

Neonatal Buzağılarda Pasif Transfer Yetersizliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Testler

Örsan GÜNGÖR*

Nihat ÖZYURTLU**

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

** Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır-TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2004/60-D

Özet

Neonatal buzağılar agammaglobulinemik doğarlar ve neonatal hastalıklardan korunmak için gerekli olan immunglobulinleri kolostrumdan sağlarlar. Bu nedenle, buzağıyı hastalıktan, kolostrumdan alınan immunglobulinler (Ig'ler) korumaktadır. Bazı buzağılar (yaklaşık %30'u) erken kolostrum almasına rağmen agammaglobulinemik yada hipogammaglobulinemik kalabilmektedir. İmmunglobulin transferindeki bu yetersizlik buzağının yaşamını ve sağlığını tehlikeye atmaktadır.

Bu derlemenin amacı, neonatal buzağılarda önemli ekonomik kayıplara neden olan pasif transfer yetersizliğinin belirlenmesinde kullanılan teknikler hakkında bilgi vermektir.

Anahtar sözcükler: neonatal buzağı, pasif transfer yetmezliği, Ig.

The Tests Used For Detection of the Failure of Passive Transfer in Neonatal Calves

Summary

The neonatal calves are born agammaglobulinemic and maternal immunglobulins (Ig) are acquired from colostrum to protect the calf from neonatal infections. For this reason, required Ig that ingested colostrum protect for calves from diseases. Some calves (approximately %30), remain agammaglobulinemic or hypogammaglobulinemic despite receiving early colostrum. Failure of this Ig transfer will endanger the survival and health of the calf.

The aim of this review is given information to determination technics of failure of passive transfer in neonatal calves which causes important economic losses.

Keywords: Neonatal calf, failure of passive transfer, Ig.

GİRİŞ

Neonatal buzağı hastalıkları ve kayıpları veteriner hekimlik açısından ve ekonomik olarak hala önemini korumaktadır¹.

Yeni doğan buzağı için alınan kolostrumun emilimi onun hastalıklara karşı direnci, gelişme oranı ve hayatta kalabilirliği açısından oldukça önemlidir^{2,3}. Fötüs ve anne arasındaki ilişkiyi sağlayan plasentanın çok sınırlı geçirgenliğe sahip olması nedeni ile buzağı ilk doğduğunda agammaglobulinemiktir^{4,6}. Bu nedenle buzağının hastalıklara karşı korunması için gerekli olan immunglobulinler (Ig), alınan kolostrumdan barsaklar yolu ile emilerek kan dolaşımına verilir^{7,8}.

Kolostrumun erken alınımı, buzağı için hayati önem taşımaktadır. İlk 6 saat içinde alınan kolostrumdaki immunglobulinlerin %97'si barsak mukozası tarafından emilerek kan dolaşımına verilebilirken, bu oran 24. saat sonunda en az seviyeye iner⁷. Kolostrumun alınımından 3 saat sonra serum immunglobulin seviyesi artmaya başlar ve 24. saatte en üst seviyeye ulaşır⁹.

Neonatal buzağılarda koruyucu seviyede immunglobulin konsantrasyonunun (>1500 mg/dl) oluşması için buzağının iyi kalitede ve yeterli miktardaki kolostrumu yaşamın uygun saatlerinde (vücut ağırlığının en az %6'sı kadar ilk 6 saat içinde) alması gerekir. Eğer yeterince kolostrum uygun saatlerde alınmaz ya da hiç alınamazsa, pasif transfer yetersizliği yani hipogammaglobulinemi meydana gelir^{5,10}. Bununla birlikte, buzağılar doğduktan sonra yeterince kolostrum almalarına rağmen çeşitli sebeplerden dolayı (perinatal stres başta olmak üzere, prematüre doğum, hipotermi, hipoksi, güç doğum, annenin tecrübesiz ve hırçın olması, zayıf buzağı sendromu) serum immunglobulin seviyesinin yeterli seviyeye ulaşamadığı yani buzağuların hipogammaglobulinemi ile karşı karşıya kaldığı belirlenmiştir¹¹. O'Kelly¹², buzağuların erken dönemde ve yeterli miktarda kolostrum almasına rağmen %30'unun hipogammaglobulinemik olarak kaldığını belirlemiştir. Pasif transferin yetersizliği ile morbidite ve mortalite arasındaki ilişki birçok çalışmada ele alınmıştır^{1,3,8,10,12,23}.

Pasif transfer yetersizliği buzağılarda ciddi bir problemdir¹³. Doğumdan sonraki 24. saatten sonra buzağının immun yapısının bilinmesi, süttten kesimden önce ve süttten kesimden sonraki dönemde buzağının büyümesi hakkında önemli bir belirleyicidir¹⁴. Buzağının dolaşımındaki immunglobulin seviyesi, immun yapısını direk olarak yansıtmaktadır¹⁵. Buzağuların immun yapısını belirlemek amacıyla birtakım direk ya da indirek yöntemler kullanılmaktadır.

Antikor seviyesinin indirek yöntemler kullanılarak

belirlendiği testlerde (Çinkosülfat Test, Sodyum Sülfat Türbidite Testi, Glutaraldehit Çökeltme Testi, g-Glutamil Transferaz seviyesi), temel prensip numune içindeki antikorlarla test solusyonunun çökeltmesi esasına dayanır ve bu testlerde toplam antikor miktarına ilişkin bilgi edinilir. Direk yöntemlerde (ELISA, SRID) ise, istenen Ig sınıfının miktarı antijen ve antikor reaksiyonu değerlendirilerek belirlenebilmektedir.

Bu makalede neonatal buzağılarda pasif transferin ve pasif transfer yetersizliğinin öneminin bilinmesi ile pasif transfer yetersizliğinin belirlenmesinde kullanılan testler hakkında bilgi verilmiştir.

BUZAĞILARDA PASİF TRANSFERİN BELİRLENMESİ AMACIYLA KULLANILAN TESTLER

Çinkosülfat (ZnSO₄) Türbidite Yöntemi

Testin yapılışı:

-Bu amaçla bir deney tüpüne 0.1 ml buzağı serumu, 6 ml %25'lik ZnSO₄ stok solusyonu içerisine konulur.

-Oda ısısında 1 saat inkübe edilir.

-Çökeltmenin miktarı pasif transferin derecesi hakkında bilgi verir. Çökeltmenin derecesi ile pasif transferin oluşumu arasında pozitif bir ilişki vardır.

Değerlendirme: Değerlendirme yapılmadan önce anneden alınan kandan serum ayrıldıktan sonra immunglobulin seviyesi belirlenir ve meydana gelen çökelti standart olarak kabul edilir. Oluşan çökelti, tüpün üzeri çizilerek 4 eşit parçaya ayrılarak derecelendirilir ve buzağının serumunda meydana gelen çökelti ile karşılaştırılır. En alt seviyede (1. derece) oluşan çökelti başarısız, 2. derecede oluşan çökelti yetersiz, 3. derecede oluşan çökelti orta derecede ve 4. derecede oluşan çökelti yeterli pasif transfer olarak değerlendirilir^{9,11}.

(ZnSO₄ stok solusyonu: 250 mg ZnSO₄ + 1 L distile su karışımı ile hazırlanır. Solusyon koyu renkli şişede saklanmalı ve şişenin ağzı sıkıca kapatılmalı, CO₂, ısı ve ışıktan korunmalıdır).

Sodyum Sülfat Presipitasyon Testi

Testin uygulanışı: %14, %16 ve %18'lik sodyum sülfat stok solusyonlarından cam tüplere 1.9 ml konulur ve bunların üzerine 0.1 ml buzağı serumu ilave edilerek 1 saat oda ısısında bekletilir.

Değerlendirme: Tüm örneklerde bulanıklık olması serum IgG seviyesinin 1500 mg/dl'den fazla olduğunu

ve pasif transferin başarılı olduğunu, %16 ve %18'lik çözeltilerde bulanıklık olması IgG seviyesinin 500-1500 mg/dl arasında olduğunu ve pasif transferin kısmen oluştuğunu, Sadece %18'lik çözeltide bulanıklık oluşması, IgG seviyesinin 500 mg/dl civarında olduğunu ve pasif transferin yetersiz olduğunu gösterir¹¹.

Refraktometri Yöntemi

Refraktometri, Toplam Serum Proteinleri (TSP)'lerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. İmmunglobulinler, kolostrum alınımı ve emilimini takiben kanda miktarı belirgin bir şekilde yükselen protein alt sınıflarıdır. Toplam Serum Proteinlerinin seviyesinin belirlenmesi, yeni doğmuş buzağuların immün yapısının ortaya konmasında ve fikir edinilmesinde yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte serum albumin seviyesi oldukça değişken olduğundan TSP seviyesi her zaman buzağının immün yapısını yansıtmayabilir. Refraktometri, hızlı sonuç alınabilen bir yöntem olmasına karşın, nonspesifik bir yöntemdir ve dehidre buzağularda yanlış sonuç verir¹⁶.

Toplam Serum Protein seviyesi 5.5 g/dl'den daha az ise Ig düzeyinin koruyucu seviyenin altında olduğu kabul edilir¹⁷.

Glutaraldehit Çökeltme Testi

Glutaraldehid (GA) testi, basit hazırlanabilen yarı kalitatif bir testtir. Serumda uygulandığında, sadece gammaglobulinlerin miktarının yükselip yükselmediğini gösterirken, plazma veya tam kanda uygulandığında fibrinojen ve gammaglobulinlerin artıp artmadığı hakkında bilgi verir¹⁸. Hayvan türlerine göre belirli hastalıklarda GA solusyonu konsantrasyonları değişmektedir. Buzağuların pasif transfer yetmezliğine bağlı olarak gelişen hipogammaglobulineminin belirlenmesi için %10'luk GA solusyonu kullanılır¹⁹.

Test için 3 ml'lik deney tüpleri kullanılır. Bir kısım GA solusyonu (50 ml), 10 kısım serum (0.5 ml) ile karıştırılır ve koagülasyon tesbiti için 1 saat gözlenir. Hipogammaglobulinemik buzağularda serum 1 saat içinde koagüle olmaz. Test 4 gr IgG/L konsantrasyonu sınır teşkil edecek şekilde hazırlanmıştır. Daha yüksek IgG seviyelerine sahip örnekler 30 dakikadan daha kısa süre içinde koagüle olur¹⁹. Pozitif sonuç test tüpünün tabanında sabit, opak, sarı bir çökeltme formasyonu ile karakterizedir¹⁶.

(%10'luk stok solusyonunun hazırlanışı: Bunun için %25'lik GA stok solusyonundan (Merck No:4239) 4 ml, 6 ml distile su ile karıştırılarak %10'luk solusyon elde edilir).

Serum g-Glutamil Transferase (GGT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Buzağularda GGT aktivitesinin saptanması, pasif transfer yetmezliğinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. g-Glutamil Transferase, molekül ağırlığı 80 000 olan bir enzimdir ve yeni doğmuş buzağuların barsaklarından kolaylıkla emilebilmektedir. Kolostrumun GGT aktivitesi, olgun ineklerin serum GGT aktivitesinden 60-160 kat daha fazladır²⁰. Bu aktivite yavaş yavaş azalarak 5. hafta sonunda normal seviyeye iner. Doğumdan hemen sonra yeterince kolostrum alamayan buzağularda serum antikor seviyesine benzer şekilde serum GGT seviyesi de düşük seviyede kalır. Buna paralel olarak, buzağularda serum GGT seviyesinin belirlenmesi buzağuların immün yapısının belirlenmesinde kullanılan bir indikatördür. Pasif transfer yetmezliğinin belirlenmesinde, veteriner pratikte kullanmak amacıyla, serumda GGT aktivitesinin belirlenebilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bununla birlikte kan ya da kan serumunda GGT seviyesinin kalitatif olarak saptanması amacıyla geliştirilen ticari kitler çiftlik koşullarında kolaylıkla kullanılabilir²¹.

ELISA Yöntemi

Bu yöntem ile immunglobulin seviyesi doğrudan belirlenebilmektedir. Alınan örneklerden ayrılan serumlar, sığır antikorları ile kaplanmış plakların içerisine bir pipet yardımı ile boşaltılır ve oda ısısında inkübe edildikten sonra ELISA okuyucusu ile değerlendirilir.

Örneklerdeki immunglobulin seviyesinin tam olarak belirlenebilmesi yöntemin bir avantajı olmasına rağmen, uygulanabilmesi için laboratuvar donanımına gerek duyulması, ekonomik olmaması ve saha koşullarında uygulama olanağının bulunmaması dezavantajdır^{12,22}.

Single Radial Immunodiffusion (SRID) Yöntemi

SRID yöntemi esas olarak kolostrumdaki Ig seviyesinin belirlenmesi amacıyla dizayn edilmiş kantitatif bir metottur. Bunun yanında serum Ig seviyesinin belirlenmesinde de başarı ile kullanılabilir. Bu metot ile istenilen immunglobulin sınıfının tayini yapılabilir. Kolostrumun içerdiği immunglobulin miktarı ya da buzağının immün yapısı hakkında doğrudan bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Bu metod ile immunglobulin seviyesinin belirlenmesi için ticari olarak elde edilebilen SRID kitler bulunmaktadır ve en fazla IgG seviyesinin belirlenmesi amacıyla kullanılır. Kitler 30-60'luk plaklar halinde satılır ve mikropipet içermektedir. Serum veya kolostrum örneklerinden 3 ml alınarak plakların içerisine boşaltılır ve oda ısısında 18 saat bekletilir. Daha

sonra plak üzerinde çökme ile oluşan dairenin çapı standarda göre ölçülerek değerlendirme yapılır. Değerlendirme sonrası sonuçlar mg/dl olarak belirlenir¹⁷.

Ölçüm sonuçlarına göre IgG seviyesi: 800 mg/dl'den az (yetersiz pasif transfer), 800-1600 mg/dl arasında (pasif transfer kısmen oluşmuş), 1600 mg/dl'den fazla (normal pasif transfer), olarak değerlendirilir^{17,23}.

SONUÇ

Agammaglobulinemi ve hipogammaglobulinemin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin, bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar 2 ana gruba ayrılırlar. Birinci gruptaki test yöntemleri (ELISA ve SRID) ile serumdaki Ig seviyesi direkt olarak belirlenebilmektedir ve en güvenilir yöntemler olarak kabul edilmektedirler. Ancak sonuçların geç elde edilmesi bu iki yöntemin bir dezavantajıdır. ELISA metodu laboratuvar koşullarında uygulanabilmektedir ve pahalıdır. Bu durum saha koşullarında uygulanmasını güçleştirmektedir.

SRID yöntemi güvenilir ve saha koşullarında kolaylıkla uygulanabilir metotlardan olmakla birlikte sonuçların geç elde edilmesi bir dezavantajıdır. İkinci gruptaki test yöntemleri (Sodyum sülfat presipitasyon, Çinko sülfat çökme, Refraktometri, GGT ve Glutaraldehyd test yöntemleri), oldukça kısa sürede sonuç verir, ayrıca özel ekipman ve donanım gerektirmediğinden saha koşullarında kolaylıkla uygulanabilmektedir. Bu grupta bulunan testler immün yapının belirlenmesinde kullanılan indirek yöntemlerdir ve sonuçlar kalitatif olarak elde edilir, bu nedenle yanıtıcı sonuçlar elde etme olasılığı diğer yöntemlere göre daha yüksektir, bir başka deyişle güvenilirliği şüphelidir.

KAYNAKLAR

- Zaremba W, Guterbock WM, Holmberg CA: Efficacy of a dried colostrum powder in the prevention of disease in neonatal holstein calves. *J Dairy Sci*, 76:831-836, 1993.
- Crowley ML, Fisher LJ, Owen BD: Blood-derived immunoglobulins in milk replacer, or by injection for improved performance of colostrum-deprived neonatal calves. *An Feed and Tech*, 47: 245-257, 1994.
- Ventorp M, Michanek P: Cow-calf behaviour in relation to first suckling. *Res Vet Sci*, 51: 6-10, 1991.
- Arthington JD, Cítettell MB, Quigley JD: Effect of dietary IgG source (colostrum, serum or milk-derived supplement) on the efficiency of Ig absorbtion in newborn holstein calves. *J Dairy Sci*, 83:1463-1467, 2000.
- Singh A, Ahuja SP, Singh B: Individual variation in the composition of colostrum and absorbtion of colostrum antibodies by the precolostral buffalo calf. *J Dairy Sci*, 76:1148-1156, 1993.
- Tyler H, Ramsey H: Hypoxia in neonatal calves: effect on intestinal transport of immunoglobulins. *J Dairy Sci*, 74: 1953-1956, 1991.
- Güngör Ö, Baştan A: Buzağılarda neonatal dönem ve dönemdeki bazı problemlere klinik yaklaşımlar. *Vet Hek Dern Derg*, 71(3-4):23-26, 2000.
- Michanek P, Ventorp M: Passive immunization of new-born dairy calves on three farms with different housing systems. *Swedish J Agric Res*, 23:37-43, 1993.
- Drost M: Principles of colostrum feeding. In, Morrow DA (Ed): Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 274-285, 1980.
- Mee JF, O'Farrel KJ, Reitsma P, Mehra R: Effect of a whey protein concentrate used as a colostrum substitute or supplement on calf immunity, weighth gain and health. *J Dairy Sci*, 79:886-894, 1996.
- Kersting K: Postpartum Care of Cow and Calf. In, Youngquist RS (Ed): Current Therapy in Large Animal Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 324-329, 1997.
- O'Kelly JC: Serum immunoglobulin concentrations in genetically different types of suckling beef calves in a tropical environment. *Aust Vet J*, 68: 261-268, 1991.
- Perino LJ, Sutherland RL, Wollen NE: Serum g-glutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer of immunoglobulin G. *Am J Vet Res*, 54(1):56-59, 1993.
- Wittum TE, Perino LJ: Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term healt and performance of calves. *Am J Vet Res*, 56(9):1149-1154, 1995.
- Joshi VB, Saini SS, Sodhi SS: Serum protein, immunoglobulin and haemolytic complement levels in the sera of buffalo neonates. *Indian J Anim Sci*, 62(8): 728-731, 1992.
- Hopkins FM, Dean DF, Greene W: Failure of passive transfer in calves: Comparison of field diagnosis methods. *Mod Vet Pract*, 625-628, 1984
- Güngör Ö, Baştan A: Gebe İneklere Uygulanan Aşıların Kolostrum ve Buzağıda IgG Konsantrasyonu Üzerine Etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51(1): 13-17, 2004.
- Vihan VS: Glutaraldehyde coagulation test for detection of hipo-gamma globulinemi in neonatal kids. *Indian Vet J*, 66:101-105, 1989.
- Tennant B, Baldwin BH, Braun RK, Norcross NL, Sandholm M: Use of the glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal calves. *J Am Vet Med Assoc*. 174(8):848-853, 1979.
- Tessman RK, Tyler JW, Parish SM, Johnson DL, Gant RG, Grasseschi HA: Use of age and serum gamma-glutamyltransferase activity to assess passive transfer status in lambs. *J Am Vet Med Assoc*, 211(9):1163-4, 1997.
- Bogin E, Avidar Y, Shenkler S, Israeli B, Spiegl N, Cohen R: A rapid field test for the determination of colostrum ingestion by calves, based on g-Glutamyltransferase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 31:665-699, 1993.
- Verma R, Jaisval TN: Protection, humoral and cell-mediated immune responses in calves immunized with multiple emulsion haemorrhagic septicaemia vaccine. *Vaccine*, 15(11): 1254-1260, 1997.
- Başoğlu A, Çamkerten İ, Sevinç M: Serum immunoglobulin concentrations in diarrheic calves and their measurement by single radial immunodiffusion. *Isr J Vet Med*, 54(1):9-10, 1999.