

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde İshalli Buzağlarda Grup A Rotavirus Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Feray ALKAN ¹  Mehmet Özkan TİMURKAN ² İlke KARAYEL ¹

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, TR-06110 Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

² Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, TR-25240 Yakutiye, Erzurum - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2014-11904 Received: 07.07.2014 Accepted: 10.10.2014 Published Online: 13.10.2014

Özet

Bu çalışmada, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde (KKTC) yerleşik bir sığır yetiştiriciliği işletmesinde bulunan ishallerli buzağlarda saptanan Grup A rotavirusun moleküler karakterizasyonu bildirildi. İshallerli buzağlardan sağlanan dışkı örnekleri antijen ELISA ve Grup A rotavirus VP6 proteini kodlayan gen bölgeleri esas alınarak yapılan RT-PCR ile test edildi. Daha sonra enfeksiyona neden olan virusun VP4 ve VP7 proteinlerini kodlayan gen bölgeleri, generik ve tip spesifik primerler kullanılarak çoğaltıldı. Elde edilen verilere dayanılarak söz konusu işletmede bulunan buzağlarda enfeksiyona neden olan rotavirusun G6P[11] genotipe sahip olduğu belirlendi. Bu çalışma, KKTC'de buzağlarda Grup A rotavirusların G ve P genotiplerinin bildirildiği ilk çalışmadır.

Anahtar sözcükler: Rotavirus, Buzağı, İshal, Genotip, KKTC

The Molecular Characterization and Detection of Group A Rotavirus From Calves with Diarrhea in Turkish Republic of Northern Cyprus

Abstract

In this study, the molecular characterization of the Group A rotavirus obtained from calves with diarrhea in a farm in TRNC was reported. Feces samples were detected as positive by ELISA and RT-PCR depending on the amplification of the VP6 gene of rotavirus. Then the aetiological agent was analyzed by RT-PCR with generic and type-specific to the genome segments encoding VP4 and VP7 of rotavirus. Findings revealed that the rotavirus circulating within this farm belongs to G6 and P[11] genotype. This is the first study to report the G and P genotypes of Group A rotavirus from calves with diarrhea in TRNC.

Keywords: Rotavirus, Calf, Diarrhoea, Genotype, TRNC

GİRİŞ

Grup A rotaviruslar birçok türün yenidoğanlarında enteritis nedenlerinden olup, özellikle sığır yetiştiriciliğinde, enfekte hayvanların ağırlık kazanmasında azalma ya da ölüm, veteriner hekimlik hizmetlerine ilişkin giderler, vb. nedenlere bağlı olarak, önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar ^[1].

Rotavirus genomu 11 segmentli, çift iplikçikli olup, 6 yapısal ve 6 yapısal olmayan proteini kodlar. Bu proteinlerden dış kapsitte yer alan VP7 (glikoprotein) ve VP4 (proteaz duyarlı protein) nötralizan antikorların oluşumunu uyarır. Bu proteinleri kodlayan gen bölgelerinin farklılıkları esas alınarak, rotaviruslar sırasıyla G ve P genotipleri

olarak sınıflandırılırlar ^[2]. Bugüne kadar insan ve farklı hayvan türlerinde 27 G ve 37 P genotip bildirilmiştir ^[3-11]. Sığırlarda sıklıkla bildirilen G genotipleri G6, G10 ve G8; P genotipleri ise P[1], P[5] ve P[11] ^[5-9] olmakla birlikte, bunların dışında G ve P genotipe sahip rotaviruslar da saptanmıştır ^[2,3,10,11].

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde (KKTC) yeni doğan buzağı ishallerinin etiyolojik ajanı olarak rotavirusların varlığı, yaygınlığı ve moleküler karakterizasyonuna ilişkin olarak, bilindiği kadarıyla, bugüne dek bir çalışma bildirilmemiştir. Bu çalışmada, KKTC'de bulunan bir sığır yetiştiriciliği işletmesinde bulunan buzağlarda saptanan rotavirusun G ve P genotipi belirlenmiş olup, enfeksiyonunun epidemiyolojisine yönelik değerlendirmelerde bulunulmuştur.



İletişim (Correspondence)



+90 312 3170315/4363



falkan@ankara.edu.tr

MATERYAL ve METOT

Saha Materyalleri ve Referans Viruslar

Bu çalışmada KKTC'de bulunan bir sığır yetiştiriciliği işletmesinde yeni doğan buzağılarda görülen ishal olgusunun tanısı amacıyla -2008 yılında- laboratuvarımıza gönderilen ve ticari Antijen-ELISA (BioK 067, Bio-X Diagnostic, Belçika) kiti kullanılarak rotavirus antijen varlığı saptanan dışkı örneklerini (n=5) temsilen rastgele seçilen bir dışkı örneğinde bulunan rotavirusun G ve P genotipleri incelendi. Çalışmada pozitif kontrol olarak grup A sığır rotavirus referans suşları olan NCDV (G6P[1]), B223 (G10P[11]) ve UK (G6P[5]) suşları kullanıldı.

RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu, High Pure Viral RNA Ekstraksiyon (Cat No:11858882001, Roche, Almanya) kiti kullanılarak, üretici firmanın belirttiği prosedüre uygun olarak yapıldı.

RT-PCR İle Genotiplendirme

Bu amaçla, rotavirus nükleik asidinin mutasyonel açıdan korunaklı VP6 gen bölgesi hedef alınarak uygulanan RT-PCR'da beklenen büyüklükte ampikon (379 bp) saptanmasını takiben, VP4 ve VP7 gen bölgeleri için spesifik generik primerler ve tip spesifik primerler kullanılarak (Tablo 1), saha virusu G ve P genotipi yönünden analiz edildi. G ve P tiplendirme amacıyla generik primerler ile yapılan PCR (1. tur) sonrasında elde edilen ampikonlar, farklı G (G6, G8 ve G10) ve P (P[1], P[5] ve P[11]) genotiplerine spesifik primerlerin kullanıldığı 2. tur PCR işlemine alındı. G8, G10 ve P genotipleri (P[1], P[5] ve P[11]) için yapılan 2. tur PCR işleminde forward primer olarak, 1. tur PCR forward

primerleri kullanıldı.

PCR öncesinde, ekstraksiyon işlemi ile elde edilen viral RNA kullanılarak, Revert Aid First Strand cDNA Sentez Kiti (#K1622, Thermo Scientific, Almanya) ve üretici firmanın belirttiği prosedür ile cDNA elde edildi. Hazırlanan cDNA, hedef gen bölgeleri için tasarlanan primerler ile karıştırıldıktan sonra, sekonder RNA yapılarının denatürasyonu amacıyla 95°C'de 5 dk bekletildi ve buzda soğutuldu. Bunların üzerine daha önce kokteyl olarak hazırlanmış olan reaksiyon tamponu, dNTP (her biri 10 mM), MgCl₂ (25mM) ve 5 IU Taq DNA polimeraz karışımından ilave edilerek, termal çeviricide ısı döngülerine (40 siklus 94°C'de 1 dk, 50°C'de 1 dk ve 72°C'de 2 dk) maruz bırakıldı. Elde edilen sonuçlar etidyum bromid boyası varlığında hazırlanan agaroz jel elektroforez işlemi ile UV-transilluminasyonu izlendi ve görüntülendi.

BULGULAR

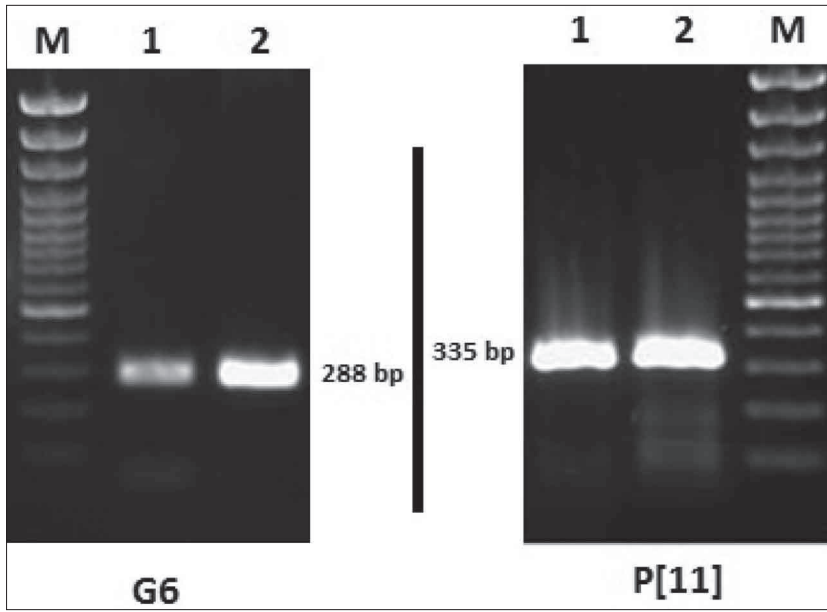
Referans viruslar eşliğinde saha virusuna uygulanan RT-PCR sonrasında, VP4, VP6, VP7 kodlayan gen bölgesi için beklenen büyüklüklerde (sırasıyla 854 bp, 379 bp ve 1062 bp) ürün elde edildi. Tip spesifik primerler ile yapılan çalışma sonrasında ise VP7 gen bölgesi için referans G6 viruslar (NCDV ve UK) için 288 bp ve G10 virus (B223) için 715 bp büyüklüğünde; VP4 kodlayan gen bölgesi için referans viruslar NCDV, UK ve B223 için sırasıyla 463 bp (P[1] genotip spesifik), 662 bp (P[5] genotip spesifik) ve 335 bp (P[11] genotip spesifik) büyüklüğünde ürün elde edildi.

Araştırmada G ve P genotipleri sorgulanan saha virüsü ise G6 ve P[11] genotipleri ile uyumlu büyüklükte ampikon oluşturdu (Şekil 1).

Tablo 1. VP4, VP6 ve VP7 gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primer dizinleri

Table 1. Primers used for the amplification of VP4, VP6, VP7 gene regions of rotavirus

Hedef	Primer	Primer Dizini (5'→3')	Gendeki Lokus	Ürün (bp)	Kaynak
VP6 Generik	VP6-F	GAC GGV GCR ACT ACA TGG T	747-766	379	[12]
	VP6-R	GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG	1126-1106		
G Generik	Beg 9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28	1062	[13]
	Eng 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-1036		
	Eng 9 crw	GGT CAC ATC TTA CAG CTT TAA CCT	1062-1039		[14]
	End 9 deg	GGT CAC ATC DWM CAR YTC TAA YYH M	1062-1038		
P Generik	P-GenF	TTCATTATTGGGACGATTCACA	1064-1085	854	[7]
	P-GenR	CAACCGCAGCGGATATATCATC	1918-1897		
G genotiplendirme	G6-F	TGTATGGTATTGAATATACCAC	50-71	288	[15]
	G6-R	GGTATCAGCTATTTCTGTTGAT	336-315		
	G8-R	CGGTCCGGATTAGACAC	274-256	274	[7]
	G10-R	TTCAGCCGTTGCGACTTC	715-697		
P genotiplendirme	P1-R	TTAAATTCATCTTAGTTCTC	1526-1505	463	[7]
	P5-R	GGCCGCATCGGATAAAGAGTCC	1725-1704		
	P11-R	TGCCTCATAATATTGTTGGTCT	1398-1377	335	



Şekil 1. Referans viruslar ve saha virusunun VP4 ve VP7 kodlayan gen bölgelerinin çoğaltılması görüntüsü. M; 100bp DNA Merdiveni, (Thermo Scientific, Almanya); Hat 1: ishalleri buzağıda saptanan saha virüsü, Hat(2): Pozitif kontrol viruslar (G ve P tiplendirme için sırasıyla BRV NCDV (G6P[1]) ve BRV B223 (G10P[11]))

Fig 1. The results of the amplification of genes coding VP4 and VP7 of reference viruses and of rotavirus field strain. M, 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, Germany); Lines 1, rotavirus detected in a calf with diarrhea; Lines 2, Positive controls (BRV NCDV (G6P[1]) and BRV B223 (G10P[11]) for G and P genotyping, respectively)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Birçok hayvan türünün yeni doğanlarında ve çocuklarda ishal olgularının en önemli etiyolojik ajanlarından birisi olarak tanımlanan Grup A rotavirusların KKTC'de yenidoğan ishalleri buzağılarda yaygınlığı, hastalığın neden olduğu ekonomik kayıpların boyutu ve rotavirus genotipleri konusunda herhangi bir bildirim bulunmamaktadır.

Bu çalışmada bir işletmede buzağılarda gözlenen ishal olgularından saptanan Grup A rotavirusun G ve P genotipleri sorgulanmıştır. Elde edilen veriler saha virusunun G6 ve P[11] genotipinde olduğunu ortaya koymuştur. Saptanan G ve P tipleri, dolayısıyla G/P genotip kombinasyonu, sığır rotavirusları için Türkiye [5] ve diğer bazı ülkelerde [9,11] sıklıkla tanımlanmıştır. Epidemiyolojik anlamda en önemli rotavirus G genotipleri G6 ve G10; P genotipleri ise P[1], P[5] ve P[11] olmakla birlikte [5,9-11,15], farklı genotip ya da genotip kombinasyonuna sahip rotaviruslar da [7,15] bildirilmiştir. Fodha ve ark.[8] Tunus'ta sığırlarda G6 ve G8 genotipleri ya da bunların her ikisinin birçok işletmede yaygın olduğunu bildirmişler ve ticari aşıların G6 içeriyor olması nedeniyle G8 genotipin ekonomik anlamda tehlikesine dikkat çekerek, G6/G8 divalent aşı kullanımını önermişlerdir. Bu çalışmada her ne kadar KKTC'deki bir işletmede buzağılarda oluşan ishalleri neden olan rotavirusun G ve P tiplendirme verileri sunulmuş ise de, belirlenen genotiplerin ve G/P genotip kombinasyonunun, buzağı ishallerinde sıklıkla saptanan G ve P genotipinde/genotip kombinasyonunda olması, tesadüfi bir bulgudan daha çok, KKTC'de buzağı ishallerinin en azından önemli bir kısmından sorumlu genotiplere işaret eden bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte bu değerlendirmenin teyide muhtaç olduğunu ve daha çok sayıda enfekte buzağıdan sağlanan materyal kullanılarak yapılan serolojik ve moleküler karakterizasyon çalışmalarına ihtiyaç duyduğunu da hatırlatmakta yarar bulunmaktadır.

Sonuç olarak, bir ön bildirim niteliğinde olan bu çalışmada, KKTC'de en azından G6P[11] genotipli rotavirusların varlığı saptanmıştır. Planlanan yeni çalışmalar kapsamında KKTC'de enfeksiyonun yaygınlığı, ekonomik kayıpların düzeyi, farklı yerleşim yeri ve işletme tiplerinde bulunan buzağılarda saptanan rotavirusların moleküler karakterizasyonuna ilişkin bilgilerin edinilmesi sonrasında, enfeksiyondan korunmak için aşı kullanımı ve ticari aşı tercihleri konusunda bir yaklaşımda bulunulması da mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Makoschey B, Klee W, Martella V, Bridger J, Smiths DG, Daugschies A, Millemann Y, Liebler-Tenorio E, Snodgrass D, Claerebout E, Bendali F, van de Ven J, Garcia A, Illek J, Kaske M, Cutler K, Gonzalez-Martin JV, Carvalho LM, Crouch C, Thiry E: Neonatal health in calves-comprehensive solutions for complex enteric disorders. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 122, 398-408, 2009.
2. Estes MK, Kapikian AZ: Rotaviruses. In, Knipe DM, Howley PM (Eds): *Field's Virology*. 1917-1974, Williams and Williams, Philadelphia, 2007.
3. Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Vanranst M: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*, 156, 1397-1413, 2011.
4. Alkan F, Timurkan MÖ, Karayel İ: Rotavirus diarrhea outbreaks in Arabian thoroughbred foals in a stud farm, Turkey. *Kafkas Vet Fak Derg*, 19 (Suppl-A), A141-A145, 2013.
5. Alkan F, Özkul A, Oğuzoğlu TC, Timurkan MÖ, Çalışkan E, Martella V, Burgu İ: Distribution of G (VP7) and P (VP4) Genotypes of Group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. *Vet Microbiol*, 141, 231-237, 2010.
6. Garaicoechea L, Bok K, Jones LR, Combessies G, Odeon A, Fernandez F, Parreno V: Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Vet Microbiol*, 118, 1-11, 2006.
7. Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A, Tollis M: Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. *J*

Clin Microbiol, 37, 3879-3882, 1999.

8. Fodha I, Boumaiza A, Chouikha A, Dewar J, Armah G, Geyer A, Trabelsi A, Steele AD: Detection of group A rotavirus strains circulating in calves in Tunisia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52 (1): 49-50, 2005.

9. Badaracco A, Garaicoechea L, Matthijnsens J, Louge Uriarte Odeon A, Bilbao G, Fernandez F, Parra GI, Parreno V: Phylogenetic analyses of typical bovine rotavirus genotypes G6, G10, P[5] and P[11] circulating in Argentinean beef and dairy herds. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 18-30, 2013.

10. Abe M, Ito N, Masatani T, Nakagawa K, Yamaoka S, Kanamaru Y, Suzuki H, Shibano K, Arashi Y, Sugiyama M: Whole genome characterisation of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. *J Gen Virol*, 92, 952-960, 2011.

11. Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MA, Leite JP, Richtzenhain LJ: G

and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Vet Microbiol*, 19, 167-73, 2004.

12. Iturriza-Gomara M, Wong C, Blome D, Desselberger U, Gray J: Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: Correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*, 76, 6596-6601, 2002.

13. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acids from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 28, 276-282, 1990.

14. Gouvea V, Ramirez C, Li B, Santos N, Saif L, Clark HF, Hoshino Y: Restriction endonuclease analysis of the Vp7 genes of human and animal rotaviruses. *J Clin Microbiol*, 31, 917-923, 1993.

15. Martella V, Pratelli A, Pinto O, Ferrara G, Tempesta M, Buonavoglia D: Typing by polymerase chain reaction of Buffalo rotaviruses isolated in Italy. *J Vet Med B*, 46, 499-502, 1999.