikroskopi (EM), enzyeme linked immunosorbent assay (ELISA) ve polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 42, 491 - 498.
- Busato, A., Lentze, T., Hofer, D., Burnens, A., Hentrich, B., Gaillard, C. (1998). A case control study of potential enteric pathogens for calves raised in cow-calf herds. *J. Vet. Med. B.*, 45, 519 - 528.
- Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, F., Traldi, V., Angelillo, V. (1994). A study on neonatal calf diarrhea induced by rotavirus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 17, 321 - 331.
- Collins, J.K., Riegel, C.A., Olson, J.D., Fountain, A. (1987). Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 48, 361 - 365.
- Çabalar, M., Boynukara, B., Gülhan, T., Ekin, İ.H. (2001). Prevalence of rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in Van, Turkey. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 25, 191 - 196.
- Çabalar, M., Voyvoda, H., Sekin, S. (2000). Virological and serological examinations for rotaviruses in diarrhoeic calves. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 11, 18 - 21.
- Erdoğan, H.M., Ünver, A., Arslan, M.Ö., Çitil, M., Güneş, V. (2003). Neonatal buzağı hastalıkları. 5. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, 2-5 Temmuz, Van.
- Eskiizmirli, S.N., Öncel, T., Beyazıt, A., Mısırlıoğlu,

Ö.Z. (2001). Türkiye'nin değişik illerindeki ishallerde buzağılarda rotavirus, coronavirus ve cryptosporidiosis yayılımı. *Vet. Hek. Mikrobiyol. Derg.*, 2, 35 - 42.

Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Orden, J.A., Cid, D., Sanz, R., Gomez-Bautista M., de la Fuente, R. (2000). Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 23, 175 - 183.

Hasöksüz, M., Kayar, A., Dodurka, T., Ilgaz, A. (2005). Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in northwestern Turkey. *Acta Vet. Hung.*, 53, 137-146.

Herring, A.J., Inglis, H.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, R.D., Menzies, J.D. (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels, *J. Clin. Microbiol.*, 16, 473 - 477.

Kodituwakku, S.N., Harbour, D.A. (1990). Persistent excretion of rotavirus by pregnant cows. *Vet. Rec.*, 126, 547 - 549.

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.

Lu, C., Yao, H., Eichhorn, W. (1991). Coronavirus as an agent of neonatal calf diarrhea in a Chinese dairy cattle farm. *J. Vet. Med. B.*, 38, 473 - 476.

Murphy, F.A.Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. (1999). "Veterinary Virology". Academic Press. New York.

Reinhardt, G., Riedemann, S., Polette, M., Niedda, M. (1989). Coronavirus as agent of neonatal calf diarrhea in southern Chile. *J. Vet. Med. B.*, 36, 131 - 133.

Reynolds, D.J., Chasey, D., Scott, A.C., Bridger, J.C. (1984). Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces. *Vet. Rec.*, 114, 397 - 401.

Reynolds, D.J., Morgan, J.H., Chanter, N., Jones, P.W., Bridger, J.C., Debney, T.G., Bunch, K.J. (1986). Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.*, 119, 34 - 39.

Saif, L.J., Brock, K.V., Redman, D.R., Kohler, E.M. (1991). Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.*, 128, 447 - 449.

Snodgrass, D.R., Terzolo, H.R., Sherwood, D., Campbell, I., Menzies, J.D., Synge, B.A. (1986). Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.*,

119, 31 - 34.

Şahna, K.C., Alkan, F. (2003). Sığırlarda rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde gebeliğin rolü. *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.*, 17, 203 - 209.

Yazıcı, Z., Akça, Y. (1993). Buzağılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 40, 231 - 240.