

Özer ATEŞ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2023



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI



**BUZAĞI İSHAL OLGULARINDA BOVİNE ROTAVİRUS (BRV)
VE BOVİNE CORONAVİRUS (BCoV) TESPİTİ VE
KARAKTERİZASYONU**

ÖZER ATEŞ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2023



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI



**BUZAĞI İSHAL OLGULARINDA BOVİNE ROTAVİRUS (BRV)
VE BOVİNE CORONAVİRUS (BCoV) TESPİTİ VE
KARAKTERİZASYONU**

ÖZER ATEŞ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ

**Bu tez çalışması Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
(BUÜ-BAP) tarafından DDP(V)-2020/12 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.**

BURSA-2023

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum ‘ Buzağı ishal olgularında bovine rotavirus ve bovine coronavirus tespiti ve karakterizasyonu’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Araş. Gör. Özer ATEŞ

23.07.2023

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

23/07/2023

Adı Soyadı: Özer ATEŞ

Anabilim Dalı: Veteriner Viroloji

Tez Konusu: Buzağı ishal olgularında Bovine rotavirus (BRV) ve Bovine coronavirus (BCoV) tespiti ve karakterizasyonu

| <u>ÖZELLİKLER</u> | <u>UYGUNDUR</u> | <u>UYGUN DEĞİLDİR</u> | <u>ACIKLAMA</u> |
|----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| Tezin Boyutları | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Dış Kapak Sayfası | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| İç Kapak Sayfası | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Kabul Onay Sayfası | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Sayfa Düzeni | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| İçindekiler Sayfası | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Yazı Karakteri | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Satır Aralıkları | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Başlıklar | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Sayfa Numaraları | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Eklerin Yerleştirilmesi | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Tabloların Yerleştirilmesi | ✓ | <input type="checkbox"/> | |
| Kaynaklar | ✓ | <input type="checkbox"/> | |

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ

İmza:

İÇİNDEKİLER

| | |
|-----------------------------------------------------|-------------|
| Dış Kapak | |
| İç Kapak | |
| ETİK BEYAN | II |
| KABUL ONAY SAYFASI | III |
| TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU | IV |
| İÇİNDEKİLER | V |
| TÜRKÇE ÖZET | VIII |
| İNGİLİZCE ÖZET | IX |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Bovine Rotavirus (BRV)..... | 4 |
| 2.1.1. Tarihçe..... | 4 |
| 2.1.2. Etiyoloji..... | 5 |
| 2.1.3. Epidemiyoloji..... | 10 |
| 2.1.4. Patogenez..... | 12 |
| 2.1.5. Klinik Bulgular..... | 12 |
| 2.1.6. Teşhis..... | 13 |
| 2.1.6.1. Direkt teşhis | 13 |
| 2.1.6.1. İndirekt teşhis | 14 |
| 2.1.7. Tedavi..... | 15 |
| 2.1.8. Koruma ve Kontrol..... | 15 |
| 2.2. Bovine Coronavirus (BCoV) | 17 |
| 2.2.1. Tarihçe..... | 17 |
| 2.2.2. Etiyoloji..... | 18 |
| 2.2.3. Epidemiyoloji..... | 21 |
| 2.2.4. Patogenez..... | 23 |
| 2.2.5. Klinik Bulgular..... | 23 |
| 2.2.6. Teşhis..... | 24 |
| 2.2.6.1. Direkt teşhis | 24 |
| 2.2.6.1. İndirekt teşhis | 26 |
| 2.2.7. Tedavi..... | 26 |
| 2.2.8. Koruma ve Kontrol..... | 26 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 29 |
| 3.1.1. Örneklenen Hayvanlar..... | 29 |
| 3.1.2. Dışkı Örnekleri..... | 29 |
| 3.1.3. Etik Kurul İzin Belgesi | 29 |
| 3.1.4. Hücre Kültürü..... | 30 |
| 3.1.5. Testlerde Kullanılan Kontrol Virusları | 30 |
| 3.1.6. Pankreatin Çözeltilisinin Hazırlanması | 31 |
| 3.1.7. Eritrosit Süspansiyonu..... | 32 |
| 3.1.8. Alsever's Solüsyonu..... | 32 |
| 3.1.9. Antijen-ELISA Kitleri..... | 33 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.10. Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti..... | 33 |
| 3.1.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentez Kiti..... | 33 |
| 3.1.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri..... | 34 |
| 3.1.13. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) Bileşenleri..... | 34 |
| 3.2. Yöntem..... | 35 |
| 3.2.1. Dışkı Örneklerinden İnokulum Hazırlanması..... | 35 |
| 3.2.2. Kontrol Viruslarının Üretimi..... | 35 |
| 3.2.2.1. BRV Suşlarının Üretimi..... | 35 |
| 3.2.2.2. BCoV Üretimi..... | 36 |
| 3.2.3. Konvansiyonel Virolojik Tanı Yöntemler..... | 37 |
| 3.2.3.1. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu..... | 37 |
| 3.2.3.1.1. HRT-18 Hücre Kültüründe Virus İzolasyon Çalışmaları..... | 37 |
| 3.2.3.1.2. MA-104 Hücre Kültüründe Virus İzolasyon Çalışmaları..... | 37 |
| 3.2.3.2. ELISA ile Antijen Tespiti..... | 38 |
| 3.2.3.3. Hemaglutinasyon Testi | 39 |
| 3.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri..... | 39 |
| 3.2.4.1. Nükleik Asit İzolasyonu..... | 39 |
| 3.2.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi..... | 39 |
| 3.2.4.3. BRV RT-PCR Protokolü..... | 40 |
| 3.2.4.4. BRV G ve P genotiplendirme RT-PCR Protokolü..... | 40 |
| 3.2.4.5. BCoV Nested PCR Protokolü..... | 42 |
| 3.2.4.6. Elektrofrez ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi..... | 43 |
| 3.2.4.7. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması..... | 43 |
| 3.2.4.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)..... | 44 |
| 3.2.4.8.1. Dışkı Örneklerinden RNA Ekstraksiyonu..... | 44 |
| 3.2.4.8.2. SDS-PAGE Protokolü..... | 44 |
| 3.2.4.8.3. Poliakrilamid Jelin Gümüş Nitrat ile Boyanması..... | 45 |
| 4. BULGULAR..... | 46 |
| 4.1. Konvansiyonel Virolojik Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular..... | 46 |
| 4.1.1. Kontrol viruslarının üretimi..... | 46 |
| 4.1.2. HRT-18 Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu Sonuçları..... | 46 |
| 4.1.3. MA-104 Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu Sonuçları..... | 47 |
| 4.1.4. ELISA ile BRV ve BCoV Antijen Tespiti Sonuçları..... | 48 |
| 4.1.5. Hemaglutinasyon Testi Sonuçları..... | 51 |
| 4.2. Moleküler Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular | 51 |
| 4.2.1. BRV RT-PCR Sonuçları..... | 53 |
| 4.2.2. BRV G ve P Genotiplendirme RT-PCR Sonuçları..... | 55 |
| 4.2.3. BRV G ve P Genotip kombinasyonlarının Sonuçları..... | 64 |
| 4.2.4. BCoV Nested-PCR Sonuçları | 65 |
| 4.2.5. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması..... | 67 |
| 4.2.5.1. BRV RT-PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç..... | 67 |
| 4.2.5.2. BCoV Nested PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç..... | 68 |
| 4.2.6. SDS-PAGE Sonuçları..... | 69 |
| 4.2.7. Antijen ELISA ve Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu Bulgularının Karşılaştırılması..... | 72 |
| 4.2.8. BRV Antijen ELISA Bulgularının BRV RT-PCR Ve SDS-PAGE Bulguları İle Karşılaştırılması..... | 73 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.9. BCoV Antijen ELISA Testi İle Elde Edilen Bulguların BCoV Nested-PCR Bulguları İle Karşılaştırılması..... | 73 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 75 |
| 5.1. Konvansiyonel Virolojik Yöntemlere Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi..... | 76 |
| 5.2. Moleküler Yöntemlere Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi..... | 85 |
| 5.3. Sonuç..... | 89 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 91 |
| 7. SİMGELER VE KISALTMALAR..... | 107 |
| 8. EKLER..... | 109 |
| 9. TEŞEKKÜR..... | 110 |
| 10. ÖZGEÇMİŞ..... | 111 |

TÜRKÇE ÖZET

Neonatal döneminde en önemli mortalite sebebi olan buzağı ishalleri birçok faktöre bağlı olarak gelişmekte ve büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Türkiye’ de bugüne kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, BRV ve BCoV’ un yeni doğan buzağılarda önemli oranda ishal olgularına neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada Türkiye’ nin farklı illerinden toplanan dışkı örneklerinde BRV ve BCoV’ un rolü tespit edilmek istenmiştir. Projede kapsamında toplanan ve ishal semptomu gösteren bir aylık ve daha küçük yaştaki toplam 213 dışkı örneğinden 69 adedi (% 32,39) BRV yönünden ve 17 adedi (%7,98) BCoV yönünden pozitif bulundu (Tablo 4.2). Örneklerinin 82 adedinde (% 38,5) araştırılan viruslardan en az birisi (BRV ve/veya BCoV) tespit edilirken, 65 (%30,52) adet dışkı örneğinde tek BRV, 13 (%6,10) adet dışkı örneğinde tek BCoV ve 4 (%1,88) adet dışkı örneğinde BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu saptandı. Hücre kültüründe virus izolasyon çalışması sonucu MA-104 hücre hatında 2 adet (RV-36, RV-38) saha izolatı başarılı bir şekilde izole edildi. BRV antijen ELISA kiti ile pozitif tespit edilen 69 adet dışkı örneğinin 54 adedi RT-PCR yöntemi ile BRV yönünden pozitif olarak saptandı. BCoV antijen ELISA kiti ile pozitif tespit edilen 17 adet dışkı örneğinin 14 adedi Nested-PCR yöntemi ile BCoV yönünden pozitif olarak tespit edildi. 69 adet dışkı örneğine uygulanan G genotiplendirme RT-PCR sonuçlarına göre, G6 genotipinin tespit edilmesi amaçlanan genotipler arasında daha yüksek olmasına karşın belirgin olarak baskın bir genotip olmadığı tespit edildi. Ayrıca RT-PCR uygulamaları sonucu tespit edilmesi hedeflenen P genotipleri arasında da baskın bir genotipin bulunmadığı, P[5] ve P[11] genotiplerinin birbirine yakın düzeylerde görüldüğü saptandı. Tespit edilen BRV genotip kombinasyonları sonucu baskın olan genotipin G10P[11] olduğu belirlendi. Çalışmada 69 adet dışkı örneğindeki BRV segmentlerinin poliakrilamid jel üzerinde 4/2/3/2 şeklinde sıralandığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, Ag ELISA ve PCR ile BRV yönünden pozitif tespit edilen örneklerin, SDS-PAGE testi ile bant profillerine göre grup A’da olduğunu göstermektedir. Türkiye’ nin farklı illerinden yapılmış örnekleme çalışması sonrası elde edilen veriler doğrultusunda neonatal buzağı ishallerine sebep olabilen önemli viral etkenlerden BRV ve BCoV’ un yaygınlığı tespit edilmiştir ve işletmelerde kayıplara neden olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Neonatal buzağı ishalleri, BRV, BCoV, Virus izolasyonu, ELISA, PCR, Genotiplendirme, PAGE

İNGİLİZCE ÖZET

Detection and characterization of Bovine Rotavirus (BRV) and Bovine Coronavirus (BCoV) in calf diarrhea cases

Calf diarrhea, which is the most important cause of mortality in the neonatal period, develops due to many factors and causes great economic losses. In epidemiological studies conducted in Turkey to date, it has been shown that BRV and BCoV cause diarrhea in newborn calves at a significant rate. In this study, it was aimed to determine the role of BRV and BCoV in stool samples collected from different provinces of Turkey. Out of 213 stool samples, one month old and younger, collected within the scope of the project and showing diarrhea symptoms, 69 (32.39%) were found to be positive for BRV and 17 (7.98%) for BCoV. At least one of the investigated viruses (BRV and/or BCoV) was detected in 82 (38.5%) of the samples, 65 (30.52%) stool samples had single BRV, 13 (6.10%) stool samples had single BCoV and BRV and BCoV dual infection was detected in 4 (1.88%) stool samples. As a result of the virus isolation study in cell culture, 2 (RV-36, RV-38) field isolates were successfully isolated from the MA-104 cell line. Fifty-four of 69 stool samples, which were detected positive with the BRV antigen ELISA kit, 54 were found to be positive for BRV by the RT-PCR method. Of the 17 stool samples that were detected positive with the BCoV antigen ELISA kit, 14 were detected as positive for BCoV by the Nested-PCR method. According to the G genotyping RT-PCR results applied to 69 stool samples, it was determined that although the G6 genotype was higher among the genotypes intended to be detected, it was not clearly a dominant genotype. In addition, it was determined that there was no dominant genotype among the P genotypes targeted to be detected as a result of RT-PCR applications, and P[5] and P[11] genotypes were observed at close levels. It was determined that the dominant genotype among the BRV genotyped samples was G10P[11]. In the study, it was shown that BRV segments in 69 stool samples were arranged as 4/2/3/2 on polyacrylamide gel. These results show that the samples detected positive for BRV by Ag ELISA and PCR are in group A according to the band profiles by SDS-PAGE test. The prevalence of BRV and BCoV, which are important viral agents that can cause neonatal calf diarrhea, has been determined in line with the data obtained after the sampling study conducted from different provinces of Turkey and it has been shown that they can cause losses in the enterprises.

Keywords: Neonatal calf diarrhea, BRV, BCoV, Virus isolation, ELISA, PCR, Genotyping, PAGE

1. GİRİŞ

Neonatal buzağı ishalleri dünyada hayvancılık sektöründe büyük ekonomik kayıplara sebep olan, buzağı yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından biridir. Neonatal dönemde en önemli mortalite sebebi olan ishaller, doğumdan sonra 1-10 gün aralığında en sık görülmekle birlikte genel olarak yaşamın ilk 30 günündeki buzağılarda etkili olmaktadır (Ammar ve ark., 2014; Elitok & Elitok, 2016; Murphy, Gibbs, & Horzinek, 1999; Shi ve ark., 2020). Erişkin sığırlarda rotavirus ve coronavirus enfeksiyonları genellikle subklinik seyreder ve bu hayvanlar etkenin yeni doğan buzağılara bulaşmasında önemli rol oynamaktadırlar. Anneden yavruya antikor (Ab) geçişi olmamış ve hastalıklara karşı savunma mekanizması iyi gelişmemiş buzağılar kolostrum alana kadar hastalık etkenlerine karşı savunmasızdır (Reber, Lockwood, Hippen, & Hurley, 2006). Fekal-oral yolla bulaşan bu virusların enfeksiyon sırasında meydana getirdiği klinik tablo çok benzerdir. Ateş, halsizlik, dehidrasyon ve sıvı elektrolit kaybı sonucu her iki enfeksiyonda da hipovolemik şok veya ölüm şekillenebilir ya da sekonder etkenler sonucu mortalite artışı saptanabilmektedir (Burgu, Akça, Alkan, Özkul, & Karaoğlu, 1995; Çabalar, Kaya, & Arslan, 2007; Murphy ve ark., 1999).

Buzağı ishalleri enfeksiyöz ya da non-enfeksiyöz faktörlere bağlı olarak gelişebilmektedir. Neonatal dönemde özellikle enfeksiyöz orijinli (bakteriyel, viral ve paraziter) ishaller ön plana çıkmakta ve bu dönemde *E. coli*, *Cryptosporidium*, Rotavirus ve Coronavirusların neden olduğu ishaller sıklıkla rastlanıldığı bildirilmektedir (Aich ve ark., 2007; Garaicoechea ve ark., 2006). Bu mikroorganizmalar dışında yüzdesel olarak dağılımda sıklıkla listenin üst sırasında yer alan ya da ağırlıklı olarak enfeksiyon oluşumuna sebep olan viral etkenler arasında Parvovirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Torovirus, Enterovirus, Bovine viral diarrhea virus; bakteriyel etkenler olarak *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Chlamydia* spp; paraziter etkenler olarak ise *Coccidia*, ve *Giardia* sayılabilir (Cho & Yoon, 2014; Lee, Kim, Choi, & Kim, 2019; Woode & Bridger, 1978; Zhu ve ark., 2014). Non-infeksiyöz sebeplere bağlı olarak gelişen ishaller ise alimenter faktörler, hazırlayıcı faktörler ve çevresel faktörleri kapsamaktadır (Ammar ve ark., 2014; Mayameei, Mohammadi, Yavari, Afshari, & Omid, 2010).

İshaller, tedavi ve profilaksi için yapılan masraflar, iş gücü, düşük performansla bağlı olarak gelişme geriliği ve ölümlere sebep olmasından dolayı süt sığırcılığında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Olumsuz çevresel faktörler, zayıf immünite ve enfeksiyöz etkenler buzağı ishallerinin gelişmesine katkı sağlar. Yapılan çalışmalar ile beslenme ve bakım şartlarının en iyi düzeyde sağlanması durumunda dahi hastalığın şekillendiği, doğumlarından sonraki ilk saatlerinde en az 2,25 L kolostrum almış, dezenfekte edilmiş ve kontamine olmayan bölmelerde barındırılan ve ilave zengin yem alan, çok iyi bakım ve beslenme koşullarına sahip buzağılarda bile yıllık kayıp oranının %4'ten fazla olduğu bildirilmiştir (Greene, 1983; Reber ve ark., 2006). Buzağuların bulunduğu bölge ve barındıkları ahırlardaki bakım, besleme ve profilaksi şartlarına bağlı olarak rotavirus ve coronavirusların buzağı ishallerindeki rolünün %50-80 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Aich ve ark., 2007; Athanassios ve ark., 1994). Türkiye'de yıllık 6 milyon buzağının doğduğu ve bunlardaki kayıplarının en az %15 olduğu değerlendirildiğinde, yıllık 450 milyon Euro'luk bir ekonomik kayıp söz konusu olmaktadır (Şahal, Terzi, Ceylan, & Kara, 2018).

Rotavirus ve coronavirus enfeksiyonlarının teşhisi dışkıda virusun ya da virusa ait viral antijenlerin varlığının saptanması esasına dayanmaktadır. Bu tür enfeksiyonların güvenilir ve kesin tanısı hem enfeksiyonların izlenmesi hem de alınacak kontrol önlemlerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Her iki virusun tanısında kullanılmak üzere ticari olarak üretilen ve saha şartlarında kolay uygulanabilen hızlı test kitleri bulunmaktadır. Enterik virusların laboratuvar şartlarında tanısında test süresi, duyarlılık ve özgünlük açısından farklılıkları olan hücre kültüründe virus izolasyonu, elektron mikroskopi (EM) ve Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ve virus hemaglutinasyon testi gibi konvansiyonel yöntemler veya PCR ve SDS-PAGE gibi moleküler testler kullanılmaktadır. Rutinde teşhis çalışmalarında etkene spesifik antijenlerin tespitine dayanan ELISA tekniği, ardından hücre kültüründe virus izolasyonu ve PCR gibi moleküler yöntemlerle etkenin identifikasyonu yapılmaktadır (Alkan ve ark., 2010; Alkan, Pulat, Yazıcı, & Burgu, 1992; Bohl, Theil, & Saif, 1984; Burgu ve ark., 1995; Ennima ve ark., 2016; Hasoksuz, Kayar, Dodurka, & Ilgaz, 2005; Saklı, Bulut, Hasoksuz, & Hadımlı, 2017).

Buzağı ishallerinin koruma ve kontrol çalışmalarında doğru zamanda aşılama önemli bir yer tutmaktadır (Godden, 2008). Bu bağlamda E. coli, coronavirus,

rotavirus suşlarının içeren polivalan aşılar kullanılmaktadır (R.W. Fulton, Ridpath, & Burge, 2013). Aşılar gebe hayvanlara gebeliğin son döneminde iki kez uygulanarak, doğumdan sonra buzağuların kolostrum ile maternal antikoları alması sağlanmakta ve buzağularda ishal oluşumunda rol oynayan etkenlere karşı bağışıklık oluşturulmaya çalışılmaktadır (Fulton ve ark., 2013; Kim, Nielsen, Hodgins, Chang, & Saif, 2002).

Bu doktora tez çalışmasında Bursa'da ve Türkiye'nin birçok bölgelerinde (Adıyaman, Çanakkale, Konya, Balıkesir, Kırklareli, Bilecik, Ankara ve Edirne) ishal semptomu gösteren buzağılardan sağlanan dışkı örneklerinde,

- BRV ve BCoV etkenlerinin konvansiyonel virolojik yöntemler ve moleküler teşhis yöntemlerinden olan PCR ve SDS-PAGE metodu ile saptanması,
- BRV ve BCoV etkenlerinin moleküler düzeyde tiplendirme çalışmaları yapılarak çeşitlilik ve genetik yakınlığının belirlenmesi,
- Virus izolasyonu yapılarak saha izolatlarının elde edilmesi,
- Virus izolasyonu, antijen ELISA, PCR ve SDS-PAGE sonuçları arasındaki uyumluluğun karşılaştırılması,
- Elde edilen veriler ışığında buzağılarda ishale sebep olan BRV ve BCoV'ların ülkemizdeki durumuyla ilgili olarak güncel verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

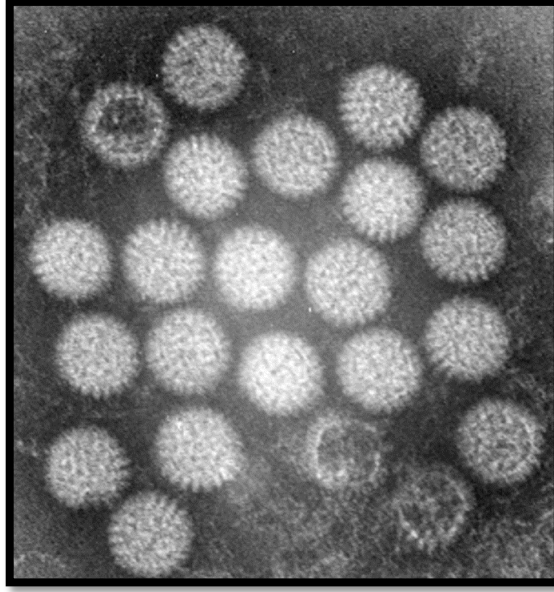
2. GENEL BİLGİLER

Neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde en sık karşılaşılan viral etkenler Bovine rotavirus (BRV) ve Bovine coronavirus (BCoV)' dur. Söz konusu virusların buzağılarda ishal olgularındaki rolleriyle ilgili genel bilgiler aşağıda sunulmuştur.

2.1. Bovine Rotavirus (BRV)

2.1.1. Tarihçe

Rotaviruslar, dünyada ilk kez 1943 yılında bir ishal salgını sırasında, çocukların dışkı örneklerinde filtrelerden geçebilen bir etkenin izole edilmesi sonucu bildirilmiştir (Light & Hodes, 1943). Yapılan bir çalışmada Bovine rotaviruslar, ishalleri buzağılardan alınan dışkı örneklerinin deneysel olarak kolostrom almayan buzağılara verilmesiyle ilk kez buzağıların ishal etkeni olarak tanımlanmıştır (Mebus, Underdahl, Rhodes, & Twiehaus, 1969). Akut gastroenteritli çocuklarda elektron mikroskobu (EM) ile tespit edilen virusun, ishal semptomu gösteren buzağılarda tespit edilen virus ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Bishop, Davidson, Holmes, & Ruck, 1973; Mebus ve ark., 1969). Tespit edilen virusun (şekil 2.1) EM ile incelenmesi sonucunda morfolojik olarak tekerleğe benzediği için latince tekerlek anlamına gelen 'rota' kelimesi ile adlandırılmıştır (Flewett ve ark., 1974).



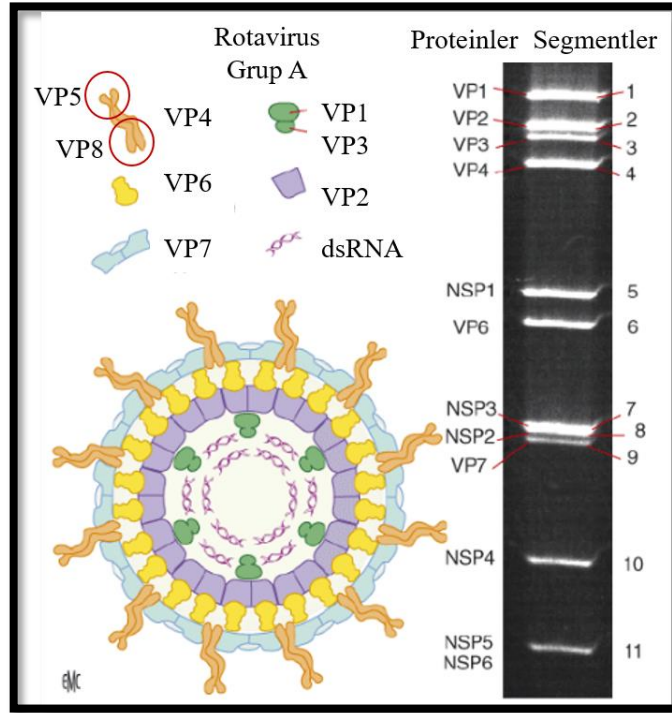
Şekil 2.1. Rotavirusların elektron mikroskop (EM) görüntüsü (Rougemont & Pothier, 2009)

İnsan ve hayvanlarda tespit edilen rotavirusların çeşitli hücre hatlarında (MDBK, MA-104, HeLa ve PK-15) izolasyonu başarıyla yapılmıştır (Allan, Todd, & Ireland, 1979; McNulty, Allan, & McFerran, 1977; Urasawa, Urasawa, & Taniguchi, 1981). Bu süreçte vasat içerisine tripsin ilave ederek MDBK hücre kültürüne virusun adaptasyonu sağlanmıştır (McNulty ve ark., 1977). Virus Afrika yeşil maymun böbrek (MA-104) hücrelerine adapte edilmiş ve ishali buzağuların dışkı örneklerinden hazırlanan inokulumların tripsin ile muamele edilmesi sonrası MA-104 hücre kültürüne inokulasyonu yapılarak, hücre kültürü üzerinde meydana gelen morfolojik değişimler tespit edilmiştir (Matsuno, Inouye, & Kono, 1977; Ojeh, Snodgrass, & Herrinh, 1984).Yapılan farklı bir çalışmada ishali domuz yavrularından elde edilen dışkı örneklerinden rotavirus izolasyonu amacıyla hücre kültürü olarak MA-104 hücre hattı ve pankreatin enzimi kullanılmış olup elde edilen başarılı sonuçlar doğrultusunda MA-104 hücre kültürü ve proteolitik olarak pankreatin enziminin rotavirus izolasyonunda uygun olduğu bildirilmiştir (Bohl ve ark., 1984).

2.1.2. Etiyoloji

Bovine rotaviruslar *Resentoviricetes* sınıfında, *Reovirales* dizininde, *Sedoreoviridae* ailesinde ve *Rotavirus* cinsinde yer almaktadır (ICTV, 2023a).

Elektron mikroskobu ile tekerlek benzeri olarak tanımlanan rotaviruslar zarfsız, ve kübik simetridir. Virion çapı ortalama 65-75 nm olan virusun yapısında dış kapsid, iç kapsid ve kor bölgesinden oluşan üç tabakalı kapsid (triple-layered particle; TLP) bulunur. mRNA üretimi için gerekli enzimler viral kapsitte yer almaktadır. Yapısında bulunan RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi ile RNA rotavirus genomlarının mRNA'ya transkripsiyonu sağlanır (Matsui ve ark., 1989).

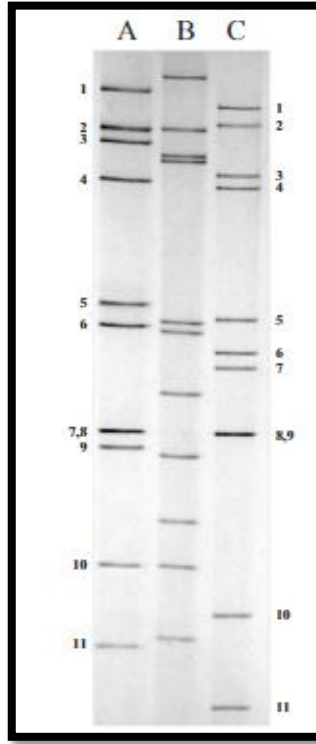


Şekil 2.2. Rotavirusun virion yapısı ve 11 segmentli viral genomun poliakrilamid jel üzerinde gösterilmesi (Rougemont & Pothier, 2009)

Rotavirusların genomu pozitif (+) polariteli, 11 segmentli ve çift iplikçikli (ds) RNA yapısındadır (Matson ve ark, 1990). Rotavirusların segmentli bir RNA'ya sahip olması nedeniyle genom üzerinde rekombinasyonun bir çeşidi olan reassortment olayına sıklıkla rastlanır. RNA segmentleri, SDS-PAGE yöntemi ile poliakrilamid jel üzerinde bant konumuna göre 1' den 11' e kadar numaralandırılmıştır (Şekil 2.2.) (Estes&Cohen,1989).

Virusun genomu 18,500 bp uzunluktadır. Yapısında bulunan 11 segmentin büyüklüğü yaklaşık 667 bp' den, 3302 bp' a kadar değişmektedir (Desselberger, 2014). Segmentler bant profillerine göre türler arasında bir takım varyasyonlar sergilemekte

olup ve SDS-PAGE yöntemi ile dört segment grubuna ayrılmıştır. Poliakrilamid jel üzerinde segmentler 4 adet geniş, 2 adet orta, 3 adet küçük ve 2 adet daha küçük segment grubu olacak şekilde gösterilmiştir (House, 1978). Sığır rotaviruslarının bulunduğu Rotavirus A, B ve C gruplarında segmentlerin bant profillerine göre gruplanması 4/2/3/2 (Rotavirus grup A), 4/2/2/3 (Rotavirus grup B) ve 4/3/2/2 (Rotavirus grup C) şeklindedir (Şekil 3.) (Barman ve ark., 2004; Rahman ve ark., 2005).



Şekil 3. Rotavirus grup A, B ve C' nin poliakrilamid jel üzerinde bant profilleri (Barman ve ark., 2004; Rahman ve ark., 2005)

Rotavirus genomu 6 adet yapısal (VP1-4, VP6, VP7) ve 6 adet yapısal olmayan (NSP 1-6) toplam 12 adet protein kodlamaktadır (Ramig, 2004). İlk 10 segment monosistronik olup tek bir protein kodlarken, 11. segment polisistronik karakterdedir ve 2 adet yapısal olmayan proteinin kodlanmasından sorumludur (Şekil 2.) (Desselberger, 2014; Rainsford & McCrae, 2007; Ramig, 2004). Rotavirusların 11 segmentinden kodlanan proteinlerle ilgili bilgiler Tablo 1' de yer almaktadır. Rotaviruslar VP6 gen bölgesine göre farklı türlere ayrılmakta olup; VP4 ve VP7 gen bölgelerindeki farklılıklara göre de sırasıyla genotip P ve genotip G olarak

isimlendirilmektedir. Ayrıca yapısal olmayan proteinlerinden NSP4 gen bölgesi, buzağılarda şekillenen ishali patogenezinde önem arz etmektedir (Ball, Tian, Zeng, Morris, & Estes, 1996).

Tablo 2.1. Rotavirus genom segmentlerinden kodlanan proteinlerin özellikleri (Desselberger, 2014; Geletu, Usmael, & Bari, 2021)

| RNA Segment Numarası | Büyüklik (bp) | Protein | Moleküler Ağırlık (kDal) | Protein Lokasyonu/Özelliği | Fonksiyon |
|----------------------|---------------|------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 3302 | VP1 | 125 | Kor Bölgesi | RNA Bağımlı RNA polimeraz |
| 2 | 2690 | VP2 | 102 | Kor Bölgesi | Replikaz aktivasyonu |
| 3 | 2591 | VP3 | 88 | Kor Bölgesi | Metiltransferaz ve Guaniltransferaz işlevi |
| 4 | 2362 | VP4 | 87 | Dış kapsid | Yapısal protein, adsorbsiyon, penetrasyon, hemaglutinasyon, nötralizasyon ve virulens. |
| 5 | 1611 | NSP1 | 59 | Yapısal olmayan | İnterferon antagonisti, E3 ligaz aktivitesi |
| 6 | 1356 | VP6 | 45 | İç kapsid | Grup spesifik antijen ve transkripsiyon |
| 7 | 1104 | NSP3 | 37 | Yapısal olmayan | Viral mRNA aktivitesini artırmak ve hücrel protein sentezini durdurmak |
| 8 | 1059 | NSP2 | 35 | Yapısal olmayan | RNA paketlenmesi sırasında NTPaz görevi |
| 9 | 1062 | VP7 | 34 | Dış kapsid | Yapısal protein, nötralizasyon |
| 10 | 751 | NSP4 | 20 | Yapısal olmayan | Hücre içi Ca ⁺² düzenleyici, RNA replikasyonu, enterotoksin ve virulens faktörü |
| 11 | 667 | NSP5, NSP6 | 22 | Yapısal olmayan | RNA'ya bağlanma, kinaz aktivitesi, viroplazmanın oluşumunda görevli |

Virusun yapısal proteinlerinden olan VP6, genomda 6. segment tarafından kodlanır (Tablo 2.1). Virusun kor bölgesinde bulunan ve iç kapsidi oluşturan VP6, transkripsiyonda görevlidir ve immunojenik özelliğe sahiptir (Estes & Cohen, 1989; Trask, McDonald, & Patton, 2012). Rotaviruslar VP6 gen bölgesinin genetik ve antijenik özellikleri dikkate alınarak, farklı konaklarda enfeksiyon oluşturan on gruba (tür) (A-J) ayrılmıştır (Elkady ve ark., 2021). Buzağı ishallerinde rotavirus A grubu ön planda yer almakla birlikte, B ve C grubu rotaviruslar da sığırlarda spontan olarak enfeksiyona neden olmaktadır (Tablo 2.2) (Otto ve ark., 2015).

Tablo 2.2. Farklı rotavirus türlerinin enfekte ettiği konakçı türleri (Geletu ve ark., 2021)

| Rotavirus grup / tür | Konakçı türleri |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| A | Çok çeşitli memeli ve kuş türleri |
| B | İnsan, sığır, koyun, keçi, domuz ve kemirgenler |
| C | İnsan, sığır, keçi, köpek, domuz ve gelincik |
| D | Tavuk, hindi |
| E | Domuz |
| F | Tavuk |
| G | Tavuk |
| H | İnsan ve domuz |

Rotavirusların 9. segmentinden kodlanan VP7 proteini yüzey proteini olması sebebiyle nötralizasyonda önemli bir role sahiptir (Settembre, Chen, Dormitzer, Grigorieff, & Harrison, 2011). Glikoprotein yapısında olan ve kuvvetli bir immunojenik özelliğe sahip olan VP7 glikoproteini ayrıca virusun hücreye penetrasyonunda VP5' e yardımcı olmaktadır (Hoshino, Saif, Sereno, Chanock, & Kapikian, 1988). Replikasyon işlemi, VP6 proteinin virion içinde paketlenmesini sağlar (Settembre ve ark., 2011). Virusun morfolojik yapısında dış kapsidin büyük bir bölümünü oluşturan VP7 proteini, spesifik antikor oluşumunu uyarmaktadır (J. C. Bridger, Hall, & Parsons, 1992; Matsuno & Inouye, 1983).

VP4 proteini 4. segment tarafından kodlanır ve virusun hücre adsorbsiyonu ve penetrasyonunda görev alır. Aynı zamanda hemaglutinasyon özelliği, nötralizasyon ve virulens gibi fonksiyonları bulunur (Isa, López, Segovia, & Arias, 1997). Rotavirusun hücre kültüründe izolasyonunda oldukça önemli bir proteindir. Virusun proteolitik enzimler ile muamelesi sonucu gerçekleşen proteolizis ile VP5 ve VP8' e ayrılmaktadır (Crawford ve ark., 2001). VP8 proteini adsorbsiyonda görev alırken, VP5 proteini ise viral genomun hücreye aktarılmasında görev alır (Isa ve ark., 1997). Rotavirusların hücreye penetrasyonu sialik asit reseptörleri ve integrinleri kapsayan kompleks bir olaydır. Penetrasyonda VP8 sialik asitlerle, VP5 ise integrinlerle ilişkilidir (Dormitzer, Sun, Wagner, & Harrison, 2002; Zhang, Li, Liu, & Pan, 2007).

Virusun yapısal olmayan proteinlerinden biri olan NSP4, genomda 10. segment tarafından kodlanmaktadır. NSP4 hastalık tablosundaki ishal patogenezinde önemlidir. Viral enterotoksin özelliğinde olup meydana gelen ishalin şiddetini de artırmaktadır (Ball ve ark., 1996). Hücre membranının morfolojisini ve hücreler arası bağlantıları bozarak intrasellüler kalsiyum seviyesini artırır (Rodriguez-Díaz ve ark., 2003).

NSP4' ün bazı prostaglandin ve sitokinleri uyarması sonucu bağırsak sinir sistemini aktif hale gelir ve sıvı sekresyonunu artırır (Ge ve ark., 2013; Settembre ve ark., 2011).

Rotavirusların segmentli yapısından dolayı genom üzerinde meydana gelen reassortment ile ortaya çıkan çok sayıda genotipi bulunmaktadır (Estes & Cohen, 1989). Tespit edilen genotiplerin bir örnek olarak adlandırılması amacıyla 2010 yılında Rotavirus Klasifikasyon Çalışma Komitesi (Rotavirus Classification Working Group-RCWG) kurulmuştur. Komite tarafından, bilimsel olarak tespit edilen ve yayınlanan genotipler değerlendirilmekte ve incelenmektedir. Rotavirus klasifikasyon çalışma komitesi VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 gen bölgeleri için sırasıyla genotiplerin Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx olarak adlandırılmasını uygun bulunmuştur (Matthijnsens ve ark., 2011). Rotavirus suşları genel olarak dış kapsid proteinlerinden olan VP7 (glikoprotein, G) ve VP4 (proteaza duyarlı protein, P) gen bölgeleri kullanılarak tiplendirilmektedir (Matthijnsens ve ark., 2012). Virusun viral proteinleri kodlayan gen bölgelerindeki varyasyonlar göz önünden bulundurulmuş, G ve P genotipleri rotavirusun başlıca genotiplerini oluşturur. Genotip tespitinde VP7, G genotipini temsil eder ve dış kapsidin büyük bir kısmını oluşturur. P genotipini temsil eden VP4 ise proteaza duyarlı protein olarak tanımlanır. Her iki yapısal protein (VP4 ve VP7) nötralizan antikor oluşumuna etki ettiği için aşı geliştirme çalışmaları ve saha prevalans çalışmalarında oldukça önemlidir (da Silva Medeiros, Lorenzetti, Alfieri, & Alfieri, 2019; Estes & Cohen, 1989; Matthijnsens ve ark., 2012). Genel olarak rotaviruslar 42 farklı G genotipi (G1-G42) ve 58 farklı P genotipine (P[1]-P[58]) sahiptir (Park ve ark., 2022).

2.1.3. Epidemiyoloji

Rotavirus enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olup hastalık etkeni geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir. Neonatal buzağı ishalleri, sığır yetiştiriciliği yapılan tüm işletmeler için oldukça önemli sağlık problemlerinden biridir ve buzağı ölümleri nedeniyle ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Rotavirus enfeksiyonları insan, birçok memeli hayvan türü ve kanatlı hayvanlarda görülmektedir (Garaicoechea ve ark., 2006). Erişkin bireylerde subklinik seyredirken yenidoğan canlılarda ishal ile seyreden hastalıklara neden olmaktadır (Murphy ve ark., 1999). Sığırcılık

işletmelerinde doğumu takiben 0-28. günleri kapsayan neonatal dönem, BRV enfeksiyonunun görülmesi ve işletme ekonomisini etkilemesi açısından en kritik dönemlerden biridir (Bridger & Pocock, 1986). Hastalıklara karşı savunma mekanizması gelişmemiş ve kolostrum almamış buzağılarda, bakım ve besleme şartları iyi düzeyde olsa dahi neonatal ishal nedeni kayıplar yaşanabilmektedir. Türkiye'de yılda yaklaşık 6 milyon buzağının doğduğu ve neonatal dönemde en az %15 oranında kayıp yaşandığı ön görülmektedir (Şahal ve ark., 2018).

Rotaviruslar duyarlı bireyler arasında başlıca fekal-oral yolla bulaşır. Erişkin hayvanlar yenidoğan buzağılara rotavirusun bulaşmasında rol oynamaktadır (Çabalar ve ark., 2007; Goto, Kurogi, Inaba, & Matumoto, 1986; Yazıcı & Akça, 1993). Rotavirusların çevresel koşullara oldukça dayanıklı olması nedeniyle BRV ile enfekte ishalleri buzağuların dışkıları çevresel kontaminasyon için risk oluşturmaktadır. Ayrıca rotavirusların suda uzun süre canlı kalabilmesi nedeniyle, su kaynakları hastalığın epidemiyolojisinde rol oynamaktadır (Murphy ve ark., 1999). Rotavirus enfeksiyonlarının şiddetini ve seyrini etkileyen faktörler arasında buzağuların kolostrum alıp almadıkları, süttten kesilme zamanları, annelerinin aşı durumu ve diğer enteropatojenik ajanlar yer almaktadır (Le Rousic, Klein, Houghton, & Charleston, 2000; Snodgrass, Fahey, Wells, Campbell, & Whitelaw, 1980). Koruyucu veteriner hekimlik hizmetlerinin uygulandığı çiftliklerde dahi her yaştaki buzağular rotavirus enfeksiyonundan etkilenebilir ve özellikle 1 yaşın altındaki buzağılarda daha yaygın olarak görülmektedir (Mee, Berry, & Cromie, 2008). Ayrıca insanlarda ve hayvanlarda görülen rotavirus enfeksiyonların yaygınlığı mevsimsel ve iklimsel olarak farklılıklar göstermektedir (Çabalar ve ark., 2007; Yazıcı & Akça, 1993).

Rotavirusların enfekte ettiği konakçı türlerinde yaygın olarak görülen G ve P genotipleri Tablo 2.3' de yer almaktadır. Dünya da yapılan çeşitli epidemiyoloji çalışmalarında VP7 gen bölgesine göre G6 ve G10 genotipleri sığır popülasyonlarında yaygın olarak saptanırken, G1-G3, G5, G8, G11, G15, G17, G21 ve G24 genotipleri daha az yaygınlıkta tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda VP4 gen bölgesi için P[5] ve P[11] genotipleri sıklıkla gözlenmesine rağmen, P[1], P[3], P[6], P[7], P[14], P[17], P[21], P[29] ve P[38] de daha az sıklıkla bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2010; Cheng ve ark., 2021; Papp ve ark., 2013). Saha çalışmaları sırasında tespit edilen sığır rotavirus genotiplerinin büyük çoğunluğu G6, G10 iken daha düşük oranda G8 olarak

tespit edilmiştir. Bu genotipler genellikle P[5], P[11] ve daha az sıklıkla P[1] ile ilişkilendirilmiştir (Badaracco ve ark., 2012).

Tablo 2.3. Rotavirusların enfekte ettiği konakçı türlerinde yaygın olarak görülen G ve P genotipleri (Geletu ve ark., 2021)

| Konakçı türleri | VP7 ve VP4 genotipleri |
|-----------------|-----------------------------------|
| Siğir | G6, G8, G10 ve P[1], P[5], P[11] |
| Domuz | G3-5, G9, G11 ve P[6], P[7] |
| At | G3, G14 ve P[12] |
| Kedi ve köpek | G3 ve P[3], P[9] |
| İnsan | G1-4, G9, G12 ve P[4], P[6], P[8] |

2.1.4. Patogenez

Rotaviruslar buzağılara oral yolla bulaştıktan sonra bağırsakta bulunan enterositlere yerleşirler ve virusun replikasyonu sonucu enterositlerde hasar meydana gelir. Yıkıma uğrayan enterositler bağırsak lümenine dökülür (Mebus, Stair, Underdahl, & Twiehaus, 1971). Bunun sonucunda da villuslardaki hasarlı hücrelerin yerini adsorbsiyon yeteneği olmayan, olgunlaşmamış ve sodyum-potasyum aktivitesinden yoksun farklılaşmamış epitel hücreleri alır (Argenzio, 1985). Su adsorbsiyon metabolizmasının bozulması sonucu bağırsak lümeninde emilmeden kalan su nedeniyle sıvı kıvamında bir ishale sebep olur (Ramig, 2004). Villusların etkilenmesi sonucu bağırsak lümeninde laktaz enziminin miktarı azalır ve glikoza bağlı sodyum (Na) taşınması durur. Laktaz enziminin seviyesindeki azalma, bağırsak lümeninde bakteriyel üremeyi artırarak, ishalin şiddetinin artmasına neden olur (G. A. Hall, Bridger, Parsons, & Cook, 1993).

2.1.5. Klinik Bulgular

Rotavirus enfeksiyonları klinik belirtileri bakımından tüm türlerde benzer semptomlara sahiptir (House, 1978). Hayvanlarda bulaşmayı takiben birkaç gün süren inkübasyon periyodu sonrası dışkılarından yüksek miktarda virus saçılmaktadır. Enfeksiyon sonrası 3. ve 4. günlerde virus saçılımı en üst seviyeye ulaşır. Buzağılarda zayıflama, dehidrasyon, sulu kıvamda ve sarı renkte dışkı ile karakterize klinik

semptomlar oluşmaktadır. Bulaşma sonrası buzağılarda ateş ve akut ishal gelişir. İshalin şiddeti zamana bağlı olarak artmakta ve ortalama bir hafta sürmektedir (Izzo ve ark., 2012). Şiddetli dehidrasyona bağlı olarak gelişen elektrolit kaybı, metabolik asidoz ve hipovolemik şok hastalıkta meydana gelen klinik semptomlar arasında yer almaktadır (Mebus ve ark., 1971; Theil, Saif, Moorhead, & Whitmoyer, 1985). Genç hayvanlarda immun yetersizlik, kolostrum alımında başarısızlık ve sekonder ajanlar hastalığın şiddetinin artmasına neden olan faktörlerdir (Ramig, 2004). İshale sebep olan diğer enteropatojenler ile ortak bir enfeksiyon durumu yoksa, hastalığın klinik semptomları 2-4 güne kadar gerilemekte, fakat 5-7 gün boyunca dışkı ile virus saçılması devam etmektedir (Murphy ve ark., 1999; Ramig, 2004). Fazla miktarda süt tüketimine bağlı olarak sindirilemeyen laktoz, bağırsaklarda bakteriyel üremeyi tetikleyerek, enfeksiyon sonrası oluşan ishalin şiddetini artırmaktadır (Murphy ve ark., 1999).

2.1.6. Teşhis

Rotavirus enfeksiyonlarında teşhis materyali olarak sıklıkla dışkı, bağırsak içerikleri ve bağırsaktan alınan doku parçaları kullanılmaktadır. (Cho ve ark., 2013).

2.1.6.1. Direkt teşhis

Etkilenen hayvanların dışkılarından ve bağırsak içeriğinden hücre kültüründe virus izolasyonu yapılabilir (Mebus ve ark., 1969). Direkt teşhis yöntemleri arasından antijen-antikor reaksiyonuna dayanan immünokromatografik hızlı tanı test kitleri kullanılmaktadır. Basit ve kolay bir uygulama ile 10-15 dakika gibi kısa bir sürede enfekte olmuş hayvanın dışkisından virusun tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca alanında uzman ve donanımlı bir laboratuvar gerektirmeden saha şartlarında uygulanıp sonuç elde edilmektedir (Costa ve ark., 2014; Klein ve ark., 2009; Saklı, Bulut, Hasoksuz, & Hadımlı, 2017; Wang, Zhang, & Zhang, 2009). Rotavirusların teşhis yöntemleri arasında dışkı örneğinde elektron mikroskopi (EM) yöntemi de kullanılmaktadır (Flewett ve ark., 1974). Kısa sürede sonuç elde edilse de yöntemin pahalı olması ve her laboratuvarda elektron mikroskopunun bulunmaması rutin

teşhiste kullanımını sınırlamaktadır. Ayrıca teşhiste, incelen dışkı örneği içerisinde yer alan viral partikül sayısı (en az 10^6 - 10^7 viral partikül/ml) teşhiste oldukça önemlidir (Maes ve ark., 2003). Rotavirusa ait viral antijenlerin saptanmasında birçok araştırmacı tarafından kullanılan yöntem ELISA tekniğidir. VP6 proteinine karşı hazırlanmış monoklonal antikorları temel alan ELISA tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır. Spesifitesi ve sensitivitesi %90' in üzerinde olan ELISA tekniği ile çok sayıda dışkı örneği aynı anda test edilebilmektedir (Soltan ve ark., 2016). Dışkıdan direkt olarak viral nükleik asidin saptanmasına yönelik uygulanan Sodyum-dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) testi, rotavirusların tespitine eş zamanlı olarak jel üzerinde oluşan bantların profillerine göre, hangi rotavirus grubunda yer aldığı belirlenmesinde de kullanılan bir tekniktir. SDS-PAGE tekniği ile rotavirusa ait 11 gen segmenti büyüklüklerine göre jel üzerinde ayrılarak sıralanır (Barman ve ark., 2004; Rahman ve ark., 2005). Reverz Pasif Hemaglutinasyon (RPHA) testi rotavirusların teşhisinde alternatif bir metot olarak uygulanmaktadır ve RPHA kolay uygulanabilen ve kısa zamanda çok sayıda materyalin tespitine olanak tanıyan direkt teşhis yöntemlerinden biridir (Alkan, Pulat, Yazıcı, & Burgu, 1992; Saneketa, Yoshida, & Oda, 1978). Rotavirusların tanısında RT-PCR ve real-time RT-PCR gibi moleküler teknikler de yer almaktadır. Sensitivite ve spesifite değerleri oldukça yüksek olan bu yöntemler ile rotavirusa yönelik viral genom tespit edilir. RT-PCR ile virusun farklı genotiplerinin tespiti, genotip spesifik primerler kullanılarak yapılmaktadır (Alkan ve ark., 2010; Falcone ve ark., 1999; Gómara, Wong, Blome, Desselberger, & Gray, 2002). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), mikroarray hibridizasyon, agar jel immunodifüzyon, hemaglutinasyon, florasan antikor ve southern blot gibi testler de rotavirusların tespitinde kullanılan direkt teşhis yöntemleri arasında yer almaktadır (Ennima ve ark., 2016; Kang ve ark., 2004; Min, Lim, & Kang, 2006; Rai, Wani, & Bareilly, 2013; Zaane & Ijzerman, 2020).

2.1.6.2. İndirekt Teşhis

Buzağuların kan serumu numunelerinde enfeksiyon sonrası oluşan nötralizan antikorların veya maternal antikorların varlığının tespit edilmesi amacıyla serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan testler arasında ELISA, Serum

nötralizasyon (SN) testi, plak-redüksiyon virus nötralizasyon (PRVN) testi, floresan focus nötralizasyon (FFN) testi ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri yer almaktadır (Estes & Cohen, 1989). İndirekt teşhiste kullanılan değişik serolojik yöntemler ile virusa özgü IgA, IgG ve IgM düzeylerine bakılabileceği gibi, pozitif kontrol olarak genotipi bilinen bir rotavirus suşu kullanılarak tip spesifik antikorlar da tespit edilebilir (Beards, Pilfold, Thouless, & Flewett, 1980; Zaane & Ijzerman, 1984).

2.1.7. Tedavi

Rotavirus enfeksiyonlarında spesifik bir antiviral tedavi bulunmamaktadır. Tedavi sıvı elektrolit açığını kapatmak, sekonder enfeksiyonlardan korumak üzerine şekillenir (Kaplon ve ark., 2013). İlk olarak oluşan ishal ve kusma sonucu şekillenen sıvı elektrolit dengesi ve metabolizma bozukluklarının önüne geçmek amacıyla oral ve parenteral sıvı tedavisi yapılmalıdır. Enfeksiyonun şiddeti sekonder patojenler ile artabilir. Bu nedenle sıvı tedavisi sekonder bakteriyel ajanlara karşı antibiyotik tedavisi ile de desteklenmelidir (Blood, Radostis, & Handerson, 1983; Yanar, 2022).

2.1.8. Koruma ve Kontrol

Buzağı ishallerinin oluşumunda enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz olmak üzere birçok sebep bulunmaktadır. İshallerin oluşumunda etiyolojik faktörler oldukça karmaşıktır (Foster & Smith, 2009). Enfeksiyonlara karşı etkin bir koruma sağlanabilmesi amacıyla yenidoğanların enfeksiyöz etkenlere maruz kalmaları engellenmeli, kolostrum alımı titizlikle sağlanmalı ve gebe hayvanların aşılması ile yeni doğanlarda maternal antikorlar ile koruma sağlanmalıdır (Barrington & Parish, 2001).

Etkenin dışkı ile saçılması sonucu meydana gelen fekal-oral bulaşma, hastalığın yayılmasında oldukça önemlidir (Goto ve ark., 1986). Yenidoğan buzağuların enfeksiyöz etkenlere maruz kalmaları doğum ortamıyla doğrudan ilişkilidir (Radostits, 1991). Enfeksiyonun kontrol edilmesinde, hayvanların içinde bulunduğu çevre şartlarına ve hijyen kurallarına önem verilmesi gerekmektedir (Estes & Cohen, 1989).

Büyük ve entansif işletmelerde çevre şartları ve hijyen kuralları enfeksiyonun önlenmesinde tek başına yeterli değildir. Doğum sonrası buzağuların kolostrum alması

titizlikle takip edilmelidir. Kolostrumda rotavirus antikorlarının varlığı, yenidoğan buzağuları rotavirus enfeksiyonuna karşı korumada önemlidir. Doğumdan sonra 1 saat içinde kolosturum alan buzağılarda, 12 saat sonra kolostrum alanlara göre immunoglobulin emilimi oldukça fazladır (Radostits, 1991). Kolostrum alımı sonrası bağırsak lümenindeki antikorun varlığı enfeksiyona karşı koruma oluşturmaktadır. Kısa zaman diliminde fazla miktarda kolostrum alımı yaklaşık olarak 48 saatlik bir koruma sağlarken, az miktarda sürekli kolostrum alınımı daha iyi bir koruma sağlamaktadır (Murphy ve ark., 1999; Radostits, 1991).

Hastalığın epidemiyolojisinde rol oynayan erişkin sığırlarda seropozitiflik oranı yüksekken, antikor titresi düşük olabilir. Ayrıca doğal yolla enfekte olmuş anneden doğan buzağılara geçen antikor miktarı, doğum öncesinde annenin enfeksiyonu geçirme zamanı ve antijenik uyarım miktarı gibi faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Bu faktörlere bağlı olarak kolostrum ile yavruya aktarılan antikor miktarı enfeksiyona karşı korumada yetersiz kalabilmektedir (Kohara, Hirai, Mori, Ishizaki, & Tsunemitsu, 1997; Şahna & Alkan, 2013; Wieda, Bengelsdorff, Bernhardt, & Hungerer, 1987).

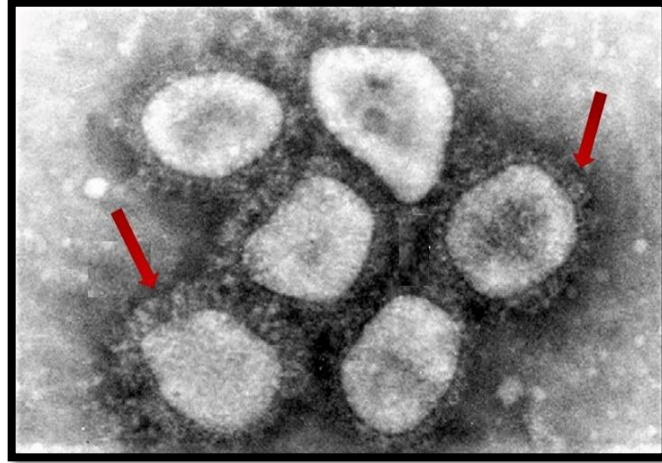
Buzağı yetiştiriciliği yapılan entansif işletmelerde enfeksiyona karşı koruma sürü bazında aşılama ile yapılmaktadır (Zissis ve ark., 1983). Sığırlarda rotavirusa karşı aşılama Grup A Rotaviruslarının G6 ve G10 genotiplerini içeren ticari aşılar kullanılmaktadır (Kaplon ve ark., 2013; Midgley ve ark., 2012). Hastalığın sıklıkla görüldüğü işletmelerde rotavirus enfeksiyonuna karşı, yenidoğan buzağılara oral yolla modifiye canlı aşı uygulanarak veya gebe hayvanlara gebeliğin son döneminde inaktif aşı uygulanarak mücadele yapılabilmektedir (Fernandez ve ark., 1998; Kim, Nielsen, Hodgins, Chang, & Saif, 2002; Snodgrass ve ark., 1980). Annelerin doğum öncesi dönemde aşılınmaları sonucu kolostrum ve sütte, uzun süreli ve yüksek miktarda antikor bulunması buzağılarda hastalığın görülme sıklığında ve etkenin dışkı ile saçılması açısından önemlidir. Genel olarak aşılama yolu ile koruyuculuk sağlanması amacıyla erişkin sığırların gebeliğin geç dönemlerinde aşılınarak yüksek antikor titresinin elde edilmesi ve yenidoğan buzağılarda maternal antikorlar yoluyla enfeksiyona karşı etkin korunmanın sağlanması önerilmektedir (Fernandez ve ark., 1998; Kim ve ark., 2002; Kohara ve ark., 1997).

2.2. Bovine Coronavirus (BCoV)

2.2.1. Tarihçe

Coronavirüsler ilk olarak 1932 yılında tavuklarda Infectious Bronchitis Virus (IBV) hastalığının etkeni olarak tanımlanmıştır ve sonrasında Coronaviridae ailesinde bulunan *Mouse Hepatitis Virus* (MHV)' un tespiti yapılmıştır (Mcintosh & Peiris, 2019).

Coronavirüsler, elektronmikroskobu ile incelendiğinde güneş ışınlarını andıran dışı doğru şekillenmiş karakteristik, sivri glikoproteinlere sahip olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple Latince "taç" anlamına gelen "corona" sözcüğüyle adlandırılmıştır (Şekil 2.4) (Oostergetel ve ark., 2009; Vennema ve ark., 1996).



Şekil 2.4. Coronavirusların elektron mikroskop görüntüsü (Ok işaretleri : morfolojide taç olarak adlandırılan Spike proteinleri) (Saif, 2010)

Sığırların coronavirusu (Bovine coronavirus - (BCoV)) ilk olarak ABD'de izole edilmiş ve aşı suşu olarak kullanılmak üzere hücre kültüründe üretilmiştir (Mebus, Stair, Rhodes, & Twiehaus, 1973).

Coronavirüslara dair ilk evrim modeli 2007 yılında ortaya konulmuştur. Bu hipoteze göre yarasa coronavirusları, tüm coronavirusların genomik kaynağıdır (Vijaykrishna ve ark., 2007). Devamında yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar bu hipotezi desteklememektedir (Woo ve ark., 2009). Yeni evrim modeline göre yarasaları etkileyen coronaviruslar alfa ve beta genuslarında bulunan coronavirusların,

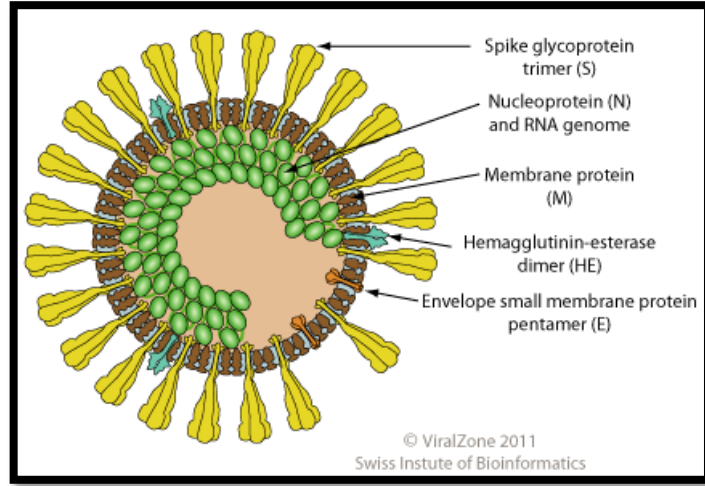
kuşları etkileyen coronaviruslar ise gamma ve delta genuslarında bulunan coronavirusların genomik kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Woo ve ark., 2012). Aynı zamanda coronavirusların farklı konaklara adapte olma yetenekleri, mutasyon ve rekombinasyon gibi genetik değişimleri geniş bir hastalık yelpazesine neden olmaktadır (Lau ve ark., 2015).

Coronaviruslar sığırlarla birlikte birçok, evcil ve vahşi hayvan türüne bulaşık hastalık oluşturabilmektedir (Woo ve ark., 2009). Prognozu değişken olmakla birlikte, canlı türlerinde genel olarak akut ve kronik sindirim, solunum ve merkezi sinir sistemi hastalıklarına neden olmaktadır (Weiss & Navas-Martin, 2005). Ayrıca farklı canlı türleri arasında enfeksiyon bulaşma açısından da potansiyel risk oluşturan coronavirusların tür bariyerini geçerek zoonoz hastalık oluşturan patojenlere dönüşebilecekleri düşünülmektedir (Fung, Huang, & Liu, 2014). Türler arası bulaşmada önemli örnekler olan ve insanlarda ölümcül sonuçlara neden olan Şiddetli Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu (SARS) ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) ‘nun yarasalardan bulaştığı düşünülmektedir (Millet & Whittaker, 2015). Yapılan araştırmalar sonucunda yarasaların MERS hastalığında doğal rezervuar olduğu, develerin ise arakonakçı olduğu değerlendirilmiştir (Wernery, Lau, & Woo, 2017). Uluslararası ticaret, doğal alanlarda kentleşme, yoğun nüfuslu şehirleşme ve hatalı tarım uygulamaları coronavirusların şiddetli zoonoz salgınlara yol açması açısından önemli faktördür (Millet & Whittaker, 2015).

2.2.2. Etiyoloji

Bovine coronaviruslar *Psoniviricetes* sınıfında, *Nidovirales* dizininde, *Coronaviridae* ailesinde, *Orthocoronavirinae* alt ailesinde, *Betacoronavirus* genusunda yer alır (ICTV, 2023b). *Orthocoronavirinae* alt ailesi serolojik ve genetik özelliklerine göre *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* ve *Deltacoronavirus* olmak üzere 4 genusa ayrılmaktadır (Bidokhti ve ark., 2013). *Betacoronavirus* genusunda yer alan sığır coronavirusları, elektron mikroskobu ile taç benzeri çıkıntılara sahip bir görüntüyle tanımlanmıştır ve virion çapı 80-120 nm’ dir. Bilinen en büyük RNA genomuna sahip olan coronavirusların genom uzunluğu 26,2-31,7 kb, pozitif polariteli ve segmentsiz RNA karakterindedir (Belouzard, Millet,

Licitra, & Whittaker, 2012; Oostergetel ve ark., 2009; Shin ve ark., 2019). Pozitif polariteli viral genom içerisinde 5' Cap ve 3' Poli A kuyruğu bulunmaktadır. Bu durum viral genomun replikaz translasyonu için sitoplazmada mRNA gibi davranmasına yardımcı olmaktadır (Fehr & Perlman, 2015; Lai, 1990). Viral genom helikal simetrik nükleokapsid içerisinde bulunmaktadır (Belouzard ve ark., 2012).



Şekil 2.5. Coronavirusların virion morfolojisi (Viral Zone, 2023)

BCoV genomunun büyük bir kısmı (2/3) yapısal olmayan proteinleri, kalan kısım ise (1/3) yapısal proteinleri kodlayan bölgedir. Yapısal olmayan proteinlerden precursor poliprotein, viral genomdan transkribe edilen RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin sentezi yönetmektedir (Fehr & Perlman, 2015; Woo, Huang, Lau, & Yuen, 2010). Viral genom translasyona uğramayan 5' ve 3' uçlarıyla sınırlandırılmış 13 adet ORF (Open Reading Frame) içermektedir (Liu ve ark., 2006). Genom üzerinde bulunan yardımcı genler virusun hücre kültüründe çoğalması için zorunlu değildir fakat şekillenen hastalığın patogenezinde rol oynar (Zhao ve ark., 2012).

Viral genom 5 adet yapısal protein kodlamaktadır. Bunlar spike (S) glikoproteini, membran (M) proteini, nükleokapsid (N) proteini, hemagglütinin esteraz (HE) proteini ve küçük membran (E) proteindir (Şekil 2.5) (Shin ve ark., 2019).

S glikoproteini, tip 1 membran glikoproteinidir ve 20 nm uzunluğundadır (Woo ve ark., 2010). Toplam 1363 amino asitten oluşan S proteini, 768 ve 769. Aminoasitler arasında bölünerek S1 ve S2 fragmentlerine ayrılmaktadır (Yoo & Deregts, 2001). Virusun reseptöre bağlanması ve hücreye girişinde önemli görevi olan S proteininin,

S1 alt bölümü reseptöre bağlanma ve tanınmada görevliken, S2 alt bölümü ise viral ve hücrel membranların füzyonuna aracılık eden transmembran protein görevini yerine getirmektedir (Belouzard ve ark., 2012; Woo ve ark., 2010). S proteinine karşı oluşan antikorlar, hemaglutinin esterase proteini tarafından indüklenen antikorlara göre daha yüksek düzeyde nötralizan etkiye sahiptirler ve daha yüksek aviditedirler. Coronavirusların doku tropizmi ve konakçı çeşitliliğinin fazla olması S proteinindeki varyasyondan kaynaklanmaktadır (Liu ve ark., 2006).

M glikoproteini virionun yapısında sayıca en fazla miktarda bulunan yapısal proteindir (Armstrong, Niemann, Smeekens, Rottier, & Warren, 1984). M glikoproteini 3 adet transmembran bölgesine ayrılmaktadır. N-terminal, glikozile edilmiş ektodomain ve viral partiküle doğru uzanan büyük bir C-terminal endodomainine sahiptir (Nal ve ark., 2005). Golgi aygıtı tarafından glikozile edilen M glikoproteini virusun hücre içerisine füzyonu ve antijenik özellik kazanması gibi önemli görevleri üstlenir (Haan, Kuo, Masters, Vennema, & Rottier, 1998; Wissink ve ark., 2004).

Viral zarfın altında bulunan N proteini, virüsü dış etkilere karşı koruyucu olarak görev yapan bir proteindir. Ayrıca viral RNA'nın sarılması ve hücrel immunitenin aktive edilmesinde de görev almaktadır. Yapılan çalışmalarda N proteinin, RNA sentezinde de önemli rol oynadığı ve hücredeki sinyal yollarıyla ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Hurst, Koetzner, & Masters, 2013). Coronavirusların filogenetik çalışmalarda N gen bölgesi en sık kullanılan hedef gen bölgelerinden biridir. İmmunogenik özelliğinin bulunmasından dolayı serolojik teşhiste rekombinant protein olarak kullanılmaktadır (Woo ve ark., 2010). N proteini genetik değişimlerden az etkilenen bir viral protein olduğu için, BCoV tanısında sıklıkla kullanılan gen bölgesidir (Alkan ve ark., 2011; Fernandes ve ark., 2018; Hurst ve ark., 2013).

HE proteini, yüzey glikoproteinleri üzerinde bulunan siyalik asit reseptörlerine bağlanır ve asetil esterase enzimi görevi yapar (Klausegger ve ark., 1999). HE proteini, S protein aracılığı ile virusun hücreye girişini ve virusun mukozalardan yayılımının artırılmasında rol oynar (Cornelissen ve ark., 1997; Fehr & Perlman, 2015). Bazı betacoronavirusların yapısında bulunan HE proteini virus replikasyonu için gerekli değildir ancak virusun patojenitesini değiştirebilmesi açısından önemlidir (Lissenberg ve ark., 2005).

Transmembran özelliği olduğu düşünölen E proteini, virusun yapısında sayıca en az bulunan proteindir ve tek bir hidrofobik alana sahiptir (Fehr & Perlman, 2015; Godet, L'Haridon, Vautherot, & Laude, 1992). Virusun morfolojisinde, konak hücrelerin zar geçirgenliklerinde ve virus ile konak hücre etkileşimlerinde önemli rol oynamaktadır (Liu, Yuan, & Liao, 2007). Virionun tomurcuklanması için gerekli olmayan E proteini alfa interferon üretiminin başlatılmasında görevlidir. BCoV'un viral genomundan kodlanan diğer proteinlere kıyasla kısa uzunluğa sahip oldukları oldukları için filogenetik çalışmalarda iyi bir hedef bölge değildirler (Woo ve ark., 2010).

BCoV proteazlara karşı oldukça dayanıklıdır ve gastrointestinal kanalda canlı kalabilmektedir. İnvitro şartlarda BCoV üretmesi amacıyla kullanılan tripsinin virusun enfektivitesini artırdığı tespit edilmiştir (Thomas ve ark., 2006). BCoV'lar da diğer zarflı viruslar gibi deterjanlara ve yağ çözücülere karşı duyarlıdır fakat dezenfektanlar, ısı ve formalin ile inaktive olmaktadırlar. Düşük sıcaklıklarda ve ultraviyole ışığa maruz kaldıklarında enfeksiyözitesini korumaktadır (Mcintosh & Peiris, 2019; L.J. Saif, Wang, Vlasova, Jung, & Xiao, 2019).

2.2.3. Epidemiyoloji

BCoV, sığır popülasyonlarında yaygın olarak görölmekte ve enfeksiyon durumunda işletmede önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Boileau & Kapil, 2010; Fernandes ve ark., 2018). Dünyanın farklı yerlerindeki çiftliklerde yapılan araştırmalarla BCoV prevalansının yüksek olduğu tespit edilmiştir (Siddell, Wege, & Ter Meulen, 1983).

BCoV, önceleri başta yenidoğan buzağılarda şekillenen ishaller ile ilişkilendirilmiş; fakat sonrasında yetişkin sığırlarda kış dizanterisi ve solunum sistemi enfeksiyonlarına da neden olduğu tespit edilmiştir (Mebus ve ark., 1973; Storz ve ark., 2000). Günümüzde dünya genelinde buzağı ishallerinin etiyolojik sebepleri arasında yer alan oldukça önemli viruslardan biridir (Fernandes ve ark., 2018; Gunn, Collins, O'connell, & O'shea, 2015). BCoV, ölkemizde buzağı ishallerinin etiyolojisinde rotaviruslardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Alkan, 1998; Hasoksuz ve ark., 2005).

B_{CoV}' a bağı olarak şekillenen salgınlar genellikle sonbahar ve kış mevsiminde görülmektedir. Fakat farklı iklim koşullarında yapılan çalışmalarda salgınların sıcak mevsimlerde de görüldüğü rapor edilmiştir (Mcintosh & Peiris, 2019; Saif ve ark., 2019; Siddell ve ark., 1983).

B_{CoV} sığırlar arasında fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Enfekte hayvanın dışkısı ile kontamine olmuş yem ve su kaynakları virusun bulaşmasında önemli rol oynamaktadır. Etken ayrıca fekal-oral bulaşmaya ilave olarak aerosol yolla da bulaşabilmektedir (Hasoksuz ve ark., 2005; Tsunemitsu ve ark., 1991). Virus hayvanlar ya da işletmeler arasında hayvan hareketleriyle direkt olarak ya da kontamine alet, ekipman veya personel aracılığı ile indirekt olarak bulaşmaktadır (Decaro ve ark., 2008; Fulton ve ark., 2011).

Yapılan araştırmalarda besi hayvanlarının enfekte olmuş ishelli buzağuların dışkılarıyla teması sonrası, B_{CoV}' u diğer hayvanlara taşıdığı tespit edilmiştir (Cho, Hoet, Loerch, Wittum, & Saif, 2001; Fulton ve ark., 2011). Erişkin ve genç hayvanlarda B_{CoV} enfeksiyonu genellikle subklinik seyretmektedir. Fakat bu hayvanlar virusun hayvanlar arasında yayılmasında oldukça önemli rol oynamaktadır. Erişkin sığırlarda virusun saçılımı gebelik, doğum ve mevsimsel faktörlere de bağı olarak değişmektedir (Lu, Yao, & Eichhorn, 1991). Doğum esnasında progesteron ve diğer hormon seviyelerinin artmasına bağı olarak viral titrenin yükselmesi anneden buzağıya bulaşma olasılığını artırmaktadır (Crouch, Bielefeldt Ohmann, Watts, & Babiuk, 1985). Buzağuların doğum sonrası B_{CoV}' a maruz kalmalarında annelerinin büyük rol oynadığı bildirilmiştir (Şahna & Alkan, 2013). Subklinik enfekte sığırlar aracılığıyla virus saçılımının sınırlı süreli olması ve virusun nötralizan antikorlar ile kompleksler oluşturarak atılmasına bağı olarak her zaman viral saçılımın mümkün olamayacağı saptanmıştır (Kyoung , Hoet, Loerch, Wittum, & Saif, 2001). Solunum sisteminden elde edilen B_{CoV} izolatlarıyla enfekte olmuş ve kolostrum verilmemiş buzağularda ishal şekillendiği, nazal ve rektal yolla virus saçılımının olduğu da tespit edilmiştir (Cho ve ark., 2001).

2.2.4. Patogenez

Yenidoğan ishal olgularında BCoV organizmaya fekal-oral yolla girdikten sonra virus replikasyonu ince bağırsakta bulunan villusların olgunlaşmamış epitel hücrelerinde ve kolonda bulunan yüzeysel epitel hücrelerinde meydana gelir. Virusun enfekte ettiği dokularda zamana bağlı olarak lizis oluşur (Boileau & Kapil, 2010; Vlasova & Saif, 2021). Lizise uğrayan hücrelerin yerini olgunlaşmamış epitel hücreleri alır ve buna bağlı olarak villusların morfolojilerinde değişiklik meydana gelir. Enfeksiyon sonrası etkilenen villusların birleşip küçülmesi sonucu villöz atrofi meydana gelir. İnce bağırsak hücreleri haricinde kolon hücrelerinde de enfeksiyon sonrası epitel hücrelerinde meydana gelen dejenerasyonlar sonucunda mukozal erozyonlar şekillenmektedir (Clark, 1993).

Bağırsaklarda şiddetli meydana gelen epitel hücrelerinin yıkılması sonucu olgunlaşmamış epitel hücrelerinden, normal sindirim enzimlerinin salınımı olmaz ve bağırsaklarda sindirim kapasitesi hızlı bir şekilde azalır. Bağırsak lümeninde sindirilmemiş laktozun birikmesine bağlı olarak mikrobiyal aktivitede artış şekillenirken, osmotik dengede bozulmalar gerçekleşir. Bağırsaklarda sindirim ve emilim kapasitesinin azalmasına bağlı olarak su ve elektrolit kaybı ile birlikte ishal oluşur. İlerlemiş enfeksiyon tablolarında şekillenen ishal hayvanlarda dehidrasyon, asidosis ve hipoglisemiye neden olur ve bununla birlikte akut şok ve kalp yetmezliğine bağlı olarak hayvanlarda ölüm meydana gelir (Clark, 1993).

2.2.5. Klinik Bulgular

BCoV' lar yenidoğan buzağılarda meydana gelen ishal ile karakterize edilirken, solunum sistemine ilişkin klinik semptomlar yetişkin sığırlarda gözlenmekte ve sekonder etkenlerle birlikte ölüme sonuçlanan şiddetli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Boileau & Kapil, 2010; Saif, 2010).

Buzağılar BCoV' a karşı doğum sonrası 3-21. günler arasında en yüksek düzeyde duyarlıdır. Enfeksiyonun inkübasyon süresi oldukça kısa olup 16-24 saat kadardır. Buzağılarda halsizlik, iştahsızlık, zayıflama ve zamana bağlı şekillenen sulu ve sarımtırak renkte ishal tablosu oluşur (Boileau & Kapil, 2010; Vlasova & Saif, 2021).

İshal ortalama 4-5 gün sürer ve ishallerde dışkıda süt, mukus ve villuslardaki atrofiye bağlı olarak kan görülebilir. Hayvanlarda emme refleksi azalır (Clark, 1993).

Şekillenen enfeksiyona sekonder etkenler eşlik etmediği sürece buzağuların çoğunluğu iyileşir. Fakat bazı klinik tablolarda buzağularda şekillenen şiddetli ishal, semptomatik tedaviler sonucu geri döndürülemez. Bu hayvanlar sürekli olarak halsiz ve yatma eğiliminde olup yüksek derecelerde ateş görülür. Hayvanlarda dehidrasyon ve asidoz sonucu kardiyovasküler kollaps şekillenerek koma ve ölüm gerçekleşir (Boileau & Kapil, 2010; Kapil, Trent, & Goyal, 1990). Yenidoğan buzağularda meydana gelen klinik tablonun prognozu, hayvanların kolostrum ile aldıkları maternal antikorların miktarına göre farklılık gösterir. Buzağularda BCoV enfeksiyonlarında morbidite oranı yüksek olmasına karşın mortalite oranı maternal antikor varlığı ve şekillenen ishallerin şiddetine göre değişmektedir (Clark, 1993; Godden, 2008).

2.2.6. Teşhis

BCoV' a bağlı şekillenen buzağı ishallerinde en önemli teşhis materyeli olarak dışkı, bağırsak içerikleri ve bağırsaktan alınan doku parçaları kullanılır. Etkilenen hayvanlarda ishal ortalama 4-5 gün sürer ve enfeksiyonu takiben iyileşme döneminde de virus saçılımı şekillenebilir (Clark, 1993). Buzağularda şekillenen enfeksiyonun teşhisinde direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır.

2.2.6.1.Direkt Teşhis

İshallerden toplanmış dışkı örneklerinde BCoV' un direkt teşhisi virusun veya virusa ait yapıların tespit edilmesiyle yapılmaktadır. BCoV' un hücre kültürüne adapte edilmesi ve üretilmesi zordur. Fakat hücre kültüründe proteolitik enzimler kullanılarak izolasyonun yapıldığı başarılı çalışmalar da bulunmaktadır (Clark, 1993; Saif, Heckert, Miller, & Tarek, 1988). Saha şartlarında kolay ve hızlı uygulanabilen, uzman personel ve ekipman gerektirmeyen hızlı tanı kitleri virusun direkt teşhisinde kullanılmaktadır (Saklı ve ark., 2017). EM yöntemi ile teşhis virusun pleomorfik morfolojiye sahip olması nedeniyle oldukça zordur. Yapılan incelemeler sonrası virus benzeri partiküllere (VLP) benzeme olasılığı bulunduğu için elde edilen sonuçların

daha güvenilir yöntemlerle doğrulanması gerektiği bildirilmiştir (Schoenthaler & Kapil, 1999). Bunlarla birlikte yüksek maliyetli olması, donanımlı ekipman gerektirmesi, dışkıda mililitrede bulunan viral partikül sayısı ve deneyimli personel gerekliliği EM yönteminin direkt teşhisinde kullanımını kısıtlamaktadır (Maes ve ark., 2003). BCoV' un teşhisinde sıklıkla kullanılan ve düşük konsantrasyondaki virusun tespitine olanak sağlayan diğer bir yöntem antijen ELISA' dır. ELISA yöntemi ile BCoV' un enterik veya respiratorik saha suşlarının ayrımı yapılamamaktadır. ELISA testi duyarlılığının ve spesifitesinin yüksek olması sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hızlı sonuç vermesi ve çok sayıda örneğin aynı anda çalışılması, viroloji laboratuvarlarında rutin çalışmalarda kullanım kolaylığı sağlamaktadır (Boileau & Kapil, 2010). Enfekte olmuş hayvanlardan alınan kolon doku örneklerinde BCoV tespiti amacıyla kullanılan diğer bir yöntem İmmunoflorasan (IF) tekniğidir. Ölüm sonrası yapılan nekropside hayvanlarda kokuşma başlamadan önce taze örnekler üzerinde inceleme yapılması gerektiği için rutin teşhiste kullanımı sınırlıdır (Janice C. Bridger, Woode, & Meyling, 1978; Carman & Hazlett, 1992). Ayrıca teşhis amacıyla tek başına yeterli olmadığı ve doğrulamak için genetik tabanlı testlerin yapılması gerektiği bildirilmiştir (Hansa ve ark., 2013). BCoV' lar hemaglutinasyon yeteneğine sahip oldukları için, virusun direkt teşhisinde HA testi kullanılmaktadır (Gaber & Kapil, 1999; Schoenthaler & Kapil, 1999). Fakat BCoV' un S glikoproteininin reseptörlere bağlanmasındaki farklılıklardan dolayı, virusun suşları arasında HA titresini açısından farklılıklar gözlenmektedir (Fukutomi, Tsunemitsu, & Akashi, 1999). Enfekte olmuş hayvanın dışkısında spesifik olmayan hemaglutininlerin bulunması ve testin ortam ısısından etkilenmesinden dolayı yanlış sonuçlara neden olmaktadır (Czerny & Eichhorn, 1989). Dışkıda BCoV genomunun saptanması amacıyla RT-PCR ve Nested-PCR gibi moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Dışkıda bulunan çok düşük miktardaki BCoV' un dahi nested-PCR yöntemi ile tespit edilebilmesi mümkündür (Bok ve ark., 2015; Cho, ve ark., 2001; Decaro ve ark., 2008; Saklı ve ark., 2017). PCR testlerinde elde edilen ürünlerin sekans analizi sonucu virusun filogeni çalışmaları yapılabilmektedir (Liu ve ark., 2006).

2.2.6.2. İndirekt Teşhis

Buzağuların kan serumu numunelerinde enfeksiyon sonrası oluşan nötralizan antikorların veya maternal antikorların varlığının tespit edilmesi amacıyla serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında virus nötralizasyon (VN), IHA ve ELISA testleri yer almaktadır. VN ve IHA testleri ile virusa karşı oluşmuş antikorların titreleri ve suşlar arası antijenik farklılıklar belirlenebilmektedir (Decaro ve ark., 2008; Fulton, Ridpath, & Burge, 2013). Süt ve serum örneklerinde BCoV' a karşı gelişen antikorların tespitine yönelik geliştirilen diğer bir yöntem isotype capture -ELISA testidir (Naslünd, Traven, Larsson, Silvan, & Linde, 2000).

2.2.7. Tedavi

BCoV' dan etkilenen hayvanların tedavisinde kullanılan spesifik bir antiviral ilaç bulunmamaktadır (Boileau & Kapil, 2010). Enfeksiyon durumunda yapılan müdahaleler etkilenen hayvanların semptomlarına yöneliktir. Uygulanan yöntemler ile dehidrasyon, ishal ve elektrolit sıvı kaybına bağlı olarak gelişen asidozu iyileştirme amaçlanmaktadır (Vlasova & Saif, 2021). Ayrıca virüslara bağlı ishal olgularında sekonder olarak bakteriyel enfeksiyonlar da şekillenebileceği için antibiyotik tedavileri de uygulanabilmektedir (Clark, 1993; Saif ve ark., 2019).

2.2.8. Koruma ve Kontrol

BCoV' un neden olduğu kayıplar hayvanlar arasında virusun bulaşmasını engelleyerek azaltılabilir. Hayvanlar arasında bulaşma fekal-oral yolla direkt olarak ya da kontamine personel veya ekipman aracılığıyla indirekt olarak gerçekleşmektedir. Virus saçılımı ve yeterli bağışıklığı olmayan hayvanların bulunması koruma ve kontrol açısından önemli parametrelerdir (Decaro ve ark., 2008; Fulton ve ark., 2011; Mee, Geraghty, O'Neill, & More, 2012). Bunun yanında bakım, çevresel faktörler, ahır hijyeni ve personel yeterliliği enfeksiyonun kontrolünde göz önünde bulundurulmalıdır. Koruma sağlanabilmesi amacıyla kolostrum alımı titizlikle takip edilmeli ve gebe hayvanların aşılması ile yeni doğanlarda maternal antikorlar aracılı

koruma sağlanmalıdır (Godden, 2008; Le Rousic ve ark., 2000). Ayrıca hasta veya subklinik enfekte olan hayvanlar tespit edilerek ortamdan ayrılması da önerilmektedir (Bulgin, Ward, Barrett, & Lane, 1989).

BCoV'lar işletmeye yeni katılan hayvanlar ve insanlar aracılığıyla indirekt olarak hayvanlara bulaşabilmektedir (Liu ve ark., 2006). Farklı sürüler ya da işletmeler arasında çizme ve diğer ekipmanların kullanılması bulaşmada epidemiyolojik açıdan oldukça önemlidir (Cho ve ark., 2013).

BCoV' a özgü kolostral antikorların barsak lümeninde bulunması, pasif bağışıklığın oluşması açısından oldukça önemlidir (Godden, 2008; Le Rousic ve ark., 2000). IgG, yeni doğan buzağılara süt ve kolostrum yoluyla geçerek pasif immunitenin oluşmasını sağlamaktadır (Bok ve ark., 2018; Clark, 1993; Crouch ve ark., 1985). Coronavirus enfeksiyonlarına karşı oluşan mukozal antikorlar buzağılarda bağırsak mukozasının yüzeyine yerleşerek enfeksiyon durumunda immun yanıtın oluşmasına yardımcı olmaktadır. Edinsel bağışıklıkta IgA, virusa karşı savunmanın ve bağışıklığın şekillenmesinde rol oynamaktadır (Clark, 1993).

BCoV enfeksiyonlarına karşı bağışıklığın sağlanmasında en etkili yol aşılamalardır. Aşılama ile oluşan antikorlar kolostrum yoluyla yavruya geçebilmektedir (Godden, 2008). Yapılan bir çalışmada buzağılarda bağışıklık seviyesini arttırmak için gebe ineklere doğumdan 2-12 hafta önce yapılan paranteral aşı uygulaması, süt ve kolostrumdaki spesifik antikor seviyelerinde ve sürelerinde artışa yol açmaktadır (Crouch ve ark., 2000). Neonatal buzağı ishallerinin kontrolü amacıyla gebe hayvanlara, gebeliğin son döneminde yapılan aşılar humoral immunitiyi oluşturmak amacıyla uygulanmaktadır (Fulton ve ark., 2013).

Ülkemizde de neonetal buzağı ishalleri ile mücadelede Coronavirus (Mebus suşu), Rotavirus ve E. coli' yi içeren kombine aşılar uygulanmaktadır. Buzağı ishallerinde sıklıkla karşılaşılan BCoV' ların kontrol altına alınması amacıyla, aşılarda içeriğinde bulunan virus ile sahada sirküle olan BCoV' un benzer olması gerekmektedir. BCoV' un hücre kültüründe üretilmesi zor olduğu için günümüzde kullanılan mevcut aşılar önceden hücre kültüründe izole ve adapte edilmiş BCoV suşlarını içermektedir (Fulton ve ark., 2013). Buzağılarda salgınlar yaratan enterik BCoV' ların moleküler anlamda izlenmesi ve farklılıkların tespit edilmesi, oluşan salgınlarda suşların tanımlanması ve

ishallerin önlenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca koruma kontrol çalışmaları açısından yararlı veriler sağlayacaktır (Bidokhti ve ark., 2013).

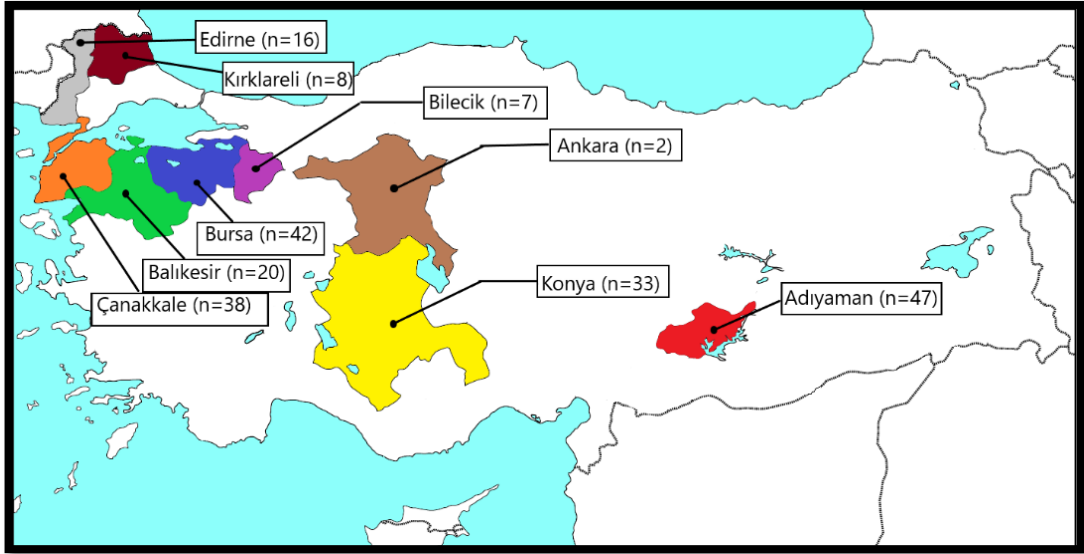
Bu tez çalışmasının amacı, Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan illerdeki neonatal buzağı ishal olgularından toplanan dışkı örneklerinde Bovine rotavirus ve Bovine coronavirus'un tespiti, hücre kültüründe izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve ülkemizdeki durumuyla ilgili güncel verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Gereç

3.1.1. Örneklenen Hayvanlar

Örnekleme kapsamında Mayıs 2017 – Kasım 2021 tarihleri arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı' na teşhis amaçlı gönderilen dışkı örnekleri kullanılırken, ayrıca saha çalışması yapılarak Bursa, Adıyaman, Çanakkale, Konya, Balıkesir, Kırklareli, Bilecik, Ankara ve Edirne illerinden entansif işletmelerde, 1 aylık ve daha küçük yaştaki ishallerli buzağılardan dışkı örnekleri toplandı. Örnekleme yapılan iller ve toplanan dışkı örneklerinin sayıları Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Örnekleme yapılan iller (n= örnek sayısı)

3.1.2. Dışkı Örnekleri

Klinik olarak ishal bulgusu gösteren buzağılardan elde edilen ve steril farklı dışkı kaplarına toplanan örnekler soğuk zincir altında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı. Toplam 213 adet

dışkı örneği BRV ve BCoV yönünden test edilmek üzere değerlendirildi. Dışkı örnekleri “RV” kodu verilerek kayıt altına alındı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İshal semptomu gösteren buzağıdan toplanan dışkı örnekleri

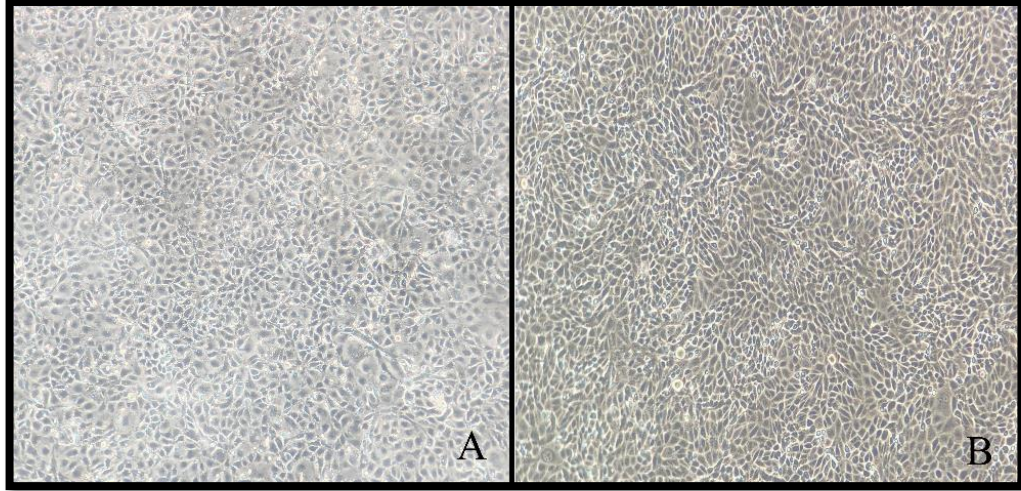
3.1.3. Etik Kurul İzin Belgesi

Bu tez çalışması için gerekli olan etik kurul izni, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 05.05.2020 tarihli ve 2020-05/14 nolu karar ile onaylanmıştır.

3.1.4. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında kontrol virusların üretimi ve hücre kültüründe virus izolasyonu için African Green monkey foetal kidney (MA-104) ve Human Rectal Tumor-18 (HRT-18) devamlı hücre hatları kullanıldı (Şekil 3.3). Hücre hatları Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre kültürü koleksiyonundan sağlandı. Hücre kültürlerinin devamlılığı %10 fötal dana serumu (FDS) (Hyclone, SV30160.03) ilave edilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, D7777, ABD) ve Glasgow Modified Essential Medium (GMEM) ile sağlandı. DMEM ve GMEM içerisine hücre kültürlerinde bakteri ve mantar kontaminasyonunu engellemek amacıyla 100 UI/ μ g/ml Penisilin/Streptomisin (BI, 03-031-1B) ve 250 μ l/ml Amfoterisin B solüsyonu (BI, 03-029-1B) eklendi. Hücre

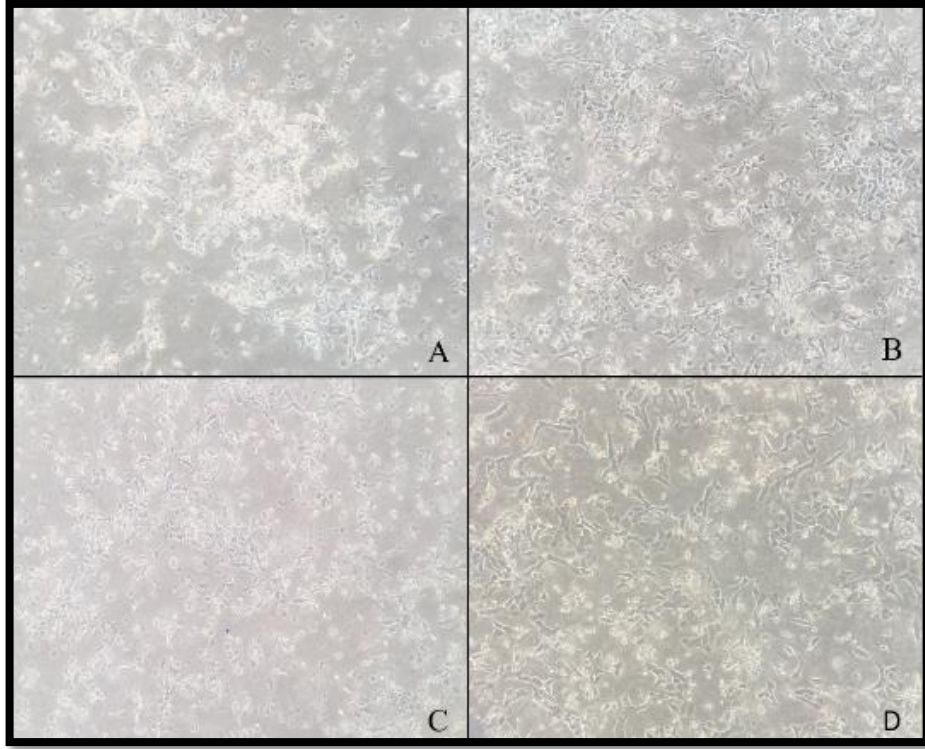
kültürleri ve FDS, pestivirus kontaminasyonu yönünden RT-PCR ve immunoperoksidaz testleriyle negatif olarak teyit edildikten sonra deneylerde kullanıldı. Ayrıca, FDS'nin BVDV antikorları yönünden negatif olduğu da kullanım öncesinde indirekt ELISA yöntemiyle teyit edildi.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan MA-104 (A) ve HRT-18 (B) hücre hatları

3.1.5. Testlerde Kullanılan Kontrol Virusları

Çalışma kapsamında PCR tekniğinde pozitif kontrol virus olarak kullanılan BRV G6P[1] suşu, BRV-G10P[11] suşu, BRV-G6P[5] suşu ve BCoV-Mebus suşu Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonundan temin edildi (Şekil 3.4). BRV-G8 için pozitif kontrol olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından temin edilen cDNA kullanıldı.



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan kontrol viruslarının hücre kültüründe oluşturduğu CPE görüntüsü (BRV G6P[1] suşu (A), BRV G6P[5] suşu (B), BRV G10P[11] suşu (C), BCoV Mebus suşu (D))

3.1.6. Pankreatin Çözeltisinin Hazırlanması

Pankreatin çözeltisi hazırlamak için daha önceden hazırlanmış ve steril edilmiş 100ml PBS içerisine 0.01g Pankreatin (Sigma,SLBL18810V) eklendi. Hazırlanan karışım manyetik karıştırıcıda +4°C’ de 1 gece döndürülerek çözdürüldü. Çözdürme işlemi sonrası hazırlanan çözelti 0.22µm por çaplı polietersülfon enjektör filtrelerden (ISOLAB, 09405001, Türkiye) süzüldü ve steril edildi. Porsiyonlama işlemi yapıldıktan sonra testlerde kullanılmak üzere -20°C’ de muhafaza edildi.

3.1.7. Eritrosit Süspansiyonu

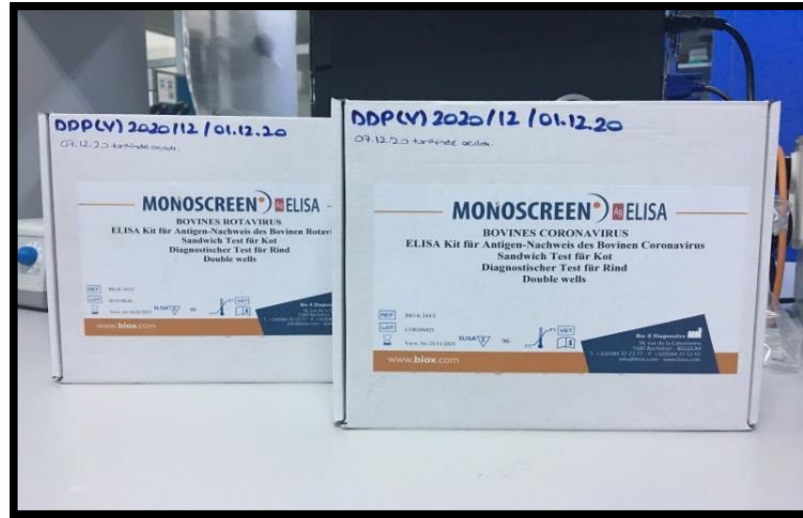
Hemaglütinasyon testinde kullanılması amacıyla %0,5’lik sığır eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Antikoagülanlı tüplere alınan sığır kan örnekleri santrifüj edildi. Ardından eritrosit tabakası PBS ile 3 defa yıkandı. Eritrositlerin pıhtılaşmaması ve uzun süre muhafaza edilebilmesi amacıyla Alsever’s solüsyonu içinde %5’ lik eritrosit kullanım konsantrasyonu hazırlandı ve +4°C’ de muhafaza edildi.

3.1.8. Alsever's Solüsyonu

Alsever's solüsyonu hazırlamak amacıyla 100 ml distile su içine 0,8 g sodyum sitrat (Merck, 1.06448.1000, ABD), 0,055 g sitrik asit (Carlo Erba Reagent, 403727, İtalya), 2,05 g D-glikoz (Merck, 1.08337.0250, ABD) ve 0,42 g sodyum klorid (Merck, 1.06404.1000, ABD) eklenerek manyetik karıştırıcıda çözeltinin homojen olarak çözünmesi sağlandı ve sonra kullanım zamanına kadar 2-8°C' de saklandı.

3.1.9. Antijen-ELISA Kitleri

Klinik olarak ishal semptomu gösteren buzağuların dışkı örneklerinde, viral antijen tespiti amacıyla BRV (BioX Diagnostic BIO K 343/2) ve BCoV (BioX Diagnostic BIO K 392/2) tespitine yönelik ticari antijen ELISA kitleri kullanıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan BRV ve BCoV Antijen ELISA kitleri

3.1.10. Nükleik Asit Ekstraksiyon kiti

BRV ve BCoV antijen ELISA ile pozitif tespit edilen dışkı örneklerine viral nükleik asit ekstraksiyonu amacıyla, 100 bp-50 kbp fragment boyutları arasındaki viral

RNA' nın ekstraksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla ticari nükleik asit izolasyon kiti (Macherey-Nagel Nucleospin Virus, Almanya) kullanıldı.

3.1.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentez Kiti

Nükleik asit ekstraksiyonu yapılan örneklerle, tez kapsamında ele alınan RNA viruslarının (BRV ve BCoV) PCR yöntemi ile moleküler teşhislerinin yapılması için cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu bağlamda ticari olarak temin edilen cDNA sentez kiti (Biorad iScript cDNA synthesis kit, 170- 8891, ABD) kullanıldı.

3.1.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri

Çalışma süresince uygulanan PCR metodu için hazırlanan ana karışım (master mix) içeriği, BRV RT-PCR için nükleaz ari su (Wisent, 809-115-EL, Kanada), ticari olarak kullanıma hazır Maxima Hot Start Dream taq (2X) PCR Master Mix (Thermo scientific, ABD), primerler ve cDNA karışımından oluşmaktadır.

BCoV nested-PCR için ana karışım nükleaz ari su (Wisent, 809-115-EL, Kanada), MgCl₂ (25 Mm, Thermo scientific, ABD), MgSO₄ (25 Mm, abm, Kanada) 10xPCR buffer (Thermo scientific, ABD), dNTPs (10Mm, NEB, N0447S, ABD), Taq DNA polimeraz (5U/μl, abm, G009, Kanada), primerler ve cDNA karışımından oluşmaktadır.

3.1.13. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) Bileşenleri

BRV antijen ELISA ile pozitif tespit edilen dışkı örneklerinden BRV' a ait 11 segmentin gösterilmesi amacıyla RNA ekstraksiyonu amacıyla %10 SDS, 10X ekstraksiyon buffer (1.21 gr Tris (0.01M), 1.86 gr EDTA di sodium (0.005M), 5.84 gr NaCl (0.1M), 100 ml distile su), %60 kirby fenol (500gr redstiled phenol, 0.5 gr 8-hydroxy-quinaline, 70 gr m-creasol ve 200 ml distile su) karışımları ve %40 kloroform kullanıldı.

Çalışma sırasında uygulanacak SDS-PAGE testi için %5-14 oranında akrilamid içeren ticari olarak temin edilen hazır jel kasetler (Biorad, 4561083, ABD) ve ticari olarak temin edilen SDS-Buffer (Biorad, 1610732, ABD) kullanıldı. Ekstrakte edilen RNA, poliakrilamid jele yüklenmeden önce blue indikatör (%25 (w/v) sucrose, %0.2 Bromophenol blue) ile muamele edildi.

Poliakrilamid Jelin Boyanması aşamasında 100 ml jel fikzasyon sıvısı (%10 etanol, %0,5 glaciel asetik asit), 100 ml gümüş nitrat (0.38 gr AgNO₃) çözeltisi, 100 ml developing buffer (6 gr NaOH, 1,5 ml formaldehit) ve 250 ml stop solüsyonu (1.875 gr Na₂CO₃) hazırlandı ve gümüş nitrat boyama işlemi gerçekleştirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Dışkı Örneklerinden İnokulum Hazırlanması

Kasım 2018 tarihinden itibaren toplanan dışkı örnekleri, bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek amacıyla 100 UI/ml Penisilin/Streptomisin (BI, 03-031-1B) ve 250 µl/ml Amfoterisin B solüsyonu (BI, 03-029-1B) içeren PBS ile 1:10 oranında sulandırıldı. Tüp çalkalayıcıda (vorteks) karıştırıldıktan sonra, 1 gece +4°C’ de bekletildi. Homojenize edilen dışkı örnekleri 3000 devirde +4°C’ de 30 dakika süreyle santrifüj (Nüve, NF 800R, Türkiye) edildi. Santrifüj sonrası ayrılan süpernatant 0.45 µm ve 0.22µm por çaplı polietersülfon enjektör filtrelerden (Isolab, 09405001, Türkiye) süzüldü. Elde edilen süzüntü yapılacak testlerde kullanılmak üzere -70 °C’ de muhafaza edildi.

3.2.2. Kontrol Viruslarının Üretimi

3.2.2.1. BRV Suşlarının Üretimi

BRV üretimi Bohl ve ark. (1984) tarafından bildirilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı (Bohl ve ark., 1984). PCR yöntemlerinde kullanılacak farklı BRV kontrol virus suşlarının (BRV-G6P[1], BRV-G10P[11] ve BRV-G6P[5]) üretimi amacıyla MA-104 hücre hattından, 150 cm² lik hücre kültür

şişesinde (Orange scientific, Belçika) 100,000 hücre/ml olacak şekilde hücre kültürü hazırlandı. Ertesi gün hücre kültür şişesinin yüzeyini en az %80 kaplayan hücrelerin üzerindeki vasat uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyi FDS' nin uzaklaştırılması amacıyla 3 kez yıkandıktan sonra BRV suşları ve MA-104 hücre kültürleri %10 oranında pankreatinle eş zamanlı olarak muamele edildi. Takiben aynı koşullarda 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücre kültür şişesi hacminin %1'i oranında virus inokulasyonu yapıldı ve 37°C' de, %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde (Jouan, TGO 150, Fransa) 1 saat inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda pankreatinle muamele edilmiş 30 ml GMEM hücre kültür şişesine eklendi. Hücre kültür şişeleri hergün hücre morfolojisindeki sitopatolojik değişimleri saptayabilmek amacıyla invert mikroskop (Nikon, TS100) yardımıyla incelendi. Hücre morfolojisinde gözlenen sitopatolojik etki >%80 düzeyine ulaştığında hücre kültür şişeleri -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda donduruldu ve sonrasında 37°C' ye ayarlanmış su banyosunda çözdürülerek parçalanmış hücrelerden virus partiküllerinin açığa çıkması sağlandı. Elde edilen hücre kültür sıvısına +4°C' de, 3000 rpm' de 10 dakika santrifüjleme işlemi uygulandı ve üstte kalan süpernatant stok tüplerine (LP Italiana, İtalya) porsiyonlanarak -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.2.2. BCoV Üretimi

Virusların üretimi için HRT-18 hücre hattından, 150 cm²' lik hücre kültür şişesinde (Orange scientific, Belçika) 100,000 hücre/ml olacak şekilde hücre kültürü hazırlandı. Ertesi gün hücre kültür şişesinin yüzeyini en az %80 kaplayan hücrelerin üzerindeki vasat uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyi FDS' nin uzaklaştırılması amacıyla 3 kez yıkandıktan sonra hücre kültür şişesi hacminin %1'i oranında virus inokulasyonu yapıldı ve 37°C' de, %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde (Jouan, TGO 150, Fransa) 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 30 ml DMEM hücre kültür şişesine eklendi. Virus ekimini takiben her gün invert mikroskopta hücre morfolojisi incelendi. Monolayer hücrede gözlenen sitopatolojik etki >%80 düzeyine ulaştığında dondurulan hücre kültür şişelerindeki viruslar 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü. Ardından hücre ve virus karışımı santrifüj tüpüne alınarak +4°C'de, 3000 rpm hızda 10 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant stok tüplerine (LP Italiana, İtalya)

porsiyonlanarak -80°C dondurucuda (Panasonic, MDF-US386S, Japonya) muhafaza edildi.

3.2.3. Konvansiyonel Virolojik Tanı Yöntemleri

3.2.3.1. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

3.2.3.1.1. HRT-18 Hücre Kültüründe Virus İzolasyon Çalışmaları

BCoV izolasyonu amacıyla HRT-18 hücre hattından hazırlanan 24 gözlü hücre kültür pleytlerinin her gözüne 100.000 hücre/ml olacak şekilde HRT-18 hücre kültürü süspansiyonundan 1 ml konuldu. Ertesi gün pleyt yüzeyinin >%80' ini kaplayan hücre tabakasının üzerindeki üst sıvı uzaklaştırıldı ve pleyt gözleri FDS' nun uzaklaştırılması amacıyla DMEM ile üç kez yıkandı. Adsorbsiyona bağlı virus inokulasyonu yöntemiyle dışkı örneklerinden hazırlanan inokulumlar hücre kültürüne inokule edildi. Bu amaçla her örnekten pleytin bir gözüne 200 µl inokulasyon yapılarak 37°C' de, %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda içerik uzaklaştırılarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı ve 1 ml DMEM ilave edilerek tekrar aynı koşullarda inkübatöre kaldırıldı. Pleytler 7 gün boyunca hücre morfolojisindeki sitopatolojik değişimleri saptayabilmek için invert mikroskop (Nikon, TS100) yardımıyla incelendi. Yedi günün sonunda pleytler -80°C' ye kaldırılarak donduruldu ve daha sonra 37°C' de çözdürüldü. Uygulanan işlem, inokulasyonu yapılan inokulumların seri pasajlanması için üst sıvıların kullanılması yoluyla üç defa daha tekrarlanarak toplam dört kör pasaj işlemi yapıldı.

3.2.3.1.2. MA-104 Hücre Kültüründe Virus İzolasyon Çalışmaları

BRV izolasyonu Bohl ve ark. (1984) tarafından bildirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulandı. Bu amaçla MA-104 hücre hattından hazırlanan 24 gözlü hücre kültür pleytlerinin her gözüne 100.000 hücre/ml oranında olacak şekilde hazırlanan MA-104 hücre kültürü süspansiyonundan 1 ml konuldu. Sonraki gün pleyt yüzeyinin >%80' ini kaplayan hücre tabakasının üzerindeki üst sıvı uzaklaştırıldı ve

pleyt yüzeyini kaplayan hücrelerin üzeri FDS' nun uzaklaştırılması için serum GMEM ile üç kez yıkandı. Daha önce hazırlanmış olan stok pankreatin (100µl/ml) çözeltisi ve GMEM ile %10 oranında pankreatin içeren virus üretme vasatı hazırlandı. FDS içermeyen GMEM ile hücre yüzeylerinin yıkanma işlemi sonrasında hazırlanmış olan virus üretme vasatı, MA-104 hücre hattı ile kaplı pleyt gözlerine, hücre yüzeyini kaplayacak kadar ilave edildi. Pleytler 37°C'de, %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde 30 dk inkübasyona bırakıldı. Eş zamanlı olarak inokulasyonu yapılacak inokulumlar %10 oranında pankreatin eklenerek muamele edildi ve 37°C'de, %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her örnekten pleytin bir gözüne 200 µl inokulasyon yapıldı ve pleyt aynı koşullarda 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda içerik uzaklaştırılarak her göze 1 ml, %10 oranında pankreatin içeren virus üretme vasatı ilave edilerek ve 37°C'de, %5 CO₂ ihtiva eden inkübatöre kaldırıldı. MA-104 hücre hattı ile kaplı 24 gözlü pleytlere 48 saat aralıklarla hacmen % 10 oranında pankreatin ilave edildi. Pleytler 7 gün boyunca hücre morfolojisindeki sitopatolojik değişimleri tespit etmek amacıyla invert mikroskop (Nikon, TS100) yardımıyla incelendi. Yedi günün sonunda pleytler -80°C' donduruldu ve 37°C' de çözündürüldü. Uygulanan işlem dışkı örneklerinden hazırlanan inokulumların pasajlanması için üst sıvıların kullanılması yoluyla üç defa daha tekrarlanarak örneklere toplam dört kör pasaj işlemi yapıldı.

3.2.3.2. ELISA ile Antijen Tespiti

Çalışma kapsamında toplanan 213 adet ishalleri buzağı dışkı örneğinden hazırlanan inokulumlardan BRV (BioX Diagnostic BIO K 343/2) ve BCoV (BioX Diagnostic BIO K 392/2) tespitine yönelik ticari Ag ELISA kitleri kullanıldı. Kullanılan kitlerdeki test protokolü üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Test sonunda pleytler ELISA okuyucuda (Thermo-Multiskan EX, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda okutularak sonuçlar değerlendirildi. Pozitif eşik değerlerin hesaplanması yine test prosedürüne göre yapıldı.

3.2.3.3. Hemaglütinasyon Testi

Virus izolasyonu sırasında hücre kültüründe morfolojik değişiklik oluşturduğu tespit edilen örnekler, hemaglütinasyon yeteneğinin varlığını tespit etmek amacıyla daha önce bildirilen bir çalışmadaki yöntemde (Ennima ve ark., 2016) sınırlı modifikasyonlar yapılarak hemaglütinasyon testi uygulandı. Bu amaçla MA-104 hücre kültüründe morfolojik değişiklik oluşturan 2 örneğin (RV-36 ve RV-38) 4. pasaj seviyesinden hücre üst sıvısı, 50 µl olacak şekilde lam üzerine damlatıldı. Üzerine 50 µl sığır eritrositiyle hazırlanmış Alsevier solüsyonu damlatıldıktan sonra, lam üzerinde cam çubuk yardımıyla karışımların homojenizasyonu sağlandı. Eş zamanlı uygulama yapılarak, pozitif kontrol olarak 50 µl PI-3 (SF-4 suşu) ve negatif kontrol olarak 50 µl PBS kullanıldı. 30 dk oda ısısında bekletildikten sonra lam üzerinde eritrosit aglütinasyonu olan örnekler pozitif reaksiyon, olmayanlar ise negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

3.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

3.2.4.1. Nükleik Asit İzolasyonu

BRV ve BCoV Ag ELISA kitlerinde pozitif tespit edilen örneklerden viral RNA' nın ekstraksiyon işlemi, ticari olarak temin edilen nükleik asit izolasyon kiti kullanılarak (Macherey-Nagel Nucleospin Virus, Almanya) üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Uygulanan protokol sonucu elde edilen yaklaşık 30 µl hacmindeki nükleik asit cDNA yönteminde kullanılabilecek kadar -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Ticari olarak temin edilen cDNA kiti (Biorad iScript cDNA synthesis kit, 170-8891, ABD), üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Kısaca, BRV ve BCoV Ag ELISA testlerinde pozitif olarak tespiti yapılan örneklerden cDNA elde etmek amacıyla, tüp içerisine 10 µl nükleaz ari su, 4 µl 5x reaksiyon buffer, 1 µl reverz

transkriptaz ve 5 µl nükleik asit eklenerek cDNA reaksiyon karışımı elde edildi. Daha sonra thermal-cycler (Thermo scientific, ABD) cihazı aracılığıyla 30 dakika süreyle 42°C ve 5 dakika 85°C sıcaklık uygulandı. Sonuç olarak 20 µl hacimde cDNA elde edildi ve PCR yönteminde kullanılmak üzere derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

3.2.4.3. BRV RT-PCR Protokolü

Antijen ELISA kitinde BRV' a yönelik pozitif olarak tespiti yapılan örneklerde BRV' un VP6 gen bölgesine spesifik Tablo 3.1' de yer alan primerler kullanılarak RT-PCR uygulandı (Iturriza Gómara ve ark., 2002).

Özet olarak PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 7,5 µl nükleaz ari su, 1 µl VP6-F forward primer (50 pmol), 1 µl VP6-R reverse primer (50 pmol) ve 3 µl DNA eklenerek hazırlandı.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan BRV VP6 gen bölgesi primerleri

| Hedef Gen | Primerler | Pozisyon | Dizin (5'→ 3') | Ürün Uzunluğu |
|-----------|-----------|-----------|----------------------|---------------|
| VP6 | VP6-F | 747-766 | GACGGVGCRACTACATGGT | 379 |
| | VP6-R | 1126-1106 | GTCCAATTCATNCCTGGTGG | |

Elde edilen PCR karışımı 95°C' de 4 dk ön denatürasyon; 35 siklus (95°C 1dk, 58°C 1dk sn, 72°C 2 dk) ve 72°C' de 10 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

3.2.4.4. BRV G ve P genotiplendirme RT-PCR Protokolü

BRV Ag ELISA kitinde pozitif olarak tespiti yapılan örneklerin G6, G8, G10 ve P[1], P[5], P[11] genotiplerinin saptanması amacıyla Tablo 3.2' de yer alan primerler kullanılarak RT-PCR işlemi uygulandı. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları daha önce bildirilmiş bir protokole optimizasyon yapılarak uygulandı (Falcone ve ark., 1999).

G6 genotiplendirme için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Beg9-F primer (50 pmol), 1 µl G6-R primer (50 pmol) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde

edilen PCR karışımı 95°C’ de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus (95°C 1dk, 43,5°C 1dk, 72°C 2 dk) ve 72°C’ de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

Tablo 3.2. Çalışmada BRV G ve P genotiplendirmede kullanılan genotip spesifik primerler

| Hedef Gen | Primerler | Pozisyon | Dizin (5'→3') | Ürün Uzunluğu |
|-----------|-----------|-----------|------------------------------|---------------|
| VP7 | Beg9-F | 1-28 | GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG | 500 |
| | G(6)-R | 499-481 | CTAGTTCCTGTGTAGAATC | 274 |
| | G(8)-R | 274-256 | CGGTTCCGGATTAGACAC | 715 |
| | G(10)-R | 715-697 | TTCAGCCGTTGCGACTTC | |
| VP4 | P-GenF | 1064-1085 | TTCATTATTGGGACGATTCACA | |
| | P[1]-R | 1526-1505 | TTAAATTCATCTCTTAGTTCTC | 463 |
| | P[5]-R | 1725-1704 | GGCCGCATCGGATAAAGAGTCC | 662 |
| | P[11]-R | 1398-1377 | TGCCTCATAATATTGTTGGTCT | 335 |

G8 genotiplendirme için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Beg9-F primer (100 pmol), 1 µl G8-R primer (100 pmol) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 95°C’ de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus (94°C 1dk, 54°C 2dk, 72°C 1 dk) ve 72°C’ de 10 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

G10 genotiplendirme için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Beg9-F primer (10 pmol), 1 µl G10-R primer (10 pmol) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 95°C’ de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus (94°C 1dk, 55°C 1dk, 72°C 2 dk) ve 72°C’ de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

P[1] genotiplendirme için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Pgen-F primer (10 pmol), 1 µl P[1]-R primer (10 pmol) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 95°C’ de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus (94°C 1dk, 45,7°C 1dk,

72°C 2 dk) ve 72°C' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

P[5] genotiplendirme için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Pgen-F forward primer (50 pmol), 1 µl P[5]-R reverse primer (50 pmol) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 95°C' de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus (94°C 1dk, 50°C 1dk, 72°C 2 dk) ve 72°C' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

P[11] genotiplendirme için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Pgen-F forward primer (10 pmol), 1 µl P[11]-R reverse primer (10 pmol) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 95°C' de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus (94°C 1dk, 50°C 1dk, 72°C 2 dk) ve 72°C' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

3.2.4.5. BCoV Nested PCR Protokolü

Antijen ELISA kitinde BCoV' a yönelik pozitif olarak tespiti yapılan örneklerle Tablo 3.3' de yer alan primerler kullanılarak nested PCR işlemi uygulandı (K.O. Cho, Hasoksuz, ve ark., 2001). Özet olarak: Reaksiyonun birinci evresi için PCR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde 37,7 µl nükleaz ari su, 2 µl MgCl₂ (25mM), 5 µl 10x PCR buffer, 1 µl F1 primeri (25 pmol), 1 µl R1 primeri (25 pmol), 1 µl dNTPs (10mM), 0,3 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl) ve 2 µl cDNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 94°C' de 4 dk ön denatürasyon; 35 siklus (94°C 1 dk, 58°C 1 dk, 72°C 2 dk) ve 72°C' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu.

Elde edilen birinci evre ürününden 1 µl ürün, 9 µl nükleaz ari su ile karıştırılıp 1/10 luk sulandırma işlemi yapıldı ve reaksiyonun ikinci evresinde 5 µl ürün kullanıldı. PCR karışım oranlarında değişiklik olmaksızın F2 ve R2 primerleri ile PCR protokolünün ikinci evresi hazırlandı ve aynı thermal-cycler programında 35 siklus olacak şekilde uygulandı.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan BCoV primerleri

| Gen Bölgesi | Primerler | Pozisyon | Dizin (5'-3') | Beklenen ürün büyüklüğü |
|-------------|-----------|----------|----------------------|-------------------------|
| N | F1 | 21-40 | GCAATCCAGTAGTAGAGCGT | 730 |
| | R1 | 731-750 | CTTAGTGGCATCCTTGCCAA | |
| | F2 | 79-98 | GCCGATCAGTCCGACCAATG | 407 |
| | R2 | 467-485 | AGAATGTCAGCCGGGGTAG | |

3.2.4.6. Elektroforez ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PCR uygulamalarıyla elde edilen ürünleri görüntülemek amacıyla 1x TAE buffer (Fermantas, B49, Litvanya) içinde hazırlanan % 2' lik agaroz jele 0,05 µl/ml olacak şekilde Safeview (abm, G108, Kanada) eklenerek (peQLab Biotechnologic GmbH, 35-1010, Almanya) agaroz jel elektroforezi (Thermo scientific, EC320, USA) kullanıldı.

İşlem sırasında 6 µl PCR ürünü ve 2 µl loading dye (Metis, 0601, Türkiye) ile karıştırılarak jele yüklendi ve 30 dakika boyunca 200 volt elektrik akımı uygulanarak ürünlerin jelde yürütülmesi sağlandı. Elde edilen PCR ürünlerinin molekül boyutları, 100 bp' lik açılma aralıklarına sahip DNA ladder (GeneAll, GA-010, Kore) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Yürütme işlemi sonunda jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, 09200439, Fransa) aracılığıyla PCR ürünleri görüntülendi ve kayıt altına alındı.

3.2.4.7. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

PCR uygulaması sonucunda BRV ve BCoV etkenlerine spesifik nükleik asit varlığı tespit edilen örneklerin PCR ürünlerinin dizi analizleri, hizmet alımı (BM Labosis, Türkiye) yoluyla yapıldı. Bu amaçla dizinler BioEdit programı kullanılarak ClustalW çoklu hizalama (ClustalW multiple alignment) fonksiyonu aracılığıyla hizalandı (T. A. Hall, 1999). Kesilen dizilerin, MEGA11 programı kullanılarak 1000 bootstrap replikasyonu ile maksimum olasılık analizi (Maximum likelihood analysis) yapıldı (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). Tez kapsamında çalışılan viruslar için kullanılan referans dizinler, GenBank' tan ilgili gen bölgelerine göre temin edildi.

3.2.4.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE)

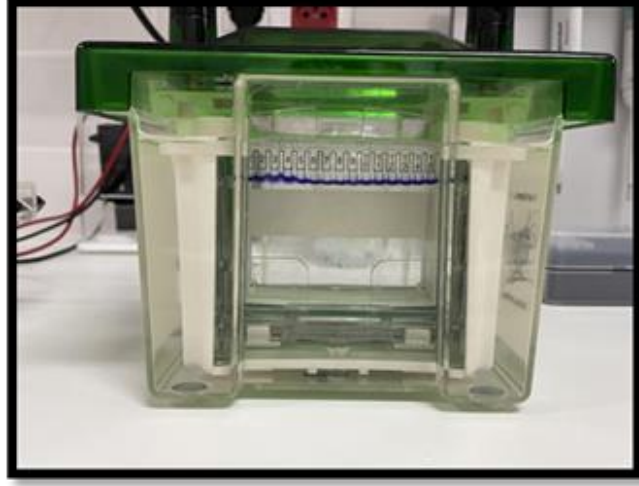
Antijen ELISA kitinde BRV' a yönelik pozitif tespit edilen örneklerden, 11 segmentli RNA' nın gösterilmesi amacıyla SDS-PAGE işlemleri yapıldı. Bu aşamada dışkıdan uygulanan nükleik asit ekstraksiyonu ve PAGE yöntemi ayrıca jelde gümüş nitrat boyaması daha önce bildirilmiş olan protokoller sınırlı modifikasyonlar yapılarak uygulandı (Burgu ve ark., 1995; Herring, Inglis, Ojeh, Snodgrass, & Menzies, 1982).

3.2.4.8.1. Dışkı Örneklerinden RNA Ekstraksiyonu

Deney tüplerine hassas terazi kullanılarak 0,25 gr dışkı tartıldı. Virusun nükleik asit dışındaki yapılarını parçalaması amacıyla deney tüpündeki dışkı üzerine %10 SDS ile muamele edilmiş 0,75ml ekstraksiyon buffer ilave edildi ve tüp çalkalayıcı (vorteks) ile karıştırılarak homojenizasyon sağlandı. Takiben deney tüplerine %60 kirby fenol ve %40 kloroform karışımından ilave edildi. Tekrar çalkalayıcı ile homojenizasyon sağlandıktan sonra +4°C' de, 6000 rpm' de, 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası deney tüpünde üstte kalan ekstraksiyon buffer içerisinde olan RNA' lar otomatik pipet yardımı ile toplanıp RNA ekstraktı olarak -20°C' de muhafaza edildi.

3.2.4.8.2. SDS-PAGE Protokolü

Testin uygulanmasında 12µl RNA ekstratı ve 3µl blue indikatör karıştırılarak poliakrilamid jel kasetlerindeki ilgili kuyucuklara yüklendi. Oda sıcaklığında 6 saat boyunca, 30mA, 200V elektrik akımı uygulanarak SDS-PAGE işlemleri gerçekleştirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Örneklerin poliakrilamid jele yüklenmesi

3.2.4.8.3. Poliakrilamid Jelin Gümüş Nitrat ile Boyanması

Elektroforez işlemi sonrası poliakrilamid jel, 30 dk boyunca jel fiksasyon sıvısında inkübe edildi. Takiben distile su ile yıkandı ve 20 dakika boyunca gümüş nitrat solüsyonunda bekletildi. Süre sonunda distile su ile yıkandıktan sonra developing buffer içerisinde bant oluşumu takip edildi. Bantların jel üzerinde oluşumunu takiben developing buffer uzaklaştırıldı ve distile su ile tekrar yıkandıktan sonra stop solüsyonunda bırakıldı. Jel üzerinde boyama işlemi sonrası elde edilen viral segmentler kayıt altına alındı.

4. BULGULAR

4.1. Konvansiyonel Virolojik Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Kontrol viruslarının üretimi

PCR uygulamalarında pozitif kontrol amacıyla kullanılacak olan BRV ve BCoV suşlarının üretimi sırasında MA-104 ve HRT-18 hücre hatlarında gerçekleştirildi ve mikrotitrasyon yöntemi ile enfektivite güçleri belirlendi (Tablo 4.1). Hücre kültüründe sitopatolojik etki (CPE) oluşturarak üreyen BRV ve BCoV un teyidi amacıyla Ag ELISA ve PCR uygulamaları gerçekleştirildi.

Tablo 4.1. PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak kullanılacak viruslar

| Virus Adı | Virus Suşu | Hücre Hattı | Pasaj Seviyesi (p) | Enfektif titre (DKID ₅₀) |
|-----------|------------|-------------|--------------------|--------------------------------------|
| BRV | G6P[1] | MA-104 | 3p | 10 ^{-3.5} |
| | G6P[5] | | 3p | 10 ^{-5.75} |
| | G10P[11] | | 3p | 10 ^{-3.5} |
| BCoV | Mebus | HRT-18 | 7p | 10 ⁻⁷ |

4.1.2. HRT-18 Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu Sonuçları

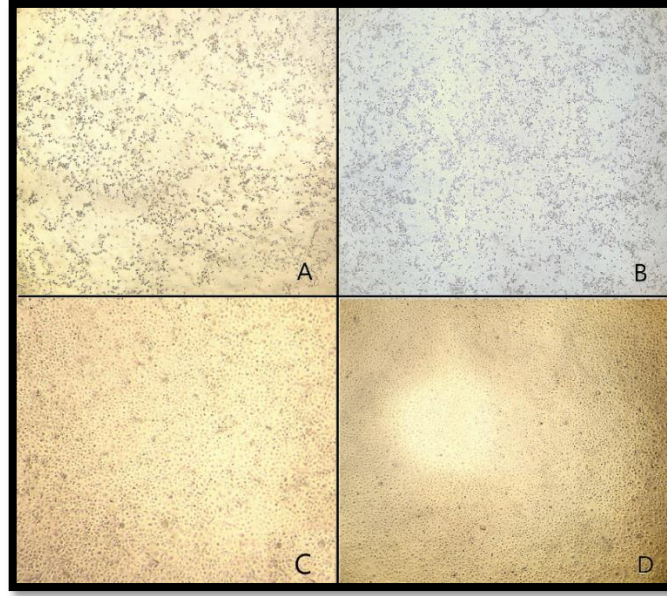
Çalışma kapsamında BCoV izolasyonu amacıyla 213 adet dışkı örneğinden hazırlanan inokulumlar, HRT-18 hücre kültürüne inokule edilerek birbirini takip eden dört kör pasaj işlemine tâbi tutuldu (Şekil 4.1). Her bir pasaj süresince hücre kültürüne inokule edilen örnekler invert mikroskop altında 7 gün boyunca hücre kontrol gözleri ile karşılaştırılarak incelendi. 213 adet dışkı örneğinden hazırlanan inokulumların ekildiği HRT-18 hücre kültüründe sitopatolojik değişiklik gözlenmedi.



Şekil 4.1. HRT-18 ve MA-104 hücre kültürlerinde eş zamanlı olarak yapılan virus izolasyon çalışması

4.1.3. MA-104 Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu Sonuçları

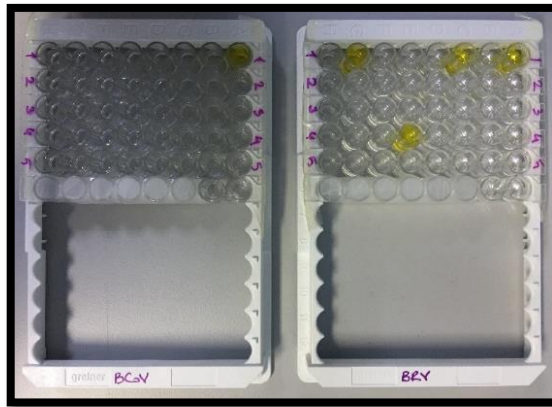
Tez çalışması kapsamında BRV izolasyonu amacıyla 213 adet dışkı örneğinden hazırlanan inokulumlar, MA-104 hücre kültürüne inokule edilerek birbirini takip eden dört kör pasaj işlemine tâbi tutuldu (Şekil 4.1). Her bir pasaj süresince hücre kültürüne inokule edilen örnekler invert mikroskop altında 7 gün boyunca hücre kontrol gözleri ile karşılaştırılarak incelendi. Süreç sonunda MA-104 hücre kültüründe yapılan virus izolasyon çalışmasında toplamda 2 adet dışkı örneğinin (Örnek no: RV-36 ve RV-38) sitopatolojik etki (CPE) oluşturduğu saptandı. Geriye kalan 211 adet dışkı örneğinden hazırlanan inokulumların ekildiği MA-104 hücre kültürlerinde sitopatolojik değişiklik gözlenmedi. CPE oluşturan örneklerin (Örnek no: RV-36 ve RV-38) birinci pasaj seviyesinin ikinci gününden itibaren dördüncü pasaj seviyesine kadar CPE saptandı (Şekil 4.2). İki izolatın hücre kültürüne ekimini takiben dördüncü pasaj seviyesinden elde edilen üst sıvılara, identifikasyon amacıyla BRV ve BCoV Ag ELISA testleri ayrıca BRV RT-PCR ve BCoV nested-PCR testleri yapıldı.



Şekil 4.2. MA-104 hücre kültüründe CPE tespit edilen örneklerin inverted mikroskop görüntüsü ve hücre kontrol gözlemleri (A: RV-36 (4. pasaj), B: RV-38 (4. pasaj), C: Pankreatinle muamele edilmiş hücre kontrol, D: Pankreatinle muamele edilmemiş hücre kontrol)

4.1.4. ELISA ile BRV ve BCoV Antijen Tespiti Sonuçları

Tez çalışması kapsamında toplanan 213 adet dışkı örneği, BRV ve BCoV Ag ELISA test kitleri ile değerlendirildi (Şekil 4.3).



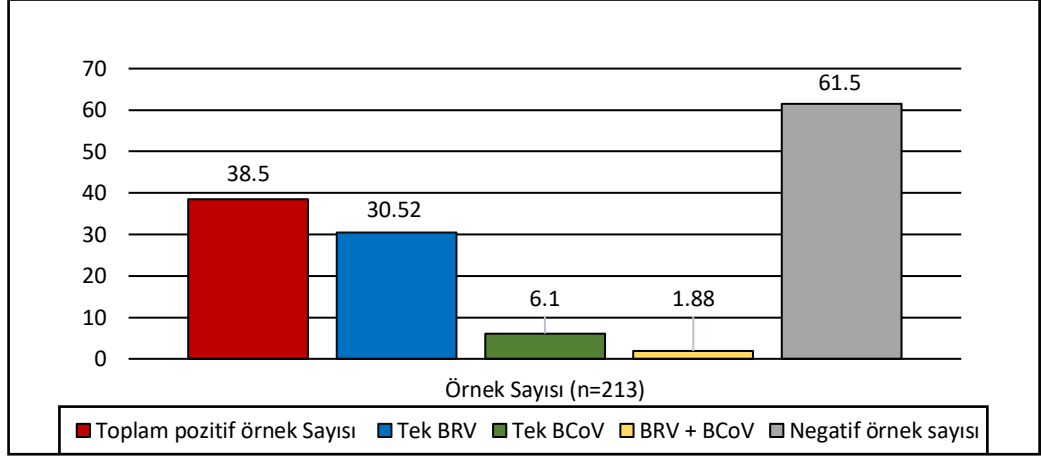
Şekil 4.3. BRV ve BCoV Antijen ELISA uygulaması

Tablo 4.2. Ag ELISA kitinde BRV ve BCoV' a yönelik pozitif örnekler ve sonuçları

| BRV ve BCoV Ag ELISA Pozitif Örnekler | | | | | | | |
|----------------------------------------------|-----------|--------------|---------------|---------------------|-----------|--------------|---------------|
| No | Örnek Adı | BRV Ag ELISA | BCoV Ag ELISA | No | Örnek Adı | BRV Ag ELISA | BCoV Ag ELISA |
| 1. | RV-1 | + | - | 42. | RV-103 | + | - |
| 2. | RV-4 | + | - | 43. | RV-104 | + | - |
| 3. | RV-10 | - | + | 44. | RV-107 | + | - |
| 4. | RV-11 | + | - | 45. | RV-108 | + | - |
| 5. | RV-12 | + | - | 46. | RV-109 | + | - |
| 6. | RV-13 | + | - | 47. | RV-111 | + | - |
| 7. | RV-16 | + | - | 48. | RV-114 | + | - |
| 8. | RV-17 | + | - | 49. | RV-137 | + | - |
| 9. | RV-18 | + | - | 50. | RV-138 | + | - |
| 10. | RV-19 | + | - | 51. | RV-139 | + | - |
| 11. | RV-20 | + | - | 52. | RV-140 | + | - |
| 12. | RV-28 | + | - | 53. | RV-141 | + | - |
| 13. | RV-33 | + | - | 54. | RV-142 | + | - |
| 14. | RV-36 | + | - | 55. | RV-143 | + | - |
| 15. | RV-38 | + | - | 56. | RV-145 | + | - |
| 16. | RV-39 | + | - | 57. | RV-147 | + | - |
| 17. | RV-42 | + | - | 58. | RV-148 | + | - |
| 18. | RV-44 | + | - | 59. | RV-149 | + | - |
| 19. | RV-45 | + | - | 60. | RV-150 | + | - |
| 20. | RV-47 | + | - | 61. | RV-151 | + | - |
| 21. | RV-51 | - | + | 62. | RV-154 | + | - |
| 22. | RV-52 | + | - | 63. | RV-155 | + | - |
| 23. | RV-53 | + | - | 64. | RV-156 | + | - |
| 24. | RV-58 | - | + | 65. | RV-157 | + | - |
| 25. | RV-59 | + | - | 66. | RV-159 | + | - |
| 26. | RV-60 | - | + | 67. | RV-170 | + | - |
| 27. | RV-61 | - | + | 68. | RV-185 | + | - |
| 28. | RV-62 | + | - | 69. | RV-189 | + | - |
| 29. | RV-66 | + | + | 70. | RV-190 | + | - |
| 30. | RV-67 | + | - | 71. | RV-194 | + | - |
| 31. | RV-69 | + | - | 72. | RV-195 | - | + |
| 32. | RV-71 | + | + | 73. | RV-196 | + | - |
| 33. | RV-75 | + | + | 74. | RV-199 | - | + |
| 34. | RV-76 | + | - | 75. | RV-203 | - | + |
| 35. | RV-77 | + | - | 76. | RV-204 | - | + |
| 36. | RV-84 | + | - | 77. | RV-205 | - | + |
| 37. | RV-85 | + | - | 78. | RV-206 | - | + |
| 38. | RV-91 | + | - | 79. | RV-208 | + | - |
| 39. | RV-94 | + | - | 80. | RV-211 | - | + |
| 40. | RV-96 | + | - | 81. | RV-212 | - | + |
| 41. | RV-102 | + | - | 82. | RV-213 | - | + |
| | | | | Genel Toplam | | 69 | 17 |

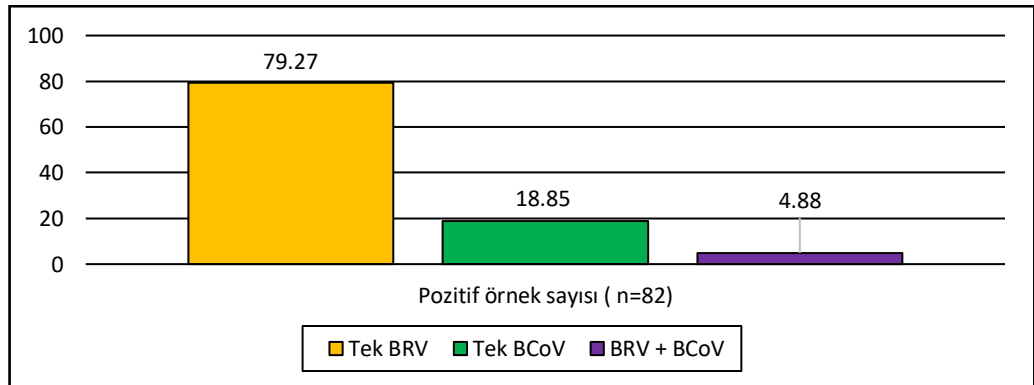
Dışkı örneklerinde BRV ve BCoV' a yönelik tespit oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, toplam 213 dışkı örneğinden 69 adedi (% 32,39) BRV yönünden ve 17 adedi (%7,98) BCoV yönünden pozitif bulundu (Tablo 4.2). Örneklerinin 82 adedinde (% 38,5) araştırılan viruslardan en az birisi (BRV ve/veya BCoV) tespit edilirken, 65 (%30,52) adet dışkı örneğinde tek BRV, 13 (%6,10) adet dışkı örneğinde tek BCoV ve 4 (%1,88) adet dışkı örneğinde BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu saptandı.

Toplanan dışkı örneklerinin 131 (%61,5) adedinde tespit edilmesi hedeflenen virüslara rastlanmadı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. BRV ve BCoV Antijen ELISA kiti ile test edilen sonuçların yüzdeleri dağılımları

Pozitif bulunan 82 dışkı örneği bazında değerlendirme yapıldığında, % 79,27'sinde (65 adet) sadece BRV, % 15,85'inde (13 adet) sadece BCoV ve % 4,88'inde (4 adet) BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu saptandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. BRV ve BCoV Antijen ELISA kiti ile pozitif tespit edilen örneklerin yüzdeleri dağılımları

MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında dışkı örneğinden hazırlanmış inokulumdan elde edilen iki izolatın (RV-36, RV-38) 4. pasaj seviyesinden toplanan üst sıvıları BRV ve BCoV Ag ELISA kiti ile test edildi. BRV Ag ELISA test sonucuna göre 2 izolatın da BRV yönünden pozitif olduğu belirlendi.

4.1.5. Hemaglütinasyon Testi Sonuçları

MA-104 hücre kültüründen elde edilen izolatların identifikasyonunu desteklemek amacıyla virus izolasyonu sırasında elde edilen 2 izolatın (RV-36 ve RV-38) 4. pasaj seviyesinden toplanan üst sıvılarına hemaglütinasyon testi uygulandı ve elde edilen BRV izolatlarının hemaglütinasyon özelliğinin olmadığı tespit edildi.

4.2. Moleküler Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular

Tez çalışmasında antijen ELISA testiyle pozitif tespit edilen 69 adet BRV ve 17 adet BCoV dışkı örneği PCR metodu ile test edildi (Tablo 4.2).

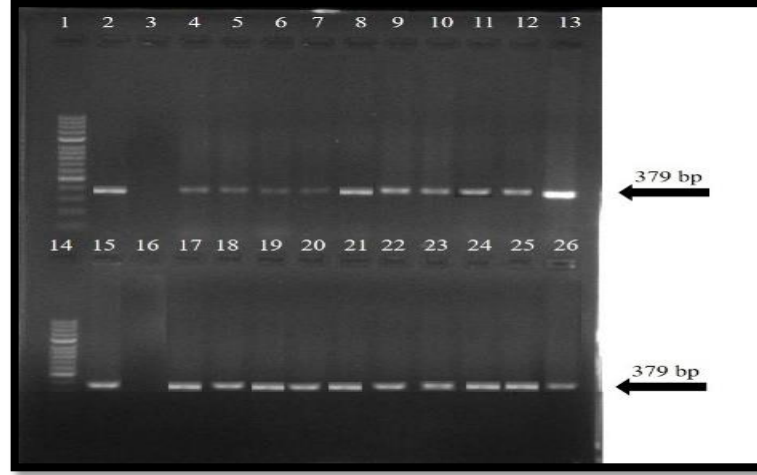
Tablo 4.2. BRV RT- PCR ve BCoV Nested-PCR uygulanan örnekler ve PCR sonuçları

| BRV RT- PCR ve BCoV Nested-PCR Uygulanan Örnekler | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------|-----------|------------|-----------------|---------------------|-----------|------------|-----------------|
| No | Örnek Adı | BRV RT-PCR | BCoV Nested PCR | No | Örnek Adı | BRV RT-PCR | BCoV Nested PCR |
| 1. | RV-1 | + | te | 42. | RV-103 | + | te |
| 2. | RV-4 | - | te | 43. | RV-104 | - | te |
| 3. | RV-10 | + | + | 44. | RV-107 | + | te |
| 4. | RV-11 | - | te | 45. | RV-108 | + | te |
| 5. | RV-12 | + | te | 46. | RV-109 | + | te |
| 6. | RV-13 | + | te | 47. | RV-111 | + | te |
| 7. | RV-16 | - | te | 48. | RV-114 | - | te |
| 8. | RV-17 | - | te | 49. | RV-137 | - | te |
| 9. | RV-18 | + | te | 50. | RV-138 | - | te |
| 10. | RV-19 | + | te | 51. | RV-139 | + | te |
| 11. | RV-20 | + | te | 52. | RV-140 | - | te |
| 12. | RV-28 | + | te | 53. | RV-141 | + | te |
| 13. | RV-33 | + | te | 54. | RV-142 | + | te |
| 14. | RV-36 | + | te | 55. | RV-143 | + | te |
| 15. | RV-38 | + | te | 56. | RV-145 | + | te |
| 16. | RV-39 | - | te | 57. | RV-147 | + | te |
| 17. | RV-42 | + | te | 58. | RV-148 | + | te |
| 18. | RV-44 | + | te | 59. | RV-149 | + | te |
| 19. | RV-45 | + | te | 60. | RV-150 | + | te |
| 20. | RV-47 | - | te | 61. | RV-151 | + | te |
| 21. | RV-51 | te | + | 62. | RV-154 | + | te |
| 22. | RV-52 | + | te | 63. | RV-155 | + | te |
| 23. | RV-53 | + | te | 64. | RV-156 | + | te |
| 24. | RV-58 | te | + | 65. | RV-157 | + | te |
| 25. | RV-59 | + | te | 66. | RV-159 | - | te |
| 26. | RV-60 | te | + | 67. | RV-170 | + | te |
| 27. | RV-61 | te | - | 68. | RV-185 | + | te |
| 28. | RV-62 | - | te | 69. | RV-189 | - | te |
| 29. | RV-66 | + | + | 70. | RV-190 | + | te |
| 30. | RV-67 | + | te | 71. | RV-194 | + | te |
| 31. | RV-69 | + | te | 72. | RV-195 | te | + |
| 32. | RV-71 | - | - | 73. | RV-196 | + | te |
| 33. | RV-75 | + | - | 74. | RV-199 | te | + |
| 34. | RV-76 | + | te | 75. | RV-203 | te | + |
| 35. | RV-77 | + | te | 76. | RV-204 | te | + |
| 36. | RV-84 | + | te | 77. | RV-205 | te | + |
| 37. | RV-85 | + | te | 78. | RV-206 | te | + |
| 38. | RV-91 | - | te | 79. | RV-208 | + | te |
| 39. | RV-94 | + | te | 80. | RV-211 | te | + |
| 40. | RV-96 | + | te | 81. | RV-212 | te | - |
| 41. | RV-102 | + | te | 82. | RV-213 | te | + |
| | | | | Genel Toplam | 53 | 13 | |

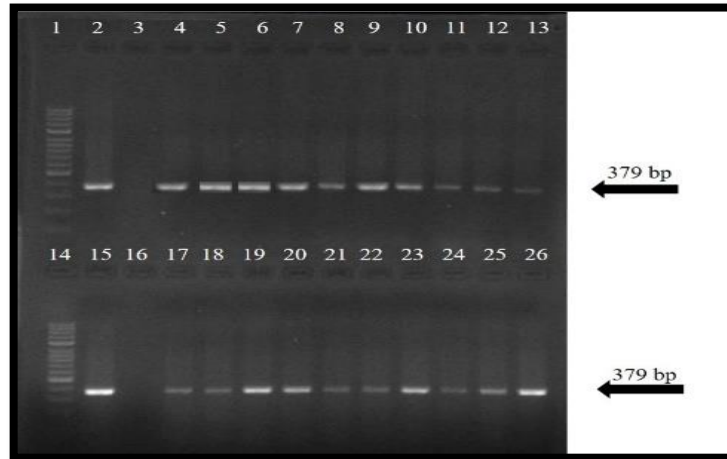
(BRV : Bovine rotavirus, BCoV: Bovine coronavirus, RT-PCR: Reverztranskriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, (+): pozitif , (-): negatif, (te): test edilmedi)

4.2.1. BRV RT-PCR Sonuçları

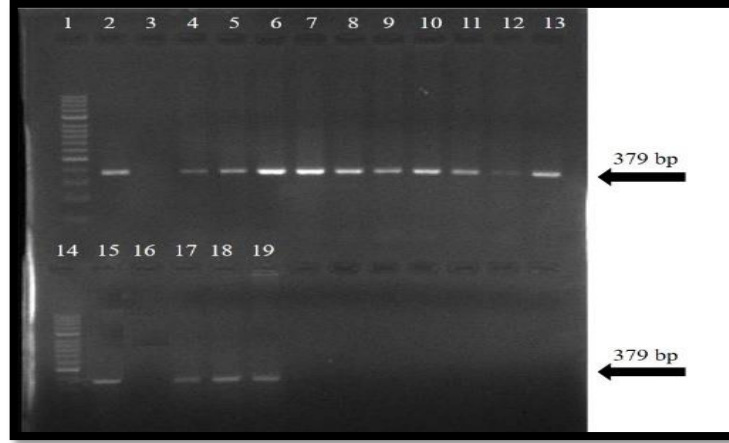
BRV antijen ELISA kiti ile pozitif tespit edilen 69 adet dışkı örneğinin 53 adedi, RT-PCR yöntemi ile de BRV yönünden pozitif olarak saptandı (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).



Şekil 4.6. BRV RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri (1:DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010) 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-1, 5:RV-10, 6: RV-12, 7:RV-13, 8:RV-18, 9:RV-19, 10:RV-20, 11:RV-28, 12:RV-33, 13:RV-36, 14: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 15:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 16: (-) kontrol, 17:RV-38, 18:RV-42, 19:RV-44, 20:RV-45, 21:RV-52, 22:RV-53, 23:RV-59, 24:RV-66, 25:RV-67, 26:RV-69)

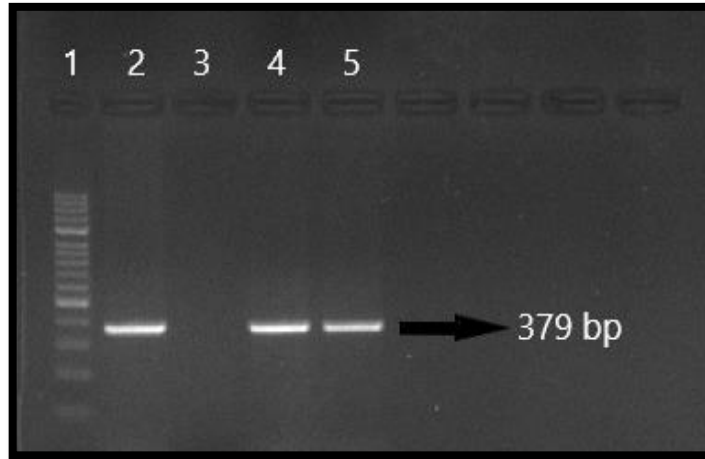


Şekil 4.7. BRV RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-75, 5:RV-76, 6: RV-77, 7:RV-84, 8:RV-85, 9:RV-94, 10:RV-96, 11:RV-102, 12:RV-103, 13:RV-107, 14: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 15:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 16: (-) kontrol, 17:RV-108, 18:RV-109, 19:RV-111, 20:RV-139, 21:RV-141, 22:RV-142, 23:RV-143, 24:RV-145, 25:RV-147, 26:RV-148)



Şekil 4.8. BRV RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-149, 5:RV-150, 6: RV-151, 7:RV-154, 8:RV-155, 9:RV-156, 10:RV-157, 11:RV-170, 12:RV-185, 13:RV-190, 14: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 15:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 16: (-) kontrol, 17:RV-194, 18:RV-196, 19:RV-208)

MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında elde edilen iki izolatın (RV-36, RV-38) 4. pasaj seviyesinden toplanan üst sıvılarına nükleik asit izolasyonu ve cDNA testi sonrası BRV RT-PCR uygulandı. Test sonucuna göre elde edilen iki izolatın da BRV yönünden pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında elde edilen iki izolatın 4. pasaj üst sıvılarına uygulanan BRV RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-36, 5:RV-38)

4.2.2. BRV G ve P Genotiplendirme RT-PCR Sonuçları

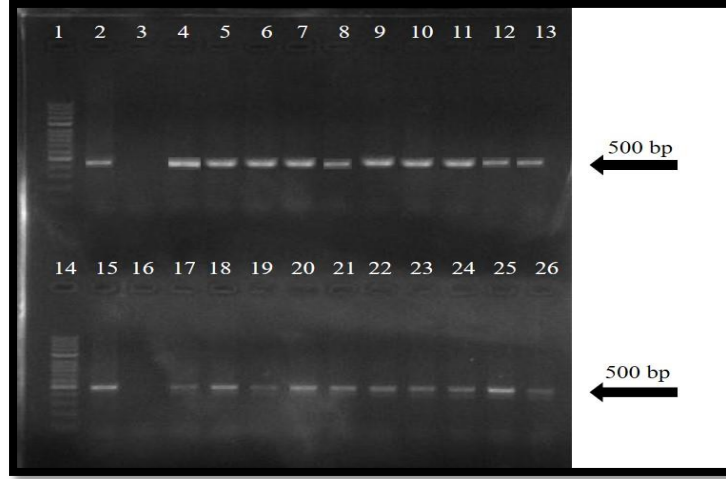
Antijen ELISA testinde BRV yönünden pozitif bulunan 69 dışkı örneğine G genotip (G6, G8 ve G10) ve P genotiplerinin (P[1], P[5] ve P[11]) tespit edilmesi amacıyla RT-PCR uygulandı. Elde edilen bulgular Tablo 4.3 ve Tablo 4.4 de sunulmuştur.

Tespit edilen BRV genotipleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde 32 adet dışkı örneğinde G6 (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11), 8 adet dışkı örneğinde G8 (Şekil 4.12) ve 26 adet dışkı örneğinde G10 genotipi saptanmıştır (Şekil 4.13). Tespit edilen BRV genotiplerinden 25 adedinde yalnız G6, 1 adedinde yalnız G8 ve 23 adedinde yalnız G10 olduğu belirlendi. Çoklu G genotipi olarak 4 örnekte G6+G8 genotipi, 2 örnekte G6+G10 genotipi, 2 örnekte G8+G10 genotipi ve 1 örnekte G6+G8+G10 genotipi tespit edildi Tez çalışması kapsamında 69 adet dışkı örneği arasından 11 adet dışkı örneğinde RT-PCR uygulamaları ile G6, G8 ve G10 genotiplerine rastlanmadı. Elde edilen G genotiplendirme RT-PCR sonuçlarına göre G6 genotipinin tespit edilmesi amaçlanan genotipler arasında daha yüksek olmasına karşın belirgin olarak baskın bir genotipi olmadığı belirlendi (Tablo 4.3).

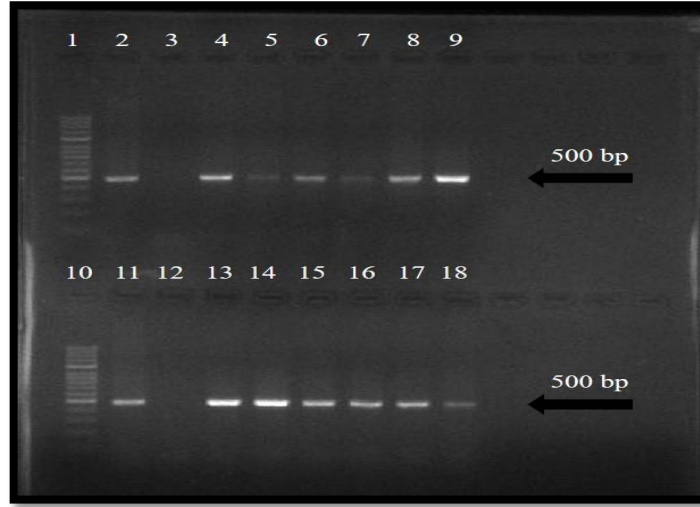
Tablo 4.3 RT-PCR uygulaması sonucu dışkı örneklerinde tespit edilen BRV G genotipleri

| BRV G Genotip RT- PCR Uygulanan Örnekler | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------|-----------|-------------------|----|----|----|---------------------|-------------------|--------|-----------|----------|-----------|
| No | Örnek Adı | G Genotiplendirme | | | No | Örnek Adı | G Genotiplendirme | | | | |
| | | Sonuç* | G6 | G8 | | | G10 | Sonuç | G6 | G8 | G10 |
| 1. | RV-1 | G6 | + | - | - | 36. | RV-96 | G10 | - | - | + |
| 2. | RV-4 | G8+G10 | - | + | + | 37. | RV-102 | G10 | - | - | + |
| 3. | RV-10 | G6+G8 | + | + | - | 38. | RV-103 | G8+G10 | - | + | + |
| 4. | RV-11 | G6 | + | - | - | 39. | RV-104 | G10 | - | - | + |
| 5. | RV-12 | - | - | - | - | 40. | RV-107 | G10 | - | - | + |
| 6. | RV-13 | G6 | + | - | - | 41. | RV-108 | G10 | - | - | + |
| 7. | RV-16 | - | - | - | - | 42. | RV-109 | G10 | - | - | + |
| 8. | RV-17 | G6+G10 | + | - | + | 43. | RV-111 | G10 | - | - | + |
| 9. | RV-18 | G6 | + | - | - | 44. | RV-114 | G10 | - | - | + |
| 10. | RV-19 | - | - | - | - | 45. | RV-137 | - | - | - | - |
| 11. | RV-20 | - | - | - | - | 46. | RV-138 | G10 | - | - | + |
| 12. | RV-28 | - | - | - | - | 47. | RV-139 | G10 | - | - | + |
| 13. | RV-33 | G10 | - | - | + | 48. | RV-140 | G10 | - | - | + |
| 14. | RV-36 | G10 | - | - | + | 49. | RV-141 | G10 | - | - | + |
| 15. | RV-38 | G10 | - | - | + | 50. | RV-142 | G10 | - | - | + |
| 16. | RV-39 | G10 | - | - | + | 51. | RV-143 | G10 | - | - | + |
| 17. | RV-42 | G6+G8+G10 | + | + | + | 52. | RV-145 | G6 | + | - | - |
| 18. | RV-44 | G6 | + | - | - | 53. | RV-147 | G6 | + | - | - |
| 19. | RV-45 | G6 | + | - | - | 54. | RV-148 | G6 | + | - | - |
| 20. | RV-47 | G6 | + | - | - | 55. | RV-149 | G6 | + | - | - |
| 21. | RV-52 | G6 | + | - | - | 56. | RV-150 | G6 | + | - | - |
| 22. | RV-53 | G6 | + | - | - | 57. | RV-151 | G10 | - | - | + |
| 23. | RV-59 | G10 | - | - | + | 58. | RV-154 | G6+G8 | + | + | - |
| 24. | RV-62 | G10 | - | - | + | 59. | RV-155 | G6 | + | - | - |
| 25. | RV-66 | G6 | + | - | - | 60. | RV-156 | G6 | + | - | - |
| 26. | RV-67 | G6 | + | - | - | 61. | RV-157 | G6 | + | - | - |
| 27. | RV-69 | G6 | + | - | - | 62. | RV-159 | G6 | + | - | - |
| 28. | RV-71 | G8 | - | + | - | 63. | RV-170 | G6 | + | - | - |
| 29. | RV-75 | - | - | - | - | 64. | RV-185 | G6+G8 | + | + | - |
| 30. | RV-76 | G6+G10 | + | - | + | 65. | RV-189 | - | - | - | - |
| 31. | RV-77 | - | - | - | - | 66. | RV-190 | G6 | + | - | - |
| 32. | RV-84 | G6 | + | - | - | 67. | RV-194 | G6+G8 | + | + | - |
| 33. | RV-85 | G6 | + | - | - | 68. | RV-196 | G10 | - | - | + |
| 34. | RV-91 | - | - | - | - | 69. | RV-208 | G10 | - | - | + |
| 35. | RV-94 | - | - | - | - | Genel Toplam | | | 32 | 8 | 28 |

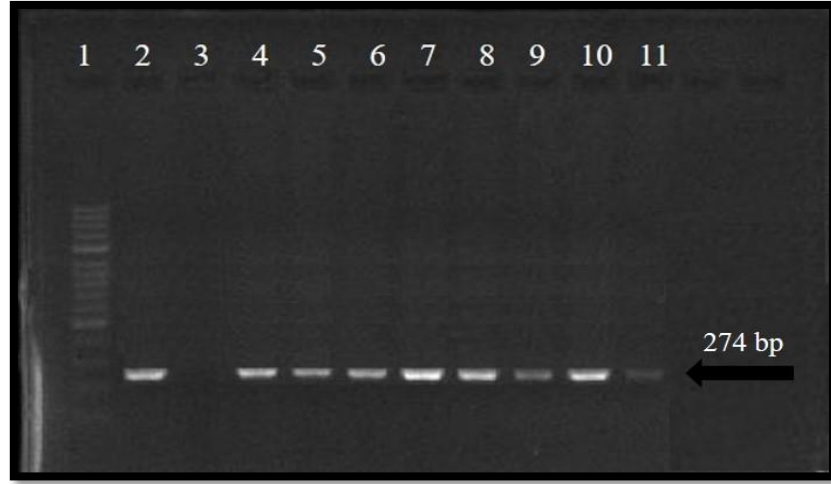
(BRV : Bovine rotavirus, RT-PCR: Reverztranskriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, (+): pozitif , (-): negatif, *: Sonuç bölümünde “-“ işareti olan örnekler test edilen üç G genotipi yönünden negatif bulunmuş olup başka bir genotipe dahil olduğu değerlendirilmelidir)



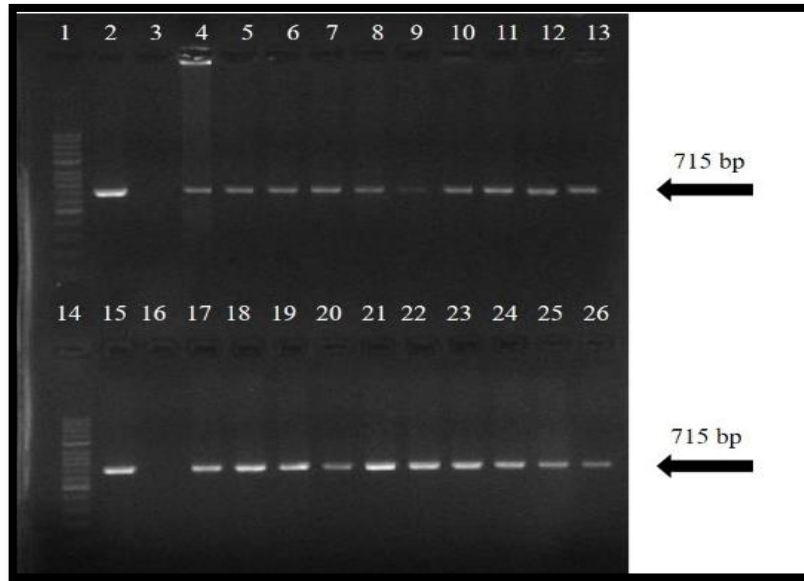
Şekil 4.10. BRV genotip G6 pozitif örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G6P[1] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-1, 5:RV-10, 6: RV-11, 7:RV-13, 8:RV-17, 9:RV-18, 10:RV-42, 11:RV-44, 12:RV-45, 13:RV-47, 14: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 15:(+) kontrol BRV G6P[1] suşu, 16: (-) kontrol, 17:RV-52, 18:RV-53, 19:RV-66, 20:RV-67, 21:RV-69, 22:RV-76, 23:RV-84, 24:RV-85, 25:RV-145, 26:RV-147)



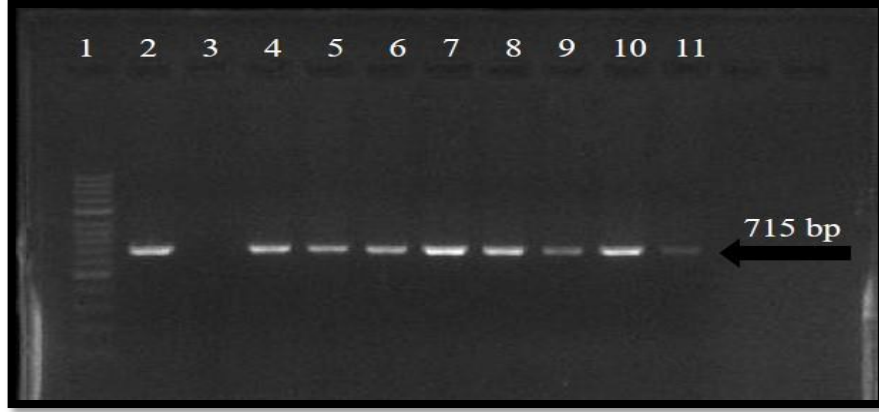
Şekil 4.11. BRV genotip G6 pozitif örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G6P[1] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-148, 5:RV-149, 6: RV-150, 7:RV-154, 8:RV-155, 9:RV-156, 10: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 11:(+) kontrol BRV G6P[1] suşu, 12:(-) kontrol, 13:RV-157, 14:RV-159, 15:RV-170, 16:RV-185, 17:RV-190, 18:RV-194)



Şekil 4.12. BRV genotip G8 pozitif örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G8 suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-4, 5:RV-10, 6: RV-42, 7:RV-71, 8:RV-103, 9:RV-154, 10:RV-185, 11:RV-194)

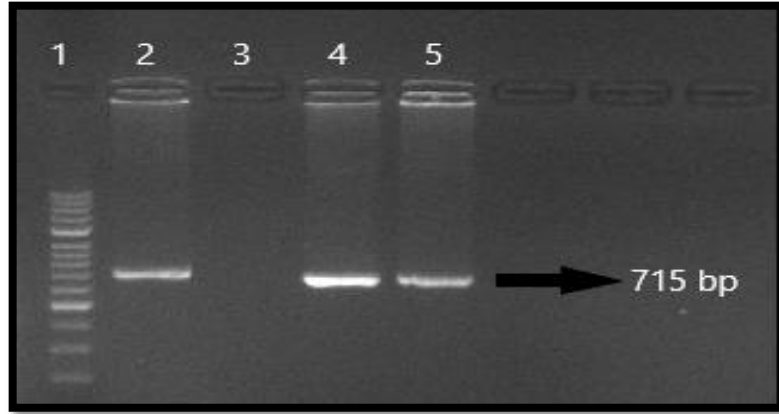


Şekil 4.13. BRV genotip G10 pozitif örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-4, 5:RV-17, 6: RV-33, 7:RV-36, 8:RV-38, 9:RV-39, 10:RV-42, 11:RV-59, 12:RV-62, 13:RV-76, 14: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 15:(+) kontrol BRV G6P[1] suşu, 16: (-) kontrol, 17:RV-96, 18:RV-102, 19:RV-103, 20:RV-104, 21:RV-107, 22:RV-108, 23:RV-109, 24:RV-111, 25:RV-114, 26:RV-138)



Şekil 4.14. BRV genotip G10 pozitif örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-139, 5:RV-140, 6: RV-141, 7:RV-142, 8:RV-143, 9:RV-151, 10:RV-196, 11:RV-208)

RT-PCR ile BRV yönünden pozitif olduğu tespit edilen iki izolatın (RV-36 ve RV-38) da G genotiplendirmesi amacıyla tür spesifik primerler (G6, G8 ve G10) kullanılarak BRV RT-PCR uygulandı. İki izolatın (RV-36 ve RV-38) G10 genotipi yönünden pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında elde edilen iki izolatın 4. pasaj üst sıvılarına uygulanan BRV genotip G10 RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-36, 5:RV-38)

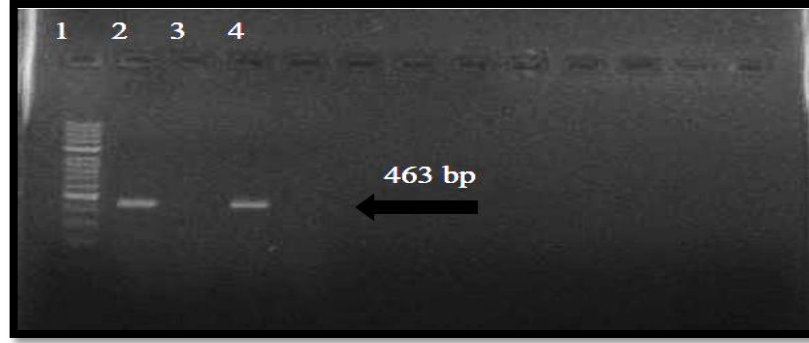
Tablo 4.4. RT-PCR uygulaması sonucu dışkı örneklerinde tespit edilen BRV P genotipleri

| BRV P Genotip RT- PCR Uygulanan Örnekler | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------|-----------|-------------------|------|------|-------|--------------|-----------|-------------------|------|------|-------|
| No | Örnek Adı | P Genotiplendirme | | | | No | Örnek Adı | P Genotiplendirme | | | |
| | | Sonuç* | P[1] | P[5] | P[11] | | | Sonuç | P[1] | P[5] | P[11] |
| 1. | RV-1 | - | - | - | - | 36. | RV-96 | P[11] | - | - | + |
| 2. | RV-4 | P[11] | - | - | + | 37. | RV-102 | P[11] | - | - | + |
| 3. | RV-10 | - | - | - | - | 38. | RV-103 | P[11] | - | - | + |
| 4. | RV-11 | P[1] | + | - | - | 39. | RV-104 | P[11] | - | - | + |
| 5. | RV-12 | - | - | - | - | 40. | RV-107 | P[11] | - | - | + |
| 6. | RV-13 | P[5] | - | + | - | 41. | RV-108 | P[11] | - | - | + |
| 7. | RV-16 | - | - | - | - | 42. | RV-109 | P[11] | - | - | + |
| 8. | RV-17 | - | - | - | - | 43. | RV-111 | P[11] | - | - | + |
| 9. | RV-18 | P[5] | - | + | - | 44. | RV-114 | P[11] | - | - | + |
| 10. | RV-19 | P[5] | - | + | - | 45. | RV-137 | - | - | - | - |
| 11. | RV-20 | - | - | - | - | 46. | RV-138 | P[11] | - | - | + |
| 12. | RV-28 | P[11] | - | - | + | 47. | RV-139 | P[11] | - | - | + |
| 13. | RV-33 | P[11] | - | - | + | 48. | RV-140 | - | - | - | - |
| 14. | RV-36 | P[11] | - | - | + | 49. | RV-141 | P[5] | - | + | - |
| 15. | RV-38 | P[11] | - | - | + | 50. | RV-142 | P[5] | - | + | - |
| 16. | RV-39 | P[11] | - | - | + | 51. | RV-143 | P[5] | - | + | - |
| 17. | RV-42 | - | - | - | - | 52. | RV-145 | P[5] | - | + | - |
| 18. | RV-44 | - | - | - | - | 53. | RV-147 | P[5] | - | + | - |
| 19. | RV-45 | - | - | - | - | 54. | RV-148 | P[5] | - | + | - |
| 20. | RV-47 | - | - | - | - | 55. | RV-149 | - | - | - | - |
| 21. | RV-52 | P[5] | - | + | - | 56. | RV-150 | P[5] | - | + | - |
| 22. | RV-53 | - | - | - | - | 57. | RV-151 | P[11] | - | - | + |
| 23. | RV-59 | - | - | - | - | 58. | RV-154 | - | - | - | - |
| 24. | RV-62 | P[11] | - | - | + | 59. | RV-155 | P[5] | - | + | - |
| 25. | RV-66 | P[5] | - | + | - | 60. | RV-156 | P[5] | - | + | - |
| 26. | RV-67 | P[5] | - | + | - | 61. | RV-157 | P[5] | - | + | - |
| 27. | RV-69 | P[11] | - | - | + | 62. | RV-159 | P[5] | - | + | - |
| 28. | RV-71 | P[5] | - | + | - | 63. | RV-170 | P[5] | - | + | - |
| 29. | RV-75 | - | - | - | - | 64. | RV-185 | P[5] | - | + | - |
| 30. | RV-76 | P[11] | - | - | + | 65. | RV-189 | - | - | - | - |
| 31. | RV-77 | - | - | - | - | 66. | RV-190 | P[5] | - | + | - |
| 32. | RV-84 | P[5] | - | + | - | 67. | RV-194 | P[5] | - | + | - |
| 33. | RV-85 | - | - | - | - | 68. | RV-196 | P[11] | - | - | + |
| 34. | RV-91 | P[11] | - | - | + | 69. | RV-208 | P[11] | - | - | + |
| 35. | RV-94 | P[11] | - | - | + | Genel Toplam | | | 1 | 23 | 25 |

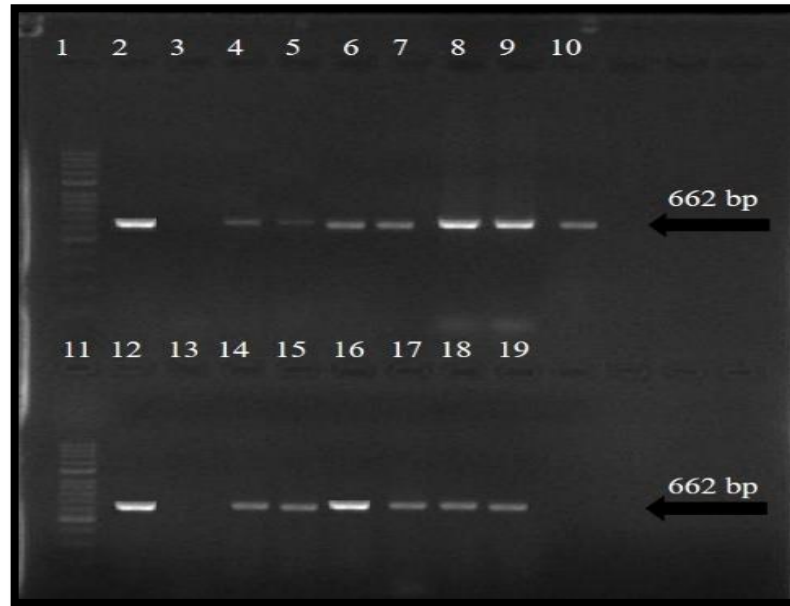
(BRV : Bovine rotavirus, RT-PCR: Reverztranskriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, (+): pozitif , (-): negatif, *: Sonuç bölümünde “-“ işareti olan örnekler test edilen üç G genotipi yönünden negatif bulunmuş olup başka bir genotipe dahil olduğu değerlendirilmelidir)

Tespit edilen genotipler ayrı ayrı değerlendirildiğinde 1 adet dışkı örneğinde P[1] (Şekil 4.16.), 23 adet dışkı örneğinde P[5] (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18.) ve 25 adet dışkı örneğinde P[11] (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20) genotipi saptandı. Bireysel örneklerde çoklu P genotipi tespiti yapılamadı. Tez çalışması kapsamında BRV yönünden pozitif

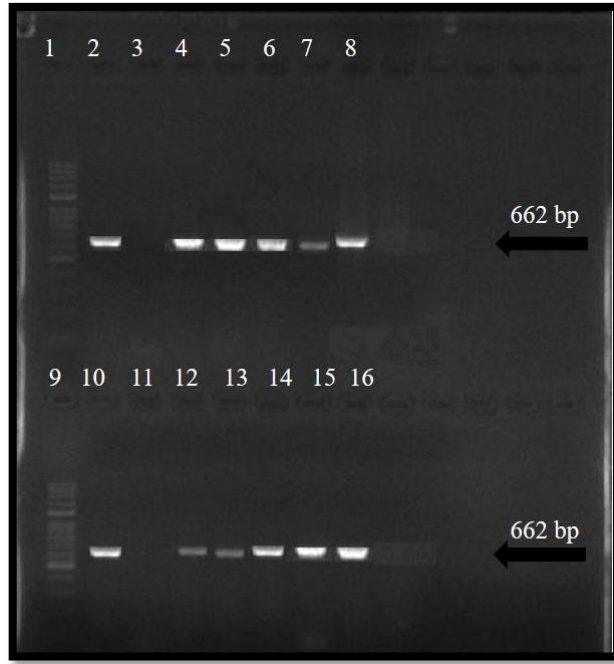
bulunarak test edilen 69 adet dışkı örneğinden 20 tanesinde RT-PCR uygulamaları ile P[1], P[5] ve P[11] genotipleri tespit edilemedi. RT-PCR uygulamaları sonucu tespit edilmesi hedeflenen P genotipleri arasında baskın bir genotipin bulunmadığı, P[5] ve P[11] genotiplerinin birbirine yakın düzeylerde görüldüğü belirlendi (Tablo 4.4).



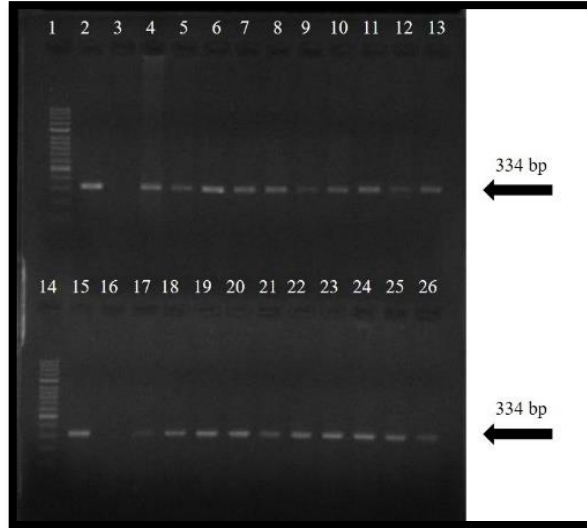
Şekil 4.16. BRV Genotip P[1] RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G6P[1] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-11)



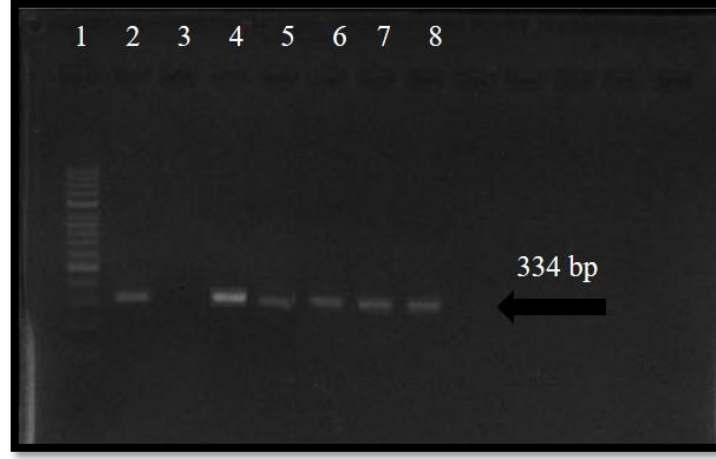
Şekil 4.17. BRV Genotip P[5] RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G6P[5] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-13, 5:RV-66, 6: RV-142, 7:RV-143, 8:RV-145, 9:RV-148, 10:RV-155, 11: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 12:(+) kontrol BRV G6P[5] suşu, 13:(-) kontrol, 14:RV-156, 15:RV-157, 16: RV-159, 17:RV-170, 18:RV-190, 19:RV-194)



Şekil 4.18. BRV Genotip P[5] RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G6P[5] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-18, 5:RV-19, 6: RV-52, 7:RV-67, 8:RV-71, 9: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 10: (+) kontrol BRV G6P[5] suşu, 11: (-) kontrol, 12:RV-84, 13:RV-141, 14:RV-147, 15:RV-150, 16: RV-185)

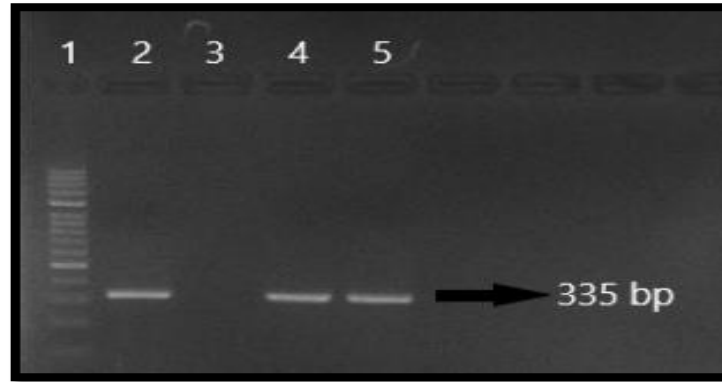


Şekil 4.19. BRV Genotip P[11] RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-4, 5:RV-28, 6: RV-33, 7:RV-36, 8:RV-38, 9:RV-39, 10:RV-62, 11:RV-69, 12:RV-76, 13:RV-91, 14: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 15:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 16: (-) kontrol, 17:RV-94, 18:RV-96, 19:RV-102, 20:RV-103, 21:RV-104, 22:RV-107, 23:RV-108, 24:RV-109, 25:RV-111, 26:RV-114)



Şekil 4.20. BRV Genotip P[11] RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-138, 5:RV-139, 6: RV-151, 7:RV-196, 8:RV-208)

RT-PCR ile BRV yönünden pozitif olduğu tespit edilen iki izolatın (RV-36 ve RV-38) P genotiplendirmesi amacıyla tür spesifik primerler (P[1], P[5] ve P[11]) kullanılarak BRV RT-PCR uygulandı. İki izolatın (RV-36 ve RV-38) da P[11] genotipi yönünden pozitif diğer genotipleri yönünden negatif olduğu tespit edildi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında elde edilen iki izolatın 4. pasaj üst sıvılarına uygulanan BRV genotip P[11] RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BRV G10P[11] suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-36, 5:RV-38)

4.2.3. BRV G ve P Genotip Kombinasyonlarının Sonuçları

Tez çalışması kapsamında tip spesifik primerler ile BRV RT-PCR uygulanan örneklerden elde edilmiş verilerin toplu halde değerlendirilmesiyle toplam 45 örnekte BRV G ve P genotip kombinasyonunun ortaya konulabildiği görüldü (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. BRV G ve P genotipi tespit edilmiş örnekler ve genotip kombinasyonları

| BRV Genotip Kombinasyonu Tespit Edilen Örnekler | | | | | |
|-------------------------------------------------|-----------|----------------------|-----|-----------|----------------------|
| No | Örnek Adı | Genotip Kombinasyonu | No | Örnek Adı | Genotip Kombinasyonu |
| 1. | RV-4 | G8+G10 P[11] | 24. | RV-111 | G10P[11] |
| 2. | RV-11 | G6P[1] | 25. | RV-114 | G10P[11] |
| 3. | RV-13 | G6P[5] | 26. | RV-138 | G10P[11] |
| 4. | RV-18 | G6P[5] | 27. | RV-139 | G10P[11] |
| 5. | RV-33 | G10P[11] | 28. | RV-141 | G10P[5] |
| 6. | RV-36 | G10P[11] | 29. | RV-142 | G10P[5] |
| 7. | RV-38 | G10P[11] | 30. | RV-143 | G10P[5] |
| 8. | RV-39 | G10P[11] | 31. | RV-145 | G6P[5] |
| 9. | RV-52 | G6P[5] | 32. | RV-147 | G6P[5] |
| 10. | RV-62 | G10P[11] | 33. | RV-148 | G6P[5] |
| 11. | RV-66 | G6P[5] | 34. | RV-150 | G6P[5] |
| 12. | RV-67 | G6P[5] | 35. | RV-151 | G10P[11] |
| 13. | RV-69 | G6P[11] | 36. | RV-155 | G6P[5] |
| 14. | RV-71 | G8P[5] | 37. | RV-156 | G6P[5] |
| 15. | RV-76 | G6+G10 P[11] | 38. | RV-157 | G6P[5] |
| 16. | RV-84 | G6P[5] | 39. | RV-159 | G6P[5] |
| 17. | RV-96 | G10P[11] | 40. | RV-170 | G6P[5] |
| 18. | RV-102 | G10P[11] | 41. | RV-185 | G6+G8 P[5] |
| 19. | RV-103 | G8+G10 P[11] | 42. | RV-190 | G6P[5] |
| 20. | RV-104 | G10P[11] | 43. | RV-194 | G6+G8 P[5] |
| 21. | RV-107 | G10P[11] | 44. | RV-196 | G10P[11] |
| 22. | RV-108 | G10P[11] | 45. | RV-208 | G10P[11] |
| 23. | RV-109 | G10P[11] | | | |

Elde edilen bu sonuçlara göre 18 örnekte G10P[11], 16 örnekte G6P[5], 3 örnekte G10P[5], 1 örnekte G6P[1], 1 örnekte G6P[11] ve 1 örnekte G8P[5] genotip kombinasyonu saptandı. Çoklu G genotip kombinasyonları sonuçlarına göre 2 örnekte G8+G10P[11], 1 örnekte G6+G10P[11] ve 2 örnekte G6+G8P[5] genotip kombinasyonları tespit edildi. Tespit edilen BRV genotip kombinasyonları sonucu baskın olan genotipin G10P[11] olduğu belirlendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Tespit edilen BRV genotiplerinin sayıları

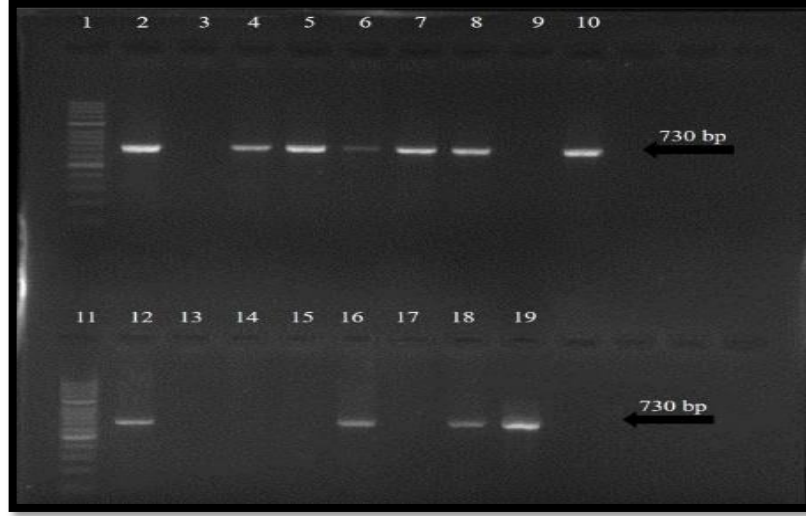
| Genotipler | G6 | G8 | G10 | G6+G8 | G6+G10 | G8+G10 |
|------------|----|----|-----|-------|--------|--------|
| P[1] | 1 | - | - | - | - | - |
| P[5] | 16 | 1 | 3 | 2 | - | - |
| P[11] | 1 | - | 18 | - | 1 | 2 |

G genotipi tanımlanan örnekler arasında 20 adet dışkı örneğinin P genotiplendirmesi, ve P genotipi tanımlanan örnekler arasında 2 adet dışkı örneğini G genotiplendirmesi tez kapsamında tür spesifik (G6, G8, G10 ve P[1], P[5] ve P[11]) primerler kullanılan RT-PCR uygulaması ile yapılamamıştır (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4).

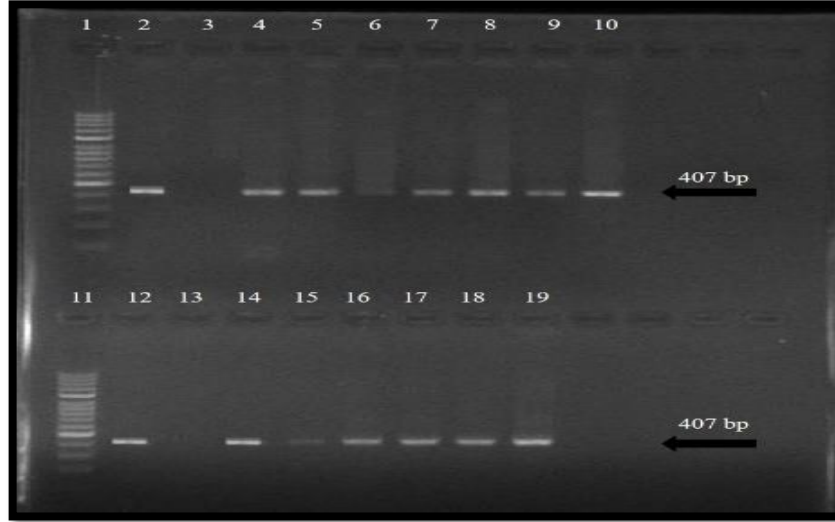
MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında dışkı örneğinden elde edilen iki izolatın (RV-36 ve RV-38) genotip kombinasyonunun da G10P[11] olduğu tespit edildi.

4.2.4. BCoV Nested-PCR Sonuçları

BCoV antijen ELISA kiti ile pozitif tespit edilen 17 adet dışkı örneğinin 13 adedi Nested-PCR yöntemi ile BCoV yönünden pozitif olarak tespit edildi (Tablo 4.9.). PCR' ın 1. evresi sonrası 9 adet dışkı örneği pozitif tespit edilirken (Şekil 4.22), 2. evresi sonrası 13 adet dışkı örneğinin pozitif olduğu saptandı (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. BCoV Nested PCR (1. evre) ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BCoV Mebus suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-10, 5:RV-51, 6: RV-58, 7:RV-60, 8:RV-66, 9:RV-195, 10:RV-199, 11: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 12:(+) kontrol BCoV Mebus suşu, 13:(-) kontrol, 14:RV-203, 15:RV-204, 16:RV-205, 17:RV-206, 18:RV-211, 19:RV-213)



Şekil 4.23. BCoV Nested PCR (2. evre) ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 2:(+) kontrol BCoV Mebus suşu, 3:(-) kontrol, 4:RV-10, 5:RV-51, 6: RV-58, 7:RV-60, 8:RV-66, 9:RV-195, 10:RV-199, 11: DNA Ladder 100bp (GeneAll, GA-010), 12:(+) kontrol BCoV Mebus suşu, 13:(-) kontrol, 14:RV-203, 15:RV-204, 16:RV-205, 17:RV-206, 18:RV-211, 19:RV-213)

MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında elde edilen iki izolatın (RV-36, RV-38) 4. pasaj seviyesinden toplanan üst sıvılarına BCoV nested-PCR uygulandı. Test sonucuna göre elde edilen iki izolatın da BCoV yönünden negatif olduğu tespit edildi.

4.2.5. Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Tez çalışması sonucunda MA-104 hücre kültüründe virus izolasyonu sırasında BRV Ag ELISA ve BRV RT-PCR uygulamaları ile BRV yönünden pozitif tespit edilen 2 izolat (RV-36 ve RV-38) ve farklı il ve işletmelerden BCoV Ag ELISA ve BCoV nested-PCR ile BCoV yönünden pozitif tespit edilen dışkı örnekleri arasından seçilmiş 3 adet dışkı örneği (RV-51, RV-195 ve RV-205) dizi analizi için seçildi. Dizi analizi sonucu gen bankasına kaydedilen dizinlere ait veriler Tablo 4.7’ de gösterilmiştir.

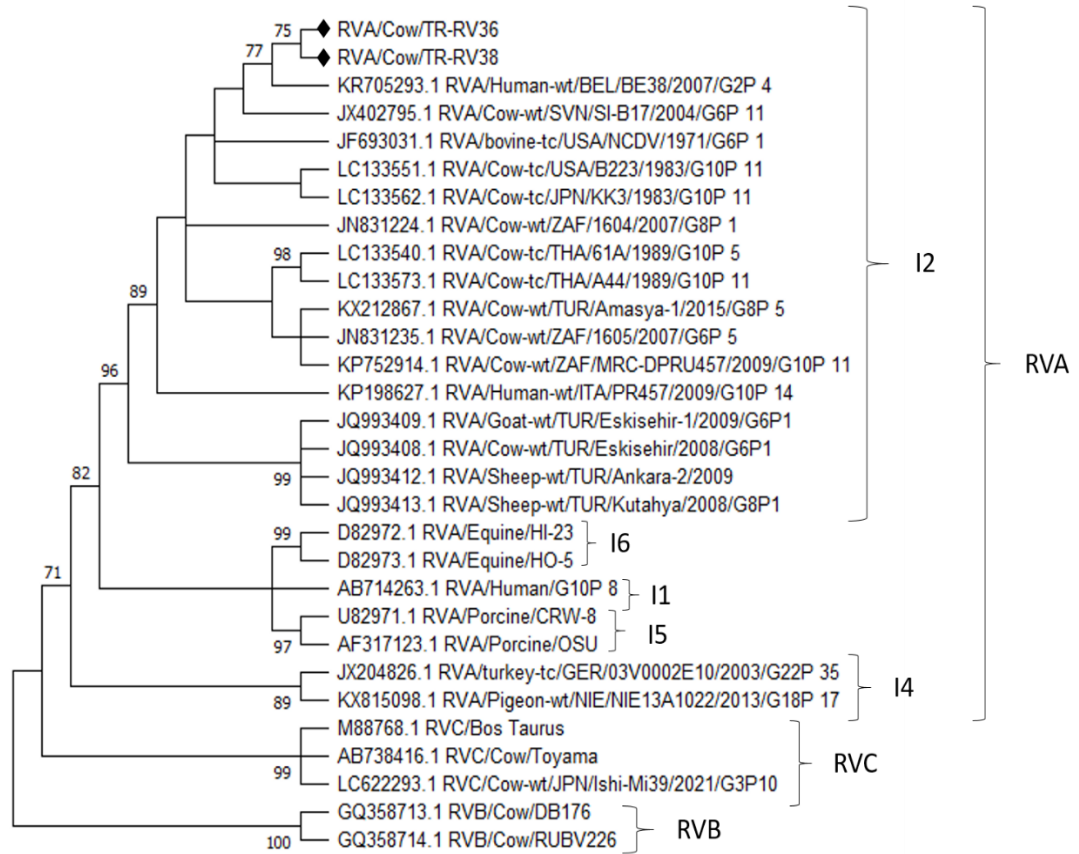
Tablo 4.7. Tez çalışmasında dizi analizi sonucu gen bankasına kaydedilen örneklere ait veriler

| Virus | Gen Bölgesi | Örnek adı | Dizin Adı | GenBank erişim numarası |
|-------------|-------------|-----------|------------------------------------|-------------------------|
| BRV | VP6 | RV-36 | RVA/bovine/TR/RV-36/2019/G10P[11] | OP432877 |
| | | RV-38 | RVA/bovine/TR/RV-38/2019/G10P[11] | OP432878 |
| | | RV-51 | BCoV/TR-Adiyaman/Bovine/RV-51/2020 | OQ927576 |
| BCoV | N | RV-195 | BCoV/TR-Bursa/Bovine/ RV-195/2021 | OQ927577 |
| | | RV-205 | BCoV/TR-Edirne/Bovine/ RV-205/2021 | OQ927578 |

Yapılan PCR uygulamaları sonucu pozitif olduğu tespit edilen örneklerin dizi analizi verileri, MEGA10 programı kullanılarak oluşturulan filogenetik analiz sonuçları aşağıda sunulmuştur.

4.2.5.1. BRV RT-PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç

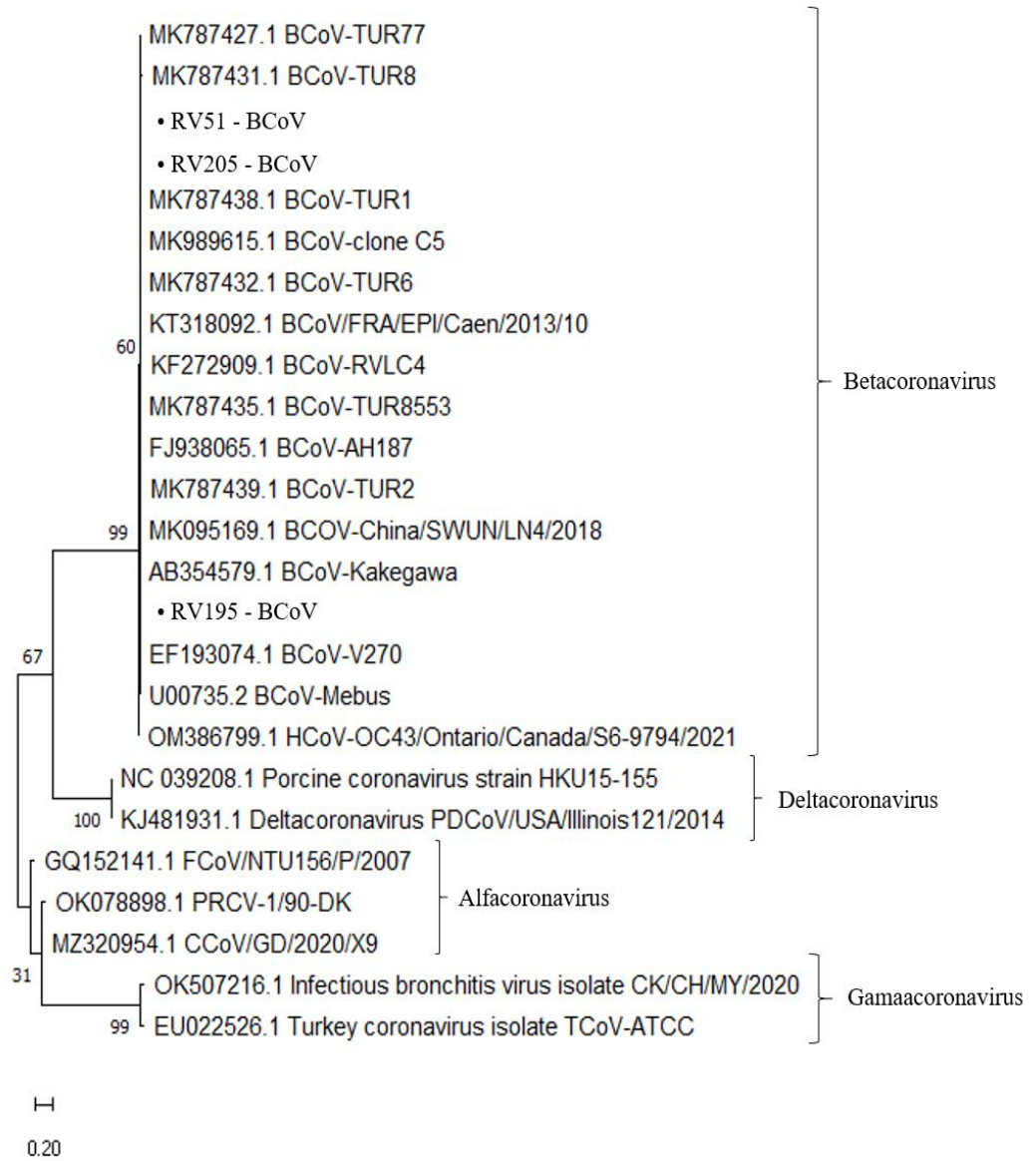
BRV kısmi VP6 gen bölgesine spesifik primerler aracılığı ile uygulanan RT-PCR metodu sonucunda pozitif bulunan RV-36 ve RV-38 kodlu iki izolataın filogenetik analizi sonucunda Bovine Rotavirus Grup A’ da yer aldığı ve VP6 genotiplendirmesine göre I2 genotipine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. RV-36 ve RV-38 kodlu izolatların VP6 proteini gen bölgesine ait dizinler ile oluşturulan filogenetik ağacı. ◆ ‘ işaretli dizinler bu çalışmada elde edilmiştir. Referans dizinler GenBank veri tabanından alınmış olup erişim numaraları ağaçta gösterilmiştir.

4.2.5.2. BCoV Nested PCR Pozitif Örneklerle İlişkin Filogenetik Ağaç

BCoV N gen bölgesine spesifik primer çifti kullanılarak yapılan nested-PCR sonucunda BCoV yönelik nükleik asit tespit edilen 13 adet dışkı örneği arasından, farklı illerden toplanmış 3 adet dışkı örneği (RV-51, RV-195 ve RV-205) dizi analizi için seçildi. Yapılan filogenetik analiz sonucunda 3 dışkı örneğinde bulunan BCoV’un betacoronavirus genusunda yer aldığı saptandı (Şekil 4.25).

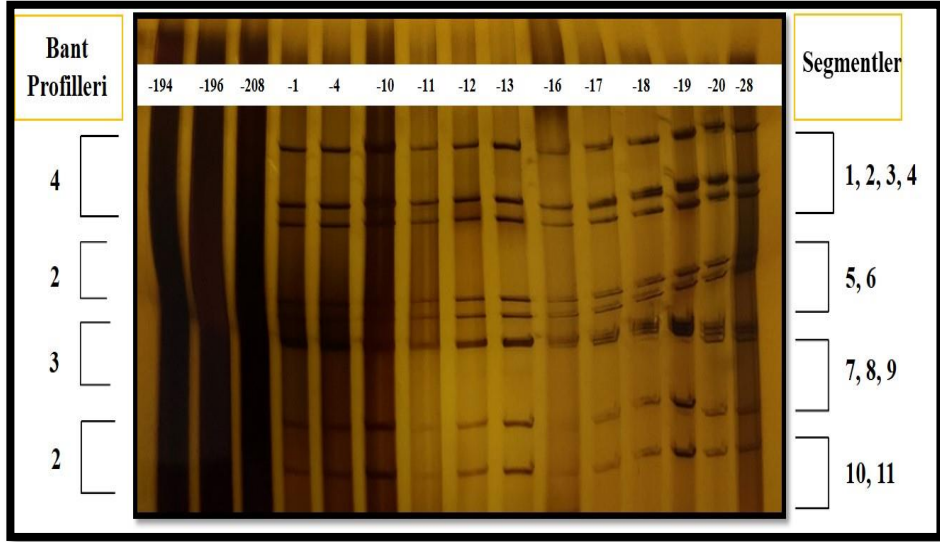


Şekil 4.25. RV-51, RV-195 ve RV-205 kodlu BCoV pozitif örneklerin N gen bölgesine ait dizinler ile oluşturulan filogenetik ağacı. ‘•’ işaretli dizinler bu çalışmada elde edilmiştir. Referans dizinler GenBank veri tabanından alınmış olup erişim numaraları ağaçta gösterilmiştir.

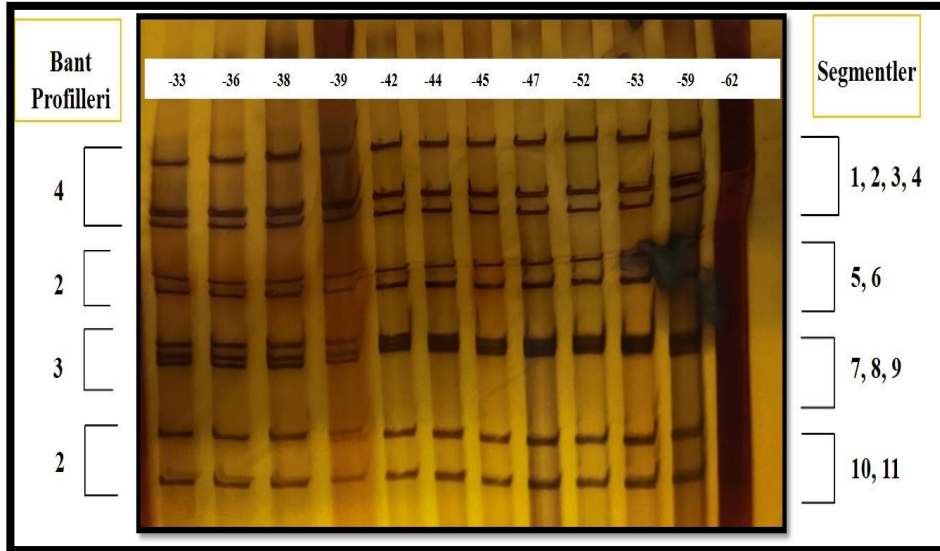
4.2.6. SDS-PAGE Sonuçları

BRV antijen ELISA kiti ile pozitif tespit edilen 69 adet dışkı örneğine ilave bir moleküler teşhis yöntemi olarak BRV viral nükleik asit tespitine yönelik SDS-PAGE testi uygulandı. Test edilen örneklerin tümünde 11 segmenli BRV viral genomu saptandı. SDS-PAGE testi sonuçlarına göre akrilamid jel üzerinde BRV RNA

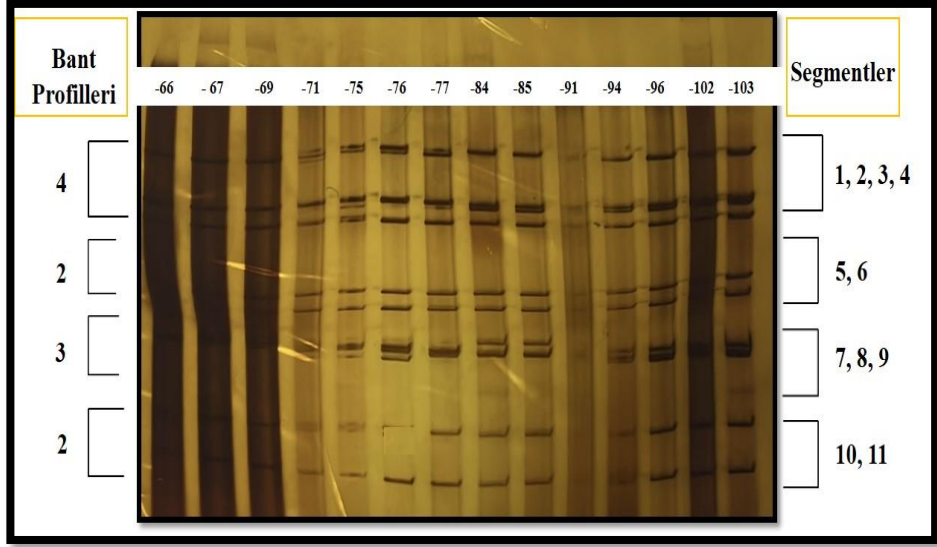
segmentlerinin bant profillerinin 4/2/3/2 şeklinde sıralandığı ve örneklerin bant profillerine göre BRV A grubunda yer aldığı tespit edildi (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30).



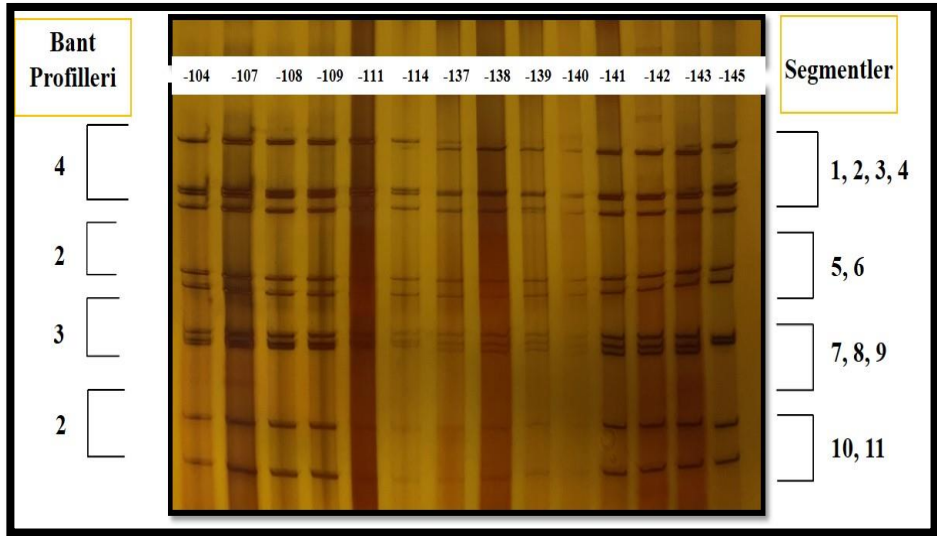
Şekil 4.26. SDS-PAGE uygulaması sonucu poliakrilamid jelde BRV pozitif örneklerin 11 segmenli bant profilleri-1 (Şekil üzerinde örnek numaraları belirtilmiştir.)



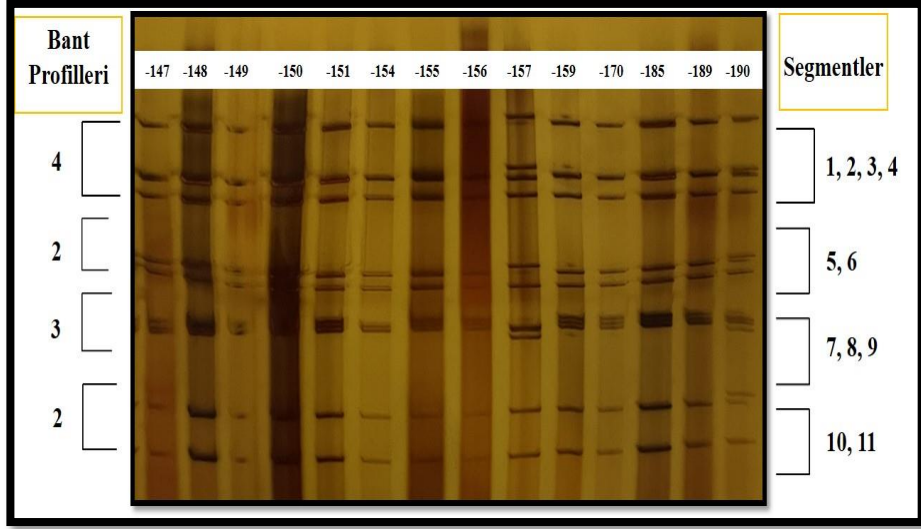
Şekil 4.27. SDS-PAGE uygulaması sonucu poliakrilamid jelde BRV pozitif örneklerin 11 segmenli bant profilleri-2 (Şekil üzerinde örnek numaraları belirtilmiştir.)



Şekil 4.28. SDS-PAGE uygulaması sonucu poliakrilamid jelde BRV pozitif örneklerin 11 segmenli bant profilleri-3 (Şekil üzerinde örnek numaraları belirtilmiştir.)



Şekil 4.29. SDS-PAGE uygulaması sonucu poliakrilamid jelde BRV pozitif örneklerin 11 segmenli bant profilleri-4 (Şekil üzerinde örnek numaraları belirtilmiştir.)



Şekil 4.29. SDS-PAGE uygulaması sonucu poliakrilamid jelde BRV pozitif örneklerin 11 segmenli bant profilleri-5 (Şekil üzerinde örnek numaraları belirtilmiştir.)

4.2.7. Antijen ELISA ve Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu Bulgularının Karşılaştırılması

Tez kapsamında dışkı örneklerinde BRV ve BCoV etkenlerin tespitine yönelik uygulanan testler sonucunda pozitif saptanan örnek sayılarına ilişkin veriler Tablo 4.1’ de sunulmuştur. Antijen ELISA kiti ile test edilen 213 dışkı örneğinde BRV ve BCoV tespiti oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, toplam 213 dışkı örneğinden 69 adedi BRV ve 17 adedi BCoV yönünden pozitif bulundu. Dışkı örneklerinin MA-104 ve HRT-18 hücre hattında olası virus izolasyonu uygulamasında, MA-104 hücre hattında 2 örnekte (RV-36, RV-38) hücre morfolojisinde değişiklik saptandı. HRT-18 hücre hattında yapılan virus izolasyonu uygulamasında tez kapsamında tespit edilmesi hedeflenen virüslere yönelik morfolojik değişiklik saptanmadı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Dışkı örneklerine uygulanan antijen ELISA ve virus izolasyonu yöntemlerdeki verilerin karşılaştırılması

| Virus | Uygulanan Yöntem | Dışkı Örneği (n=213) | Toplam |
|-------|------------------|----------------------|-----------------|
| BRV | BRV Ag ELISA | 69 | 69/213 (%32,39) |
| | Virus İzolasyonu | 2 | 2/213 (%0,93) |
| BCoV | BCoV Ag ELISA | 17 | 17/213 (%7,98) |
| | Virus İzolasyonu | 0 | 0/213 (%0) |

4.2.8. BRV Antijen ELISA Bulgularının BRV RT-PCR Ve SDS-PAGE Bulguları İle Karşılaştırılması

Tez kapsamında BRV antijen ELISA kitiyle BRV yönünden pozitif tespit edilen 69 adet dışkı örneğine BRV RT-PCR ve SDS-PAGE testi uygulandı. BRV RT-PCR uygulaması sonucu 53 örnek BRV varlığı yönünden pozitif bulundu. SDS-PAGE testi sonucu 69 adet dışkı örneğinin tamamında 11 segmentli BRV viral nükleik asidi tespit edildi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. BRV Ag ELISA ile saptanan pozitiflik ile moleküler yöntemlerdeki verilerin karşılaştırılması

| Virus | Uygulanan Yöntem | Pozitif saptanan dışkı Örneği | Toplam |
|-------|------------------|-------------------------------|-----------------|
| BRV | BRV Ag ELISA | 69 | 69/213 (%32,39) |
| | BRV RT-PCR | 53 | 53/69 (%76,81) |
| | SDS-PAGE | 69 | 69/69 (%100) |

4.2.9. BCoV Antijen ELISA Testi İle Elde Edilen Bulguların BCoV Nested-PCR Bulguları İle Karşılaştırılması

Çalışmada BCoV antijen ELISA kiti ile BCoV yönünden pozitif tespit edilen 17 adet BCoV dışkı örneğine, BCoV nested PCR uygulaması ile test edildi. BCoV nested-PCR uygulaması sonucu 14 adet dışkı örneği BCoV yönünden pozitif bulundu (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. BCoV Ag ELISA ile saptanan pozitiflik ile Nested PCR verilerinin karşılaştırılması

| Virus | Uygulanan Yöntem | Pozitif saptanan dışkı Örneği | Toplam |
|-------|------------------|----------------------------------|----------------|
| BCoV | BCoV Ag ELISA | 17 | 17/213 (%7,98) |
| | BCoV nested-PCR | 13 | 13/17 (%76,47) |

Tez çalışması kapsamında uygulanan konvansiyonel ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılmalı olarak değerlendirmesine ilişkin veriler Tablo 4.11 ve Tablo 4.12’ de sunulmuştur.

Tablo 4.11. Pozitif sonuç alınan dışkı örneklerinin konvansiyonel virolojik test sonuçlarına ilişkin veriler

| Konvansiyonel Virolojik Yöntemlere İlişkin Sonuçlar | | | | |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|----------|---------------------------|-------------------|
| Virus | Testedilen örnek sayısı | Ag ELISA | Virus izolasyonu (CPE) | Toplam pozitif |
| BRV | 213 | 69 | 2 | 69 |
| BCoV | 213 | 17 | 0 | 17 |

(BRV: Bovine Rotavirus, BCoV: Bovine Coronavirus, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay CPE: Sitopatojenik etki)

Tablo 4.12. Pozitif sonuç alınan dışkı örneklerinin moleküler virolojik test sonuçlarına ilişkin veriler

| Moleküler Virolojik Yöntemlere İlişkin Sonuçlar | | | | |
|----------------------------------------------------|----------------------------|--------|----------|----------------|
| Virus | Testedilen örnek sayısı | RT-PCR | SDS-PAGE | Toplam pozitif |
| BRV | 69 | 53 | 69 | 69 |
| BCoV | 17 | 13 | te | 17 |

(BRV: Bovine Rotavirus, BCoV: Bovine Coronavirus, SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez, RT-PCR: Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Buzağılarda doğum sonrası ilk 1 aylık dönemde birçok faktöre (enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz) bağlı olarak gelişen ishal sonucu, etkilenen buzağılarda zayıflama, dehidrasyon, sulu kıvamda ve sarı renkte dışkı ile karakterize klinik semptomlar oluşmaktadır. Semptomlar hafif klinik bulgularla başlasa bile enfeksiyona sebep olan enterik virusların immun sistemi baskılaması sonucu etkilenen buzağılarda sekonder bakteriyel enfeksiyonlar görülmektedir (Burgu ve ark., 1995; Çabalar ve ark., 2007; Murphy ve ark., 1999). Ayrıca temizlik ve dezenfeksiyon problemleri, buzağuların doğum sonrası kolostrum almaması ve gebe hayvanların gebeliğin son döneminde aşılammış olması gibi faktörler hastalığın şiddetini arttırmakta ve ölümlerle sonuçlanmasına neden olabilmektedir (Barrington & Parish, 2001). Türkiye’de bugüne kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, buzağılama döneminden sonra sıklıkla ishallerin şekillendiği ve gelişme geriliği, tedavi masrafları ve ölümler ile sığircılık işletmelerinde büyük ekonomik kayıpların ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şahal ve ark., 2018). Buzağılarda şekillenen ishal sonucu oluşan ekonomik kayıpları önlemek ve enfeksiyonları kontrol altında tutmak amacıyla virolojik açıdan hasta buzağılardan doğru zamanda örnek alınarak doğru teşhisin yapılması önem taşımaktadır (Saklı ve ark., 2017). Buna bağlı olarak işletmelerde şekillenen hastalıklar için, korunma ve kontrol programlarının önemli basamaklarından biri olan enfeksiyon sebebi etkenin belirlenerek, mevcut işletmeden elimine edilmesi amacıyla laboratuvar testlerinden yararlanır. Dünya genelinde buzağı ishallerinde en sık karşılaşılan viral etkenler BRV ve BCoV’ dur. Enfeksiyona sebep olan viral etkenlerin tespiti amacıyla hücre kültüründe virus izolasyonu ve EM yöntemi, moleküler tabanlı testlerin geliştirilmesine kadar geleneksel tanı yöntemi olarak yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Burgu ve ark., 1995; Falcone ve ark., 1999). Günümüzde hızlı ve güvenilir sonuçlar veren PCR tabanlı testler, ELISA gibi antijen tespitine yönelik yöntemler ve ayrıca saha şartlarında kolay uygulanabilen ve hızlı sonuç alınan immunokromatografik hızlı tanı test kitleri geleneksel tanı yöntemlerinin yerini almaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de buzağılarda şekillenen ishaller yaygın olarak görülmektedir. Buzağı ishallerinin oluşumunda önemli rol oynayan BRV ve

BCoV' un ülkemizdeki durumu, serolojik ve virolojik olarak farklı yöntemler kullanılarak yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur (Alkan, 1998; Alkan ve ark., 2010; Burgu ve ark., 1995; Çabalar ve ark., 2007; Hasoksuz ve ark., 2005).

Bu tez çalışmasında temel olarak, ülkemizde yapılmış olan çalışmalarda önceden bildirilmiş olan BRV ve BCoV etkenlerinin antijen ELISA ile tespit edilmesi ve viral etkenlere yönelik pozitif bulunan örneklerin moleküler yöntemlerle doğrulanıp karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca tez çalışması kapsamında tespit edilmesi amaçlanan etkenlere yönelik, dışkı örneklerinde hücre kültüründe virus izolasyonu çalışması yapılarak saha izolatlarının elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalına gönderilen dışkı örneklerine ilave olarak saha örnekleme sonucu Türkiye'nin farklı illerinden toplanan 213 dışkı örneği tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir. Toplanan dışkı örnekleri moleküler virolojik yöntemler kapsamında BRV ve BCoV etkenleri yönünden RT-PCR ve BRV tespitine yönelik ilave bir tanı yöntemi olarak SDS-PAGE; konvansiyonel virolojik yöntemler kapsamında ise hücre kültüründe virus izolasyonu ve antijen ELISA yöntemleri ile incelenmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan konvansiyonel ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılmalı olarak değerlendirmesine ilişkin veriler Tablo 4.11' de sunulmuştur. Dünyada yapılan çalışmalarda tespit edilen prevalans değerleri takip edilen örnekleme dönemleri ve/veya uygulanan teşhis yöntemlerinin duyarlılıklarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca farklı ülkelerdeki yetiştirme sistemleri, koruma ve kontrol programları, hayvan hareketleri ve sağlık uygulamalarındaki değişiklikler de önemli bir etken olarak göz önünde bulundurulmalıdır.

5.1. Konvansiyonel Virolojik Yöntemlere Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi

Tüm dünyada ve Türkiye' de yenidoğan buzağı ishal olgularında BRV ve BCoV' un etkin bir şekilde rol aldığı bilinmektedir. Virusların hücre kültüründe üretilmesine yönelik çalışmalarda, tez çalışmasına konu olan önemli enterik virusların (BRV ve BCoV) hücre kültüründe izolasyonu oldukça zordur. Yapılan çalışmalarda BCoV' un hücre kültüründe izolasyonuna yönelik farklı hücre hatlarında, değişik yöntemlerin uygulandığı çalışmalar mevcuttur (Ateş & Yeşilbağ, 2022b; Pestil,

Gülyaz, & Hasöksüz, 2016). Farklı hücre hatları ve farklı proteolitik enzimler kullanılarak BRV'un hücre kültüründe izole edilmesini konu edinen başarılı çalışmalar ortaya konulmuştur (Bohl ve ark., 1984; Ennima ve ark., 2016; McNulty ve ark., 1977; Urasawa ve ark., 1981).

BRV' un hücre kültüründe üretilmesi sırasında virusun hücre kültürüne adsorbsiyonu ve penetrasyonunu kolaylaştırmak amacıyla proteolitik enzimler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda proteolitik enzimler olarak tripsin, TPCK, kristal tripsin ve pankreatin kullanılmıştır (Bohl ve ark., 1984; Ennima ve ark., 2016; McNulty ve ark., 1977; Urasawa ve ark., 1981). Bu enzimler aracılığıyla virusun yapısal proteinlerinden VP4 proteolizis ile VP5 ve VP8' e ayrılmaktadır (Şekil 2.2). BRV' un hücre kültüründe üretilmesine yönelik patogenezi henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte VP5 in sialik asit reseptörleri, VP8 in ise integrin reseptörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Crawford ve ark., 2001). Mevcut çalışmalarda proteolitik enzimler kullanılarak farklı yöntemler denenmiştir. Bu çalışmalarda uygulanan yöntemler arasında yalnız virusun proteolitik enzimlerle muamele edilmesi, yalnız hücre kültürünün proteolitik enzimlerle muamele edilmesi ve virus ile hücre kültürünün eş zamanlı olarak proteolitik enzimlerle muamele edilmesi yer almaktadır (Bohl ve ark., 1984; Ennima ve ark., 2016; Urasawa ve ark., 1981). Sahadan toplanmış dışkı örneklerinde yapılan BRV virus izolasyonu çalışmalarında hücre kültürü olarak MA-104, MDBK, Vero ve PK-15 hücre hatları kullanılmıştır (Bohl ve ark., 1984; Ennima ve ark., 2016; Urasawa ve ark., 1981). İshalli domuzlardan izole edilmiş rotavirusların hücre kültürüne adaptasyonu amacıyla proteolitik enzim olarak pankreatin ve hücre hattı olarak MA-104' ün kullanılmasının uygun olduğu daha önce yapılmış bir çalışmada bildirilmiştir (Bohl ve ark., 1984).

Fas' da immunokromatografik hızlı tanı kitleri ile BRV yönünden pozitif olduğu tespit edilmiş 15 adet dışkı örneği BRV izolasyonu yönünden değerlendirilmiş ve proteolitik enzim olarak TPCK-tripsin, hücre hattı olarak MA-104 kullanılmıştır. Toplanan dışkı örneklerinden 9 adedinde BRV'un hücre kültüründe izolasyonu yapılabilmiş ve elde edilen izolatların rotavirus olduğu real-time PCR ile doğrulanmıştır (Ennima ve ark., 2016). Çin' de yapılmış bir çalışmada Ag ELISA yöntemi ile BRV yönünden pozitif olduğu tespit edilmiş 8 dışkı örneği TPCK-tripsin ile muamele edilmiş ve MA-104 hücre hattında 3 dışkı örneğinden saha izolatu elde

edilmiştir (Elkady ve ark., 2021). Farklı bir çalışmada MDBK hücre hattına adapte edilmiş BRV Northern Ireland (75-447) suşu, BHK-21, Vero, PK-15, MDBK, buzağı böbrek ve buzağı testis hücre hatlarına ekilmiş ve 3 kör pasaj işlemi sonrası elde edilen üst sıvılardan MDBK hücre hattında virus titrasyon testi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan hücre hatlarından sadece MDBK'da 3 kör pasajın her aşamasında virus üremesi tespit edilmiştir (Mcnulty ve ark., 1977). Maymun böbrek hücre hattında (BSC-1) yapılan bir çalışmada 12 adet dışkı örneği tripsin ile muamele edilmiş ve 9 adet dışkı örneğinden saha izolatu elde edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada dışkı örnekleri tripsin ile muamele edilmeden de hücre kültüründe izolasyona alınmış ve 2 adet örnekten saha izolatu elde edilebilmiştir (Babiuk, Mohammed, Spence, Fauvel, & Petro, 1977). Daha önceden izole edilmiş rotavirusların MA-104 hücre kültürüne adaptasyonu amacıyla yapılan çalışmada proteolitik enzim olarak pankreatin kullanılmış ve MA-104 hücrelerinin bu amaç için daha uygun olduğu tespit edilmiştir (Bohl ve ark., 1984).

Ülkemizde rotavirusların hücre kültüründe izolasyonuna yönelik yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Yapılan bir çalışmada 107 adet dışkı örneği MDBK hücre hattında izolasyona alınmış ve proteolitik enzim olarak tripsin kullanılmış fakat hücre morfolojisinde değişiklik (CPE) saptanamadığı bildirilmiştir (Burgu ve ark., 1995). Farklı bir çalışmada 0-1 aylık ishallerden toplanan 140 adet dışkı örneği pankreatin ile muamele edilmiş MA-104 hücre hattında izolasyona alınmıştır. Hücre kültüründe yapılan 6 kör pasaj uygulaması sonucu örneklerin 72 adedinin 1. pasaj, 4 adedinin 4. pasaj, 3 adedinin de 6. pasaj da CPE gösterdikleri tespit edilmiştir (Gülyaz, Turan, Özdemir, & Gülaçtı, 2010). Antijen ELISA yöntemi ile BRV yönünden pozitif olduğu tespit edilen 8 adet dışkı örneğinin MA-104 hücre hattında izolasyona alındığı farklı bir çalışmada proteolitik enzim olarak pankreatin kullanılmıştır. Çalışmada izolasyona alınan dışkı örneklerinin tümünde ikinci günden itibaren hücre morfolojisinde CPE yarattığı tespit edilmiştir (Gülyaz, Hasöksüz, & Özkul, 2006).

Tez çalışmasında ishallerden toplanan 213 adet dışkı örneğinde daha önceden bildirilen bir protokole sınırlı düzeyde değişiklikler yapılarak, proteolizis yaratması amacıyla pankreatin ve hücre hattı olarak MA-104 hücre hattı kullanılmıştır. Toplamda 4 kör pasaj olacak şekilde virus izolasyonu çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonrası 2 adet dışkı örneğinden (RV-36 ve RV-38) BRV saha izolatu elde

edilmiştir. Elde edilen izolatlar BRV Ag ELISA, BRV RT-PCR ve SDS-PAGE testi ile doğrulanmıştır.

Dünyada bovine coronavirusların hücre kültüründe izolasyonuna yönelik güncel olarak sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Brezilya’ da yapılan bir çalışmada 1-4 aylık buzağılardan toplanan dışkı örnekleri hemaglutinasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testi ile incelenmiş ve pozitif olan 20 örnek Hamster Lung (HmLu-1) hücre hattında izolasyona alınmıştır. Örnekler arasından 13 adedi 5. pasaj seviyesinde CPE oluşturmuş ve serum nötralizasyon testi ile BCoV olduğu doğrulanmıştır (Jerez ve ark., 2005). Kore’ de yapılan farklı bir çalışmada kış sezonunda erişkin sığırlardan toplanan 184 adet dışkı örneği Human Rectal Tumor (HRT-18) hücre hattında izolasyona alınmış ve adsorbsiyon sonrası pankreatinle muamele edilmiş üst sıvı, ilgili test gözlerine eklenmiştir. Üç kör pasaj işlemi sonrası toplamda 9 dışkı örneğinden saha izolatu elde edilmiş ve bu izolatlar antijen ELISA, RT-PCR ve immunoflorasan testleri ile BCoV yönünden pozitif saptanmıştır (Park ve ark., 2006). Amerika Birleşik Devletleri’nin Ohio eyaletinde yapılan bir çalışmada ishalleri ruminantlardan toplanan dışkı örnekleri HRT-18 hücre hattında izolasyona alınmış ve adsorbsiyon sonrası üst sıvı proteolitik enzim olarak kullanılan pankreatin ile muamele edilmiştir. İzolasyona alınan örnekler arasından 3 adet dışkı örneğinin ekildiği gözlerde, 2. pasaj seviyesinde sitopatolojik değişiklik tespit edilmiştir. Toplanan üst sıvılar immunoflorasan testi ile değerlendirilmiş ve 3 örnek BCoV antijenleri yönünden pozitif olarak saptanmıştır (Tsunemitsu, El-Kanawati, Smith, Reed, & Saif, 1995). Pankreatin enzimi kullanılarak Ohio’da yapılan farklı bir çalışmada kış dizanterisi geçiren sığırlardan alınan dışkı örneklerinden izole edilen 3 adet BCoV saha izolatu, sığır kökenli primer sığır turbinata, sığır lung, MDBK ve insan kökenli HRT-18 hücre hatlarında pasajlanmış ve sığır kökenli hücre kültürlerinde morfolojik değişim gözlenmezken, HRT-18 hücre hattında 2. pasajdan itibaren sitopatolojik değişim saptanmış ve BCoV yönelik antijenler immunoflorasan testi ile doğrulanmıştır (Benfield & Saif, 1990). Kore’de hücre kültüründe virus izolasyon çalışmasında proteolitik enzim olarak tripsinin kullanıldığı farklı bir çalışmada, BCoV yönünden pozitif saptanmış 16 adet dışkı örneği HRT-18 hücre hattında izolasyona alınmıştır. Her pasaj seviyesinden sonra sitopatolojik değişiklik gözlenmediği takdirde non-sitopatojen BCoV yönünden incelenmesi amacıyla indirekt immunoflorasan testi

uygulanmıştır. İzolasyona alınan örneklerden birinde, 40. pasaj seviyesinde non-sitopatojen BCoV saha suşu (KBR-1) izole edilmiş ve çalışmada güncel aşı suşu olarak aday gösterilmiştir (Shin ve ark., 2022).

Türkiye’ de yapılmış bir çalışmada 0-2 aylık buzağılardan toplanan 100 adet dışkı örnekleri HRT-18 hücre hattında izolasyona alınmış ve proteolitik enzim olarak pankreatin kullanılmıştır. Çalışmada 10 gün süreyle takip edilen hücre kültür kaplarında (25cm²) 3 kör pasaj işlemi yapılmış ve BCoV yönelik saha izolatu elde edilememiştir (Pestil ve ark., 2016). Ülkemizde yapılan farklı bir çalışmada 16 adet ishali buzağıdan toplanan dışkı örnekleri HRT-18 hücre hattında toplamda 4 kör pasaj olacak şekilde izolasyona alınmış ve saha izolatu elde edilememiştir (Ateş & Yeşilbağ, 2022b).

Bu çalışmada BCoV saha izolatu elde etmek amacıyla literatür verileri doğrultusunda HRT-18 hücre hattı kullanılarak virus izolasyon çalışması yapılmıştır. Çalışma kapsamında 213 adet dışkı örneği ile toplamda 4 kör pasaj olacak şekilde virus izolasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Adsorbsiyonlu virus ekimi işlemi takiben 6 gün boyunca her gün inverted mikroskop ile incelenen dışkı örneklerinden BCoV saha izolatu elde edilememiştir.

Tez çalışmasında BRV ve BCoV izolasyonu için kullanılan virus ekim yöntemleri, kullanılan hücre hatları ve virus izolasyonunda kullanılan proteolitik enzim dünyada yapılmış çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Çalışmalarda kullanılan farklı proteolitik enzimlerin ortak amacı proteolizis ile virusun hücreye tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Enterik virusların hücre kültüründe izolasyonu oldukça zordur ve dışkıda bulunan toksinler ve virus harici mikroorganizmalar hücre morfolojisinde, virus üremesi benzeri morfolojik değişimler oluşturmaktadır. BRV için uygun olan hücre hattı daha önceden yapılmış bir çalışmada bildirilmiştir (Bohl ve ark., 1984). Bildirilen bu çalışma doğrultusunda uygulanan yöntemde küçük çaplı değişiklikler yapılarak virus izolasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında diğer çalışmalardan farklı olarak virus ekimi öncesinde eş zamanlı olarak 30 dk boyunca inkübatör koşullarında hem MA-104 hücre hattı hem de ekimi yapılacak inokulum pankreatin ile muamele edilmiştir. Böylece hücre yüzeyinde bulunan sialik asit ve integrin reseptörleri, virusun hücreye tutunmasında ve girişinde görevli olan VP5 ve VP8 yapısal proteinleri proteolizis ile açığa çıkarılarak virusun

hücrede bulunan reseptörlere bağlanması işlemi kolaylaştırılmıştır (Ateş & Yeşilbağ, 2022a). Sonuç olarak 213 adet dışkı örneği arasından MA-104 hücre hatında 2 adet (RV-36 ve RV-38) BRV saha izolatu başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Tez çalışmasında BCoV izolasyonu amacıyla kullanılan HRT-18 hücre hattı dünyada yapılmış izolasyon çalışmasında kullanılan hücre hatlarıyla benzerlik göstermektedir. BCoV izolasyonunda proteolitik enzimlerin plak oluşumu ve sitopatolojik etkiyi arttırdığı tespit edilmiştir (Clark, 1993). Bu tez çalışmasında HRT-18 hücre hattında virus izolasyonu çalışmasında örnekler ya da hücre hattı proteolitik enzim ile muamele edilmemiştir. Toplanmış olan 213 adet dışkı örneğinden BCoV izolasyonu yapılamaması, izolasyon sırasında proteolitik enzim kullanılmaması, örnekleme sırasında ya da toplanan örneklerin laboratuvara ulaştırılması aşamasında dışkı içeriğinde bulunun virüslerin inaktive olması ile ilişkilendirilebilir.

BRV ve BCoV Ag ELISA testi sonuçları ile hücre kültüründe virus izolasyonu sonuçları karşılaştırıldığında Ag ELISA yönteminde daha fazla sayıda pozitif örnek tespit edilmiştir. Bu durum ishal vakalarında virus saçılımı enfeksiyonu izleyen günlerde azalacağından, enfeksiyonun ilk 2 gününde gaita örneğinin alınması ve alınan örneklerin soğuk zincir altında dondurulmadan laboratuvarlara gönderilmesi BRV ve BCoV'unun tespitinde önemlidir. Toplanan gaita örneklerinin BRV ve BCoV yönünden uygun olmayan şartlarda muhafaza edilmesi ve buzağılarda belli bir tedavi süreci sonrası örneklerinin laboratuvara gönderilmesi BRV ve BCoV tespitini zorlaştırmaktadır. Dışkı süpernatantı ile yapılan virus izolasyonu çalışmasında saha izolatu elde edilememesi fakat örneklerin Ag ELISA ile BRV ve BCoV yönünden pozitif olması, dışkıda bulunan BRV ve BCoV'nun inaktif olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca dışkı içeriğinde bulunan viral partikül sayısının hücre kültüründe üretilmeyecek düzeyde düşük olması fakat bu viral partiküllerin duyarlı test yöntemleri ile tespit edilebileceği de göz ardı edilmemelidir.

Dünyada ve ülkemizde birçok araştırmacı tarafından buzağı ishallerinde BRV ve BCoV varlığı farklı test yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda genel olarak BRV diğer enterik virüslere göre ön sırada yer alsa da ülkelere göre bu durum değişkenlik göstermektedir.

Etiyopya' da yapılan bir çalışmada 5 haftalık yaştaki 108 adet ishalleri buzağıdan alınan dışkı örnekleri, 5 farklı enteropatojene karşı test edilmiştir. Çalışmada BCoV %

38,9 oranında, BRV % 16,7 oranında ve BRV-BCoV ikili enfeksiyonu %6,4 oranında tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre BCoV un ülkede buzağı ishalleri etiyojisinde dominant olduğu saptanmıştır (Abraham, Roeder, & Zewdu, 1992). Irak'da yapılmış bir çalışmada, ishalleri buzağılardan toplanan 100 adet dışkı örneği BRV Ag ELISA kiti ile test edilmiş ve BRV yönünden %33,3 oranında pozitiflik belirlenmiştir (Al-Mafraji, 2014). Bangladeş'de yapılan bir çalışmada 1-45 günlük yaşta ishalleri buzağılardan toplanan 100 adet dışkı örneği Ag ELISA kiti ile BRV yönünden test edilmiş ve %16 oranında pozitiflik saptanmıştır. Aynı çalışmada BRV Ag ELISA yöntemi, farklı teşhis yöntemleri ile karşılaştırılmış ve sürüdeki enfekte buzağıları saptamak için en yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü ELISA testi göstermiştir (Barua ve ark., 2021). Fransa'nın güneybatı bölgesinde yapılan bir araştırmada 496 ishal vakası kaydedilmiş ve yenidoğan dönemde ishal gelişen buzağıların oranı %14,6 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada 211 adet dışkı örneği farklı enteropatojenler yönünden pozitif tespit edilmiş ve bunların arasında % 47,4 oranında rotavirus, % 16,5 oranında coronavirus varlığı saptanmıştır (Bendali, Bichet, Schelcher, & Sanaa, 1999). İspanya'da yapılan bir çalışmada, 65 farklı işletmeden toplanan 218 adet ishalleri buzağı dışkı örneklerinde %17,9 oranında BRV, %2,3 oranında BCoV ve %2,3 oranında BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu tespit edilmiştir. Çalışmada tespit edilen duyarlılık ve özgüllüğüne göre ticari Ag ELISA kitinin rutin teşhis çalışmalarında kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (de la Fuente ve ark., 1998). İspanyada yapılan farklı bir çalışmada ise 1-30 günlük ishalleri buzağılardan alınan 218 dışkı örneğinde %41,9 oranında BRV ve %20,4 oranında BCoV tespit edilmiştir. Çalışmada 1-7 günlük 67 adet dışkı örneğinde %4,7 oranında BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu saptanmıştır. Bildirilen çalışmada örnekleme işlemi ve örnekleme zamanının hastalığın teşhisindeki önemi vurgulanmıştır (García ve ark., 2000). İran'da yapılan bir çalışmada 126 adet ishalleri buzağıdan alınan dışkı örneklerinde % 26,98 oranında rotavirus, % 3,17 oranında coronavirus ve 2 haftalık yaşta buzağılardan alınan dışkı örneklerinde %3,5 oranında BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu tespit edilmiştir. Çalışmada enfeksiyonların görülme sıklığı açısından sürü yönetiminin iyileştirilmesi ve buzağıların bağışıklık düzeyinin yükseltilmesi önerilmiştir (Mayameei ve ark., 2010). Mısır'da yapılan bir çalışmada BRV'un tespiti için farklı yöntemler karşılaştırılmış ve 108 adet ishalleri dışkı örneğinde ELISA yöntemi ile %31 oranında pozitiflik saptanmıştır (Soltan ve ark.,

2016a). İsviçre’de 1-21 günlük ishali buzağılardan alınan 147 adet dışkı örneğinde % 27,2 oranında BRV, % 1,4 oranında BCoV ve % 0,7 oranında BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu tespit edilmiştir. Çalışmada hastalığın kontrolüne yönelik uygun bir yaklaşımın belirlenmesi, kolostrum alımı, buzağı beslenmesi, hijyen tedbirleri ve buzağılarda ishale yol açan nedenlerin belirlenmesinin önemi vurgulanmıştır (Lanz Uhde ve ark., 2008). Amerika Birleşik Devletleri’nde yapılan bir çalışmada 63 ishali buzağıdan alınan dışkı örnekleri rotavirus tespitine yönelik farklı test yöntemleri ile incelenerek ELISA yöntemi ile BRV’a karşı % 57 oranında pozitiflik saptanmış ve ELISA yönteminin hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Al-Yousif ve ark., 2001).

Türkiye’ de farklı illerden toplanan 107 adet ishali buzağı dışkı örneğinde ELISA yöntemi ile %27,1 oranında BRV tespit edilmiştir (Burgu ve ark., 1995). Kars’da yapılan bir çalışmada 0-15 günlük yaştaki 112 adet buzağıdan toplanan ishali dışkı örneği BRV’a yönelik ELISA yöntemi ile test edilmiş ve %8,92 oranında pozitiflik saptanmıştır (Yılmaz, 2016). Kars’da yapılan farklı bir çalışmada 624 buzağıdan dışkı örneği toplanmış ve ishali olan 104 dışkı örneğinde ELISA yöntemi ile %1 oranında BCoV ve % 26,9 oranında BRV saptanmıştır (Erdoğan, Ünver, Güneş, & Çitil, 2003). Türkiye’de Trakya bölgesinden toplanan 140 adet ishali buzağı dışkı örneğinde ELISA yöntemi ile %27,1 oranında BRV tespit edilmiştir (Gülyaz ve ark., 2010). Türkiye’ de farklı illerindeki 0-1 aylık yaştaki buzağılardan toplanan 83 adet dışkı örneğinde ELISA yöntemi ile % 71,1 oranında BRV, % 18 oranında BCoV ve % 13,4 oranında BRV ve BCoV ile ikili enfeksiyonu saptanmıştır (Alkan, 1998). Türkiye’de yapılmış farklı bir çalışmada kolostrum almış, 0-1 aylık yaştaki 86 adet buzağıdan alınan ishali dışkı örneği BRV yönünden ELISA yöntemi ile test edilmiş ve %17,8 oranında pozitiflik bildirilmiştir (Yazıcı & Akça, 1993). Samsun’ da yapılan bir çalışmada ishal semptomu gösteren 51 adet buzağıdan dışkı örneği toplanmış ve ELISA yöntemiyle %41,17 BRV ve %1,96 BCoV tespit edilmiştir (Gumusova, Yazıcı, Albayrak, & Çakiroglu, 2007). Van’da yapılan bir çalışmada 89 adet buzağıdan alınan ishali dışkı örneği BCoV yönelik ELISA kiti ile test edilmiş ve %1,12 oranında pozitiflik saptanmıştır (Çabalar ve ark., 2007). Türkiye’nin kuzeybatısında yer alan illerden toplanmış 35 adet ishali buzağı dışkı örneğinde BCoV yönelik ELISA kiti ile %37,1 oranında pozitif örnek tespit edilmiştir (Hasoksuz ve ark., 2005). Konya’ da

yapılan bir çalışmada 100 adet buzağıdan dışkı örneği toplanmış ve ELISA yöntemi ile %18,2 oranında BRV, %13,4 oranında BCoV ve %3,6 oranında BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu tespit edilmiştir (Ok ve ark., 2009). Edirne’de bir işletmeden toplanan 16 adet ishali dışkı örneği BRV ve BCoV yönünden ELISA yöntemi ile test edilmiş ve %12,5 oranında tek BCoV tespit edilirken, tek BRV olgusu ve BRV-BCoV ikili enfeksiyon olgusu saptanmamıştır (Ateş & Yeşilbağ, 2022b).

Tez çalışmasında BRV ve BCoV tespiti amacıyla 213 adet ishali buzağı dışkısı BRV ve BCoV tespitine yönelik ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Tespit oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, toplam 213 dışkı örneğinden 69 adedi (% 32,39) BRV ve 17 adedi (%7,98) BCoV yönünden pozitif bulunmuştur (Tablo 8.). Dışkı örneklerinin 82 adedinde (% 38,5) araştırılan viruslardan en az birisi (BRV ve/veya BCoV), 65 (%30,52) adedinde tek BRV, 13 (%6,10) adedinde tek BCoV ve 4 (%1,88) adedinde BRV ve BCoV ikili enfeksiyonu tespit edilmiştir. Ayrıca toplanan dışkı örneklerinin 131 (%61,5) adedinde tez çalışması kapsamında tespit edilmesi hedeflenen viruslar saptanamamıştır. Dünyada yapılmış olan çalışmalarda ELISA yöntemi ile tespiti yapılan tek BRV olgusu %16 - %57 (Al-Yousif ve ark., 2001; Barua ve ark., 2021), tek BCoV olgusu %1,4 - %38,9 (Abraham ve ark., 1992; Lanz Uhde ve ark., 2008) ve BRV-BCoV ikili enfeksiyon olgusu %0,7 - %6,4 (Abraham ve ark., 1992; Lanz Uhde ve ark., 2008) oranları arasında değişkenlik göstermektedir. Türkiye’ye yapılmış çalışmalarda ise tek BRV olgusu %8,92 - %71,1 (Alkan, 1998; Yılmaz, 2016), tek BCoV olgusu %1 - %37,1 (Erdoğan ve ark., 2003; Hasoksuz ve ark., 2005) ve %3,6-%13,4 oranında BRV ve BCoV ikili enfeksiyon tespiti yapılmıştır. Tez çalışmasında BRV ve BCoV Ag ELISA kiti kullanılarak elde edilen bulgular dünyada ve Türkiye’de yapılan çalışmalarda elde edilen veriler ile paralellik göstermektedir. Elde edilen bu veriler, söz konusu olan viruslara yönelik entansif işletmelerde uygulananın aşılama ve biyogüvenlik önlemlerine rağmen BRV ve BCoV sirkülasyonun önemli ölçüde devam ettiğini göstermektedir.

Hücre kültüründe izole edilmiş bazı BRV suşlarının farklı hayvan türlerinin eritrositleri ile hemaglutinasyon aktivitesini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Nakagomi ve ark., 1992). Bu çalışmada hücre kültürü çalışmasında elde edilen iki izolatin HA aktivitesi, sığır, at ve tavuk eritrositleri ile değerlendirilmiş, ancak pozitif sonuç tespit edilememiştir. Yapılan bir çalışmada kültür ortamında proteolitik enzim

varlığının ve virus dondurulma-çözülme işleminin BRV izolatlarının hemaglutinasyon özelliğine olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir (Ennima ve ark., 2016). Farklı bir çalışmada ise belirgin bir HA aktivitesi olmayan BRV saha suşlarının, ultrasantrifüj işleminden sonra düşük virus titrelerinde dahi HA aktivitesi gösterebileceği bildirilmiştir (Inaba ve ark., 1977). Bu nedenle, tez çalışmasında hücre kültüründe izole edilmiş BRV suşlarının (RV-36 ve RV-38) hemaglutinasyon aktivitesinin saptanamaması, düşük sayıda viral partikül ve ortamda bulunan proteolitik enzim varlığı ile ilişkili olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

5.2. Moleküler Yöntemlere Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi

Rotavirusların yapısında bulunan VP6 yapısal proteininin güçlü şekilde korunmuş bir protein olduğu ve tanımlanmış rotavirus gruplarında çok az değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir. Öte yandan, VP6 proteini rotavirus kapsidinin yapısal bileşenidir ve yaygın olarak PCR uygulamalarında BRV tespiti için hedef gen bölgesi olarak seçilmektedir. Nitekim RT-PCR ile insanlarda ve birçok hayvan türünde rotavirus enfeksiyonlarının tespiti amacıyla VP6 gen bölgesini hedef alan birçok çalışma bulunmaktadır (Alkan, Timurkan, & Karayel, 2015; Ates & Yesilbag, 2023; De Grazia ve ark., 2011; Iturriza Gómara ve ark., 2002; Karayel ve ark., 2017; Matthijnssens ve ark., 2008; Yılmaz, 2016).

Bu çalışmada BRV Ag ELISA yöntemi ile pozitif tespit edilmiş 69 adet dışkı örneği ve 4. pasaj seviyesinde CPE saptanan iki örneğin hücre kültür üst sıvısına, Ag ELISA yönteminde elde edilen verilerin doğrulanması amacıyla BRV RT-PCR uygulanmıştır. Ag ELISA yöntemi ile pozitif bulunan 69 adet dışkı örneği arasından 53 adeti BRV RT-PCR ile pozitif tespit edilmiştir. Diğer yandan hücre kültürü çalışmasında elde edilmiş iki numunenin üst sıvısında da (RV-36 ve RV-38) BRV' a ait viral nükleik asit varlığı belirlenmiştir. Saha izolatlarında BRV varlığı ELISA ve BRV RT-PCR sonuçlarıyla uyumlu olarak tespit edilmiş ve ishalleri buzağılardan toplanan klinik örneklerden rotavirusun başarılı bir şekilde izole edildiği doğrulanmıştır.

Sığırlarda tespit edilen rotaviruslar sıklıkla Rotavirus Grup A'da yer alırken, daha az sıklıkta görülen sığır suşları B ve C gruplarında yer almaktadır (Otto ve ark.,

2015). Ayrıca virusun yapısal proteinlerinden VP6 gen bölgesi, I genotipini temsil etmekte ve VP6 gen dizileri ile genotipleme işleminde sığır ve insan rotavirüsleri, alt genotip I2'de olarak sınıflandırılmaktadır (De Grazia ve ark., 2011; Matthijnssens ve ark., 2008; Matthijnssens ve ark., 2011). Filogeni çalışması sonucunda bu çalışmada elde edilen BRV izolatlarının (RV-36 ve RV-38), sığır rotavirüslerinin sıklıkla bulunduğu Grup A rotavirüs içerisinde ve VP6 gen bölgesine göre I2 genotipinde yer aldığı tespit edilmiştir. BRV RT-PCR uygulaması sonucu elde edilen veriler dünyada yapılmış diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

Dünya çapında yapılan çeşitli çalışmalarda rotavirüslerin VP7 gen bölgesine göre sığır popülasyonlarında yaygın olarak G6 ve G10 genotipleri saptanırken (Cheng ve ark., 2021) G1-G3, G5, G8, G11, G15, G17, G21 ve G24 genotipleri daha az sıklıkla tespit edilmiştir (Papp ve ark., 2013). VP4 gen bölgesi için P[5] ve P[11] genotipleri sıklıkla gözlenmesine rağmen (Cheng ve ark., 2021), P[1], P[3], P[6], P[7], P[14], P[17], P[21], P[29] ve P[38] genotipleri nadiren bildirilmiştir (Papp ve ark., 2013). Grup A rotavirüslerinin ikili genotip kombinasyonu, sığırlarda G6P[1], G6P[5], G10P[11] ve G8P[1]'den oluşur. Türkiye'de yapılan çalışmalarda G6P[5], G6P[11], G10P[5] ve G10P[11] genotip kombinasyonları tespit edilmiştir (Aksoy, Kara, Yağcı, & Azkur, 2021; Alkan ve ark., 2010; Alkan ve ark., 2015; Ates & Yeşilbag, 2023; Ateş & Yeşilbağ, 2022b). Türkiye'nin birçok ilinde BRV genotiplerinin G6P[5], G6P[11], G10P[5], G10P[11] olduğu (Alkan ve ark., 2010; Aydın & Timurkan, 2018) ve bu genotiplerden farklı olarak Amasya'da G8P[5] BRV genotipi rapor edilmiştir (Karayel ve ark., 2017). Ülkemizde yapılan farklı bir çalışmada rotavirüs yönünden pozitif tespit edilmiş örneğe tüm genom analizi uygulanmış ve virusun G15P[21] genotipine sahip olduğu tespit edilmiştir (Karayel-Hacıoğlu ve ark., 2022). Bu tez çalışmasında uygulanan testlerde sahada sığırlarda görülen genotipler arasında yaygın olan ve önceki çalışmalarda tespit edilen G6, G10, G8 ve P[1], P[5], P[11] BRV genotipleri tespit edilmiştir. Ülkemizde bu genotipler arasında G8' in bulunmasına ilişkin veriler oldukça kısıtlıdır (Karayel ve ark., 2017) ve bu durum tez çalışmasında elde edilen verileri değerli kılmaktadır. Nadir olgularda da olsa G8 genotipi için aşı sonrası koruyuculuk problemi yaşanabileceği gözönünde bulundurulmalıdır.

Bu tez çalışmasında ishelli buzağılardan toplanmış 69 adet dışkı örneğine uygulanan G genotiplendirme RT-PCR sonuçlarına göre, G6 genotipinin tespit

edilmesi amaçlanan genotipler arasında daha yüksek olmasına karşın belirgin olarak baskın bir genotip olmadığı tespit edildi. Ayrıca RT-PCR uygulamaları sonucu tespit edilmesi hedeflenen P genotipleri arasında da baskın bir genotipin bulunmadığı, P[5] ve P[11] genotiplerinin birbirine yakın düzeylerde görüldüğü saptandı. Tespit edilen BRV genotip kombinasyonları sonucu baskın olan genotipin G10P[11] olduğu belirlendi. Rotavirus yönünden pozitif tespit edilmiş örneklere uygulanan RT-PCR sonucu çalışma kapsamında tespit edilmesi hedeflenen genotipler ve saptanmış genotip kombinasyonları daha önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda tespit edilen genotiplerin, koruma ve kontrol çalışmalarına rağmen hala buzağılarda ishale neden olduğunu göstermektedir. Tez çalışması kapsamında VP6 gen bölgesine göre BRV yönünden pozitif fakat genotiplendirilmesi yapılamamış örnekler için, sonraki çalışmalarda sığırlarda yaygınlığı daha düşük farklı G ve P genotipleri yönünden araştırılabileceği veya tüm genom analizi gibi daha ileri moleküler yöntemler ile genotiplerinin belirlenebileceği düşünülmektedir.

Coronavirüsler için moleküler çalışmalarda genetik değişimlerden az etkilenen bir viral protein olduğu için N gen bölgesi en sık kullanılan hedef gen bölgelerinden biridir (Alkan ve ark., 2011; Kyoung Oh Cho ve ark., 2001; Fernandes ve ark., 2018; Hasoksuz ve ark., 2005; Hurst ve ark., 2013; Pestil ve ark., 2016; Saklı ve ark., 2017; H. Tsunemitsu ve ark., 1995).

Tez çalışmasında BCoV Ag ELISA testinde BCoV'a yönelik taramalarda pozitif olan örnekler, N gen bölgesine spesifik primer çifti kullanılarak BCoV nested-RT-PCR uygulaması ile de değerlendirilmiştir. BCoV yönelik nükleik asit tespit edilen 13 adet dışkı örneği arasından, farklı illerden toplanmış 3 adet dışkı örneğinin (RV-51, RV-195 ve RV-205) dizi analizi sonucu yapılan filogenetik analizde betacoronavirus genusunda yer aldığı saptandı.

RT-PCR yönteminde düşük miktarda viral partikülün tespit edilme olasılığı daha yüksektir (Soltan ve ark., 2016). Çalışmada BRV ve BCoV yönünden pozitif tespit edilen örneklerin doğrulanması amacıyla yapılan PCR uygulamalarında, Ag ELISA yöntemine göre daha az sayıda örneğin pozitif tespit edilmesi hassas yapıdaki RNA genomunun toplanan dışkı örneklerinin dondurulup çözülmesi ve stoklanarak bekletilmesi sürecinde hasar görmesiyle ilişkilendirilmiştir.

BRV ve BCoV enfeksiyonlarının sahada doğal enfeksiyonlara bağılı olarak çok yaygın olması ve ineklerin çoğunun seropozitif olmasına rağmen, sütteki antikor titrelerinin koruyucu olmayan seviyelere düştüğü gösterilmiştir (Şahna & Alkan, 2013; Wieda ve ark., 1987). Yeni doğan buzağıları korumak için ineklerin BRV ve BCoV'a karşı aşılınması ile kolostrumdaki maternal antikor düzeyi artırılabilir. BRV ve BCoV aşılması, genellikle E. coli ile kombinasyon halinde, annelerde bağıışıklığı ve maternal antikor iletimini teşvik etmek için gebe ineklere uygulanır. Aşının koruma düzeyi, aşı suşunun ve saha suşunun özelliğine bağılıdır. Aşıların sahadaki virus tiplerini karşılamaması durumunda aşılamanın sahada dolaşımda olan suşlara karşı koruyucu olmayabileceği düşündürmektedir (Gomez & Weese, 2017). Türkiye'de BRV ve BCoV için kullanılan aşılar, çoğunlukla BRV'nin G6, G10, P[1], ve P[5] genotiplerini içermektedir. Türkiye'de dolaşımdaki BRV genotipleri G6, G8, G10, P[5] ve P[11] olarak tanımlanmaktadır. Bu tez çalışmasında uygulanan testlerde sahada sığırlarda görülen genotipler arasında yaygın olan ve önceki çalışmalarda tespit edilen G6, G10, G8 ve P[1], P[5], P[11] BRV genotipleri tespit edilmiştir. Ülkemizde bu genotipler arasında G8' in bulunuşuna ilişkin veriler oldukça kısıtlıdır (Karayel ve ark., 2017) ve bu durum tez çalışmasında elde edilen verileri değerli kılmaktadır. Nadir olgularda da olsa G8 genotipi için aşı sonrası koruyuculuk problemi yaşanabileceği gözönünde bulundurulmalıdır.

SDS-PAGE yöntemi, saha numunelerinden ve hücre kültür sıvılarından BRV tespiti için kullanılan altın standart metodolojilerden biri olup, rotavirus tespiti ve gruplandırılmasında bu yöntemin kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Ates & Yesilbag, 2023; Barman ve ark., 2004; Burgu ve ark., 1995; Çabalar ve ark., 2007; Özkul, Yeşilbağ, Karaoğlu, & Burgu, 2002; Rahman ve ark., 2005). Bu yöntemde rotavirusların A, B ve C grupları, poliakrilamid jel üzerinde rotavirus genom segmentlerinin oluşturduğu bant profillerine göre tanımlanır. Bu yaklaşımda, 11 segmentli Grup A rotavirusları poliakrilamid jel üzerinde 4/2/3/2 olacak şekilde bant profili sergilerken, Grup B rotaviruslarının bant profilleri 4/2/2/3 ve Grup C rotavirusları 4/3/2/2 olacak şekilde bant profili sergilemektedir (Barman ve ark., 2004; Rahman ve ark., 2005). Bu çalışmada Ag ELISA yöntemi ile BRV yönünden pozitif tespit edilmiş 69 adet dışkı örneği, SDS-PAGE yöntemi ile de değerlendirilmiştir. Her iki yöntemde de BRV yönünden pozitif tespit edilen örnek sayıları birbiri ile

uyumludur ve örnekler 4/2/3/2 olacak şekilde bant profili sergilemiştir. Poliakrilamid jel üzerinde sergilenen bant profillerine göre 69 adet dışkı örneğinin Rotavirus Grup A da yer aldığı belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında uygulanan SDS-PAGE yöntemi sonucu elde edilen sonuçlar, daha önce bildirilen çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca hücre kültürü çalışmasında elde edilen RV-36 ve RV-38 saha izolatlarının genom segmentleri de poliakrilamid jel üzerinde 4/2/3/2 olacak şekilde sıralanmıştır. Rotavirus VP6 gen bölgesine göre yapılan filogeni çalışmasında da iki saha izolatının Rotavirus Grup A' da yer aldığı belirlenmiş ve SDS-PAGE testi sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca SDS-PAGE yönteminin eş zamanlı olarak rotavirus teşhisi ve virusun hangi grupta yer aldığı belirlenmesindeki uygulanabilirliği bir kez daha ortaya konulmuştur.

Tez çalışmasında test edilen toplam 213 adet ishalleri buzağı dışkısının 82 adetinde (%38,5) BRV ve/veya BCoV etkenleri tespit edilebilmiştir. Bu veriye göre geri kalan 131 (%61,5) ishal vakasında başka etkenlerin rol almış olabileceği değerlendirilebilir. Bunlar arasında diğer enterik viruslar ve bakteriler yer alabileceği gibi non-enfeksiyöz faktörlerde gözardı edilmemelidir. Dolayısıyla buzağı ishal olgularında multi faktöriyel bir tanısal yaklaşımın gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Türkiye’de BRV ve BCoV dışındaki enterik virusların neonatal buzağı ishallerindeki rolü üzerine araştırmalar sınırlıdır (Ateş & Yeşilbağ, 2022b; Gülaçtı, Işıdan, & Sözdutmaz, 2014; Gülaçtı, Sözdutmaz, & Işıdan, 2016; Işıdan, Turan, Atasoy, Sözdutmaz, & Irehan, 2019). Dolayısıyla bu alana yönelik yeni ve geniş çaplı çalışmaların hastalık kontrolü açısından faydalı olacağı değerlendirilebilir.

5.3. Sonuç

Yenidoğan buzağuların yeterli düzeylerde kolostrum almaması ve işletmelerde koruma ve kontrol çalışmalarının yetersiz olması buzağı ishallerinde predispozisyon yaratmaktadır. Buzağularda şekillenen ishallerin etiolojisinde genellikle viral etkenlerin yer olması immunsupresyon meydana getirerek prognozunu daha da kötü sonuçlanmasına ve ekonomik kaybın artmasına neden olmaktadır. Bu sebeple yenidoğan buzağularda şekillenen ishale neden olan etkenlerin güvenilir ve hızlı bir şekilde tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Tez çalışması sürecinde elde edilen veriler ışığında ulaşılan sonuçları genel bir yaklaşımla aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür:

- BRV ve BCoV etkenlerinin Bursa, Adıyaman, Çanakkale, Konya, Balıkesir, Kırklareli, Bilecik, Ankara ve Edirne görülen yenidoğan ishal enfeksiyonlarındaki rolü tespit edilmiştir.
- Tez çalışması kapsamında toplanan dışkı örneklerinde özellikle BRV' nin ishal semptomu gösteren buzağılarda daha yaygın bulunduğu saptanmıştır.
- İshal semptomu gösteren buzağılarda BRV ve BCoV teşhisi için virus izolasyonuna oranla Ag ELISA yöntemiyle daha hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir.
- BRV teşhisi için uygulanan Ag ELISA yönteminde pozitif tespit edilen örneklerle uygulanan SDS-PAGE yöntemi sonrası elde edilen sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu saptanmıştır.
- MA-104 hücre hatında virus izolasyonu çalışmasında değerlendirilen dışkı örnekleri arasından 2 adet örnekte (RV-36 ve RV-38) BRV G6P[11] saha izolatı elde edilmiştir.
- Ag ELISA yöntemine göre BRV ve BCoV yönünden pozitif örneklerle uygulanan virus izolasyonu ve PCR sonuçları arasındaki farklılıkların olması nedeniyle etkenlerin birden fazla teşhis yöntemi kullanılarak tespit edilmesi daha başarılı sonuçlar elde edileceğini göstermektedir.
- Test edilen tüm BRV örneklerinin Rotavirus Grup A' da yer aldığı belirlenmiştir.
- Filogeni analizi uygulanan BRV izolatlarının (RV-36 ve RV-38) Rotavirus Grup A da yer aldığı ve I2 genotipine sahip olduğu belirlenmiştir.
- BRV G ve P genotiplendirmesi yapılmış örnekler arasında G10P[11] genotip kombinasyonunun sahada sirküle olan baskın rotavirus genotip kombinasyonu olduğu tespit edilmiştir.
- Tez çalışmasında yenidoğan buzağılarda şekillenen ishal etiyojisinde rol oynayan enfeksiyöz ajanlar arasında BRV ve BCoV etkenlerinin önemli bir yeri olduğu belirlenmiş olup, buzağı ishallerinin etiyojisinde rol oynayan diğer enterik ajanların rolünün de dikkate alınmasının faydalı olacağı değerlendirilmiştir.

6. 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.
- Aich, P., Wilson, H. L., Kaushik, R. S., Potter, A. A., Babiuk, L. A., & Griebel, P. (2007). Comparative analysis of innate immune responses following infection of newborn calves with bovine rotavirus and bovine coronavirus. *Journal of General Virology*, 88(10), 2749–2761. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82861-0>
- Aksoy, E., Kara, E., Yağcı, B. B., & Azkur, A. K. (2021). Kırıkkale ve Çevre İllerindeki Neonatal İshalli Buzağılarda Sığır Koronavirüs ve Sığır Rotavirus Varlığının Araştırılması. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3), 38–46. <https://doi.org/10.24998/maeusabed.1010683>
- Al-Mafraji, A. M. R. (2014). Detection of E . coli K99 and rotavirus antigens in diarrheic and healthy buffalo of Babil Province , Iraq. *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences*, 7(1), 17–21.
- Al-Yousif, Y., Anderson, J., Chard-Bergstrom, C., Bustamante, A., Muenzenberger, M., Austin, K., & Kapil, S. (2001). Evaluation of a latex agglutination kit (virogen rotatest) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(3), 496–498. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.3.496-498.2001>
- Alkan, F. (1998). Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 45(1), 1. https://doi.org/10.1501/vetfak_0000000609
- Alkan, F., Ozkul, A., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T., Oguzoglu, T. C., Caliskan, E., & Burgu, I. (2011). The Detection and Genetic Characterization Based on the S1 Gene Region of BCoVs from Respiratory and Enteric Infections in Turkey. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(2), 179–185. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01194.x>
- Alkan, F., Ozkul, A., Oguzoglu, T. C., Timurkan, M. O., Caliskan, E., Martella, V., & Burgu, I. (2010). Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. *Veterinary Microbiology*, 141(3–4), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.016>
- Alkan, F., Pulat, H., Yazıcı, Z., & Burgu, İ. (1992). Ters (reverse) pasif hemaglutinasyon (RPHA) testi ile ishalleri buzağuların dışkılarında rotavirusların tespiti. *AÜ Vet Fak Derg*, 39 (1-2), 238–246.
- Alkan, F., Timurkan, M. Ö., & Karayel, İ. (2015). Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde ishalleri buzağılarda grup A rotavirus tespiti ve moleküler karakterizasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(1), 127–130. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11904>
- Allan, G. M., Todd, D., & Ireland, N. (1979). *Archives of Virology Isolation and Cell Culture Propagation of Rotaviruses From Turkeys and Chickens*. 21, 13–21.
- Ammar, S. S. M., Mokhtaria, K., Tahar, B. B., Amar, A. A., Redha, B. A., Yuva, B., ... Laid, B. (2014). Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhoea in calves in western Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 1), S318–S322. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C778>
- Argenzio, R. A. (1985). Pathophysiology of neonatal calf diarrhoea. *Veterinary Clinics*

- of North America. *Food Animal Practice*, 1(3), 461–469. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31296-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31296-2)
- Armstrong, J., Niemann, H., Smeekens, S., Rottier, P., & Warren, G. (1984). Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*, 308(5961), 751–752. <https://doi.org/10.1038/308751a0>
- Ates, O., & Yesilbag, K. (2023). Characterization of bovine rotavirus isolates from diarrheic calves in Türkiye. *Molecular Biology Reports*, 50(4), 3063–3071. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08169-4>
- Ateş, Ö., & Yeşilbağ, K. (2022a). Optimization Of Microtitration Test For Bovine Rotavirus (BRV). *International Ankara Congress On Scientific Research VI*, 185–190. Ankara.
- Ateş, Ö., & Yeşilbağ, K. (2022b). Yenidoğan buzağı ishal olgularında enterik virusların (BRV, BCoV, BVDV, BToV) çoklu enfeksiyonu. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 41(2), 0–0. <https://doi.org/10.30782/jrv.m.1166863>
- Athanassious, R., Marsolais, G., Assaf, R., Dea, S., Descôteaux, J. P., Dulude, S., & Montpetit, C. (1994). Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, 35(3), 163–169.
- Aydın, H., & Timurkan, M. Ö. (2018). Partial sequence and phylogenetic analysis of the nucleoprotein gene of coronavirus and VP7/VP4 gene of rotavirus in calf diarrhea. *Ataturk Universitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(2), 211–218. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.372439>
- Babiuk, L. A., 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.6.6.610-617.1977>
- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodríguez, D., Uriarte, E. L., Odeón, A., Bilbao, G., ... Parreño, V. (2012). Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary Microbiology*, 158(3–4), 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.011>
- Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q. Y., Morris, A. P., & Estes, M. K. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 272(5258), 101–104. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.101>
- Barman, P., Ghosh, S., Das, S., Varghese, V., Chaudhuri, S., Sarkar, S., ... Naik, T. N. (2004). Sequencing and sequence analysis of VP7 and NSP5 genes reveal emergence of a new genotype of bovine group B rotaviruses in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2816–2818. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2816-2818.2004>
- Barrington, G. M., & Parish, S. M. (2001). Bovine neonatal immunology. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 17(3), 463–476. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30001-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30001-3)
- Barua, S. R., Islam, S., Siddiki, A. M. A. . Z., Masuduzzaman, M., Hossain, M. A., & Chowdhury, S. (2021). Comparison of diagnostic tests for detection of bovine rotavirus a in calf feces. *Macedonian Veterinary Review*, 44(1), 37–45.
- Beards, G. M., Pilfold, J. N., Thouless, M. E., & Flewett, T. H. (1980). Rotavirus serotypes by serum neutralisation. *Journal of Medical Virology*, 5(3), 231–237. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890050307>
- Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of

- coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/v4061011>
- Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F., & Sanaa, M. (1999). Original article pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet. Res.*, 30, 61–74.
- Benfield, D., & Saif, L. (1990). Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6), 1454–1457.
- Bidokhti, M. R. M., Trávén, M., Krishna, N. K., Munir, M., Belák, S., Alenius, S., & Cortey, M. (2013). Evolutionary dynamics of bovine coronaviruses: Natural selection pattern of the spike gene implies adaptive evolution of the strains. *Journal of General Virology*, 94(PART9), 2036–2049. <https://doi.org/10.1099/vir.0.054940-0>
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. (1973). Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa From Children With Acute Non-Bacterial Gastroenteritis. *The Lancet*, 302(7841), 1281–1283. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92867-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92867-5)
- Blood, D., Radostis, O., & Handerson, J. (1983). *Veterinary Medicine* (Baillere, ed.). London, UK: Tindal.
- Bohl, E. H., Theil, K. W., & Saif, L. J. (1984). Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(2), 105–111. <https://doi.org/10.1128/jcm.19.2.105-111.1984>
- Boileau, M. J., & Kapil, S. (2010). Bovine Coronavirus Associated Syndromes. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(1), 123–146. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.003>
- Bok, M., Miño, S., Rodriguez, D., Badaracco, A., Nuñez, I., Souza, S. P., ... Parreño, V. (2015). Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994-2010. *Veterinary Microbiology*, 181(3–4), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.017>
- Bok, Marina, Alassia, M., Frank, F., Vega, C. G., Wigdorovitz, A., & Parreño, V. (2018). Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.007>
- Bridger, J. C., Hall, G. A., & Parsons, K. R. (1992). A study of the basis of virulence variation of bovine rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 33(1–4), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90044-T](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90044-T)
- Bridger, J. C., & Pocock, D. H. (1986). Variation in virulence of bovine rotaviruses. *Journal of Hygiene*, 96(2), 257–264. <https://doi.org/10.1017/S0022172400066031>
- Bridger, Janice C., Woode, G. N., & Meyling, A. (1978). Isolation of coronaviruses from neonatal calf diarrhoea in Great Britain and Denmark. *Veterinary Microbiology*, 3(2), 101–113. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(78\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(78)90002-0)
- Bulgin, M. S., Ward, A. C., Barrett, D. P., & Lane, V. M. (1989). Detection of rotavirus and coronavirus shedding in two beef cow herds in Idaho. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 30(3), 235–239. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17423260> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1680991>
- Burgu, İ., Akça, Y., Alkan, F., Özkul, A., & Karaoğlu, T. (1995). Yenidoğan ishalleri buzağılarda rotavirusların elektron mikroskopisi (EM), enzyme linked

- immunosorbent assay (ELISA) ve polyacrilamide gel elektrophoresis (PAGE) teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42, 491–498.
- Carman, P. S., & Hazlett, M. J. (1992). Bovine coronavirus infection in Ontario 1990-1991. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 33(12), 812–814. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17424135><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1481375>
- Cheng, X., Wu, W., Teng, F., Yan, Y., Li, G., Wang, L., ... Qiao, X. (2021). Isolation and Characterization of Bovine RVA from Northeast China, 2017–2020. *Life*, 11(12), 2017–2020. <https://doi.org/10.3390/life11121389>
- Cho, Yong il, & Yoon, K. J. (2014). An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.1>
- Cho, K.O., Hasoksuz, M., Nielsen, P. R., Chang, K. O., Lathrop, S., & Saif, L. J. (2001). Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Archives of Virology*, 146(12), 2401–2419. <https://doi.org/10.1007/s007050170011>
- Cho, Kyoung Oh, Hoet, A. E., Loerch, S. C., Wittum, T. E., & Saif, L. J. (2001). Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 62(9), 1436–1441. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1436>
- Cho, Y., Han, J., Wang, C., Cooper, V., Schwartz, K., Engelken, T., & Yoon, K. (2013). Case – control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 166(January), 375–385.
- Clark, M. A. (1993). Bovine coronavirus. *British Veterinary Journal*, 149(1), 51–70. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(05\)80210-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(05)80210-6)
- Cornelissen, L. A., Wierda, C. M., van der Meer, F. J., Herrewegh, A. A., Horzinek, M. C., Egberink, H. F., & de Groot, R. J. (1997). Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus. *Journal of Virology*, 71(7), 5277–5286. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.7.5277-5286.1997>
- Costa, M. N., Veigas, B., Jacob, J. M., Santos, D. S., Gomes, J., Baptista, P. V., ... Fortunato, E. (2014). A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: Lab-on-paper. *Nanotechnology*, 25(9). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/9/094006>
- Crawford, S. E., Mukherjee, S. K., Estes, M. K., Lawton, J. A., Shaw, A. L., Ramig, R. F., & Prasad, B. V. V. (2001). Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike. *Journal of Virology*, 75(13), 6052–6061. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.13.6052-6061.2001>
- Crouch, C. F., Bielefeldt Ohmann, H., Watts, T. C., & Babiuk, L. A. (1985). Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. *Journal of General Virology*, 66(7), 1489–1500. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-7-1489>
- Crouch, C. F., Oliver, S., Hearle, D. C., Buckley, A., Chapman, A. J., & Francis, M. J. (2000). Lactogenic immunity following vaccination of cattle with bovine coronavirus. *Vaccine*, 19(2–3), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00177-8)

- Czerny, C. P., & Eichhorn, W. (1989). Characterization of Monoclonal and Polyclonal Antibodies to Bovine Enteric Coronavirus: Establishment of an Efficient ELISA for Antigen Detection in Feces. *Veterinary Microbiology*, 20, 111–122.
- Çabalar, M., Kaya, A., & Arslan, S. (2007). Yeni doğan buzağuların ishal olgularında rotavirus ve coronavirus araştırılması. *Vet. Bil. Derg.*, 23(3–4), 103–106.
- da Silva Medeiros, T. N., Lorenzetti, E., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A. (2019). G and P genotype profiles of rotavirus A field strains circulating in beef and dairy cattle herds in Brazil, 2006–2015. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 64(July 2018), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.03.002>
- De Grazia, S., Martella, V., Rotolo, V., Bonura, F., Matthijssens, J., Bányai, K., ... Giammanco, G. M. (2011). Molecular characterization of genotype G6 human rotavirus strains detected in Italy from 1986 to 2009. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6), 1449–1455. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.015>
- de la Fuente, R., Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Luzon, M., Cid, D., Garcia, S., ... Gomez-Bautista, M. (1998). Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 36, 145–152.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Cirone, F., D’Abramo, M., Lorusso, E., ... Buonavoglia, C. (2008). Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 28–32. <https://doi.org/10.1177/104063870802000105>
- Decaro, N., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Mari, V., Radogna, A., ... Buonavoglia, C. (2008). Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 151(2), 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.016>
- Desselberger, U. (2014). *Rotaviruses*. 190, 75–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>
- Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y. J., Wagner, G., & Harrison, S. C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO Journal*, 21(5), 885–897. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.885>
- Elitok, Ö., & Elitok, B. (2016). Parenteral Applications of Colostrum Serums in Treatment and Prevention of Neonatal Calf Diarrhea. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(3), 211–214. <https://doi.org/10.5578/kvj.24243>
- Elkady, G., Zhu, J., Peng, Q., Chen, M., Liu, X., Chen, Y., ... Guo, A. (2021). Isolation and whole protein characterization of species A and B bovine rotaviruses from Chinese calves. *Infection, Genetics and Evolution*, 89, 104715. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104715>
- Ennima, I., Sebbar, G., Harif, B., Amzazi, S., Loutfi, C., & Touil, N. (2016). Isolation and identification of group A rotaviruses among neonatal diarrheic calves, Morocco. *BMC Research Notes*, 9(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2065-8>
- Erdoğan, H., Ünver, A., Güneş, V., & Çitil, M. (2003). Frequency of rotavirus and coronavirus in neonatal calves in Kars district. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1), 65–68.
- Estes, M. K., & Cohen, J. (1989). *Rotavirus Gene Structure and Function*. 53(4), 410–449.

- Falcone, E., Tarantino, M., Di Trani, L., Cordioli, P., Lavazza, A., & Tollis, M. (1999). Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 3879–3882. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.12.3879-3882.1999>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Methods Mol. Biol. In *Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis* (pp. 1–23).
- Fernandes, A. D., Brandão, P., Lima, M. S., Martins, M. S. N., da Silva, T. G., Pinto, V. S. C., ... Pituco, E. M. (2018). Genetic diversity of BCoV in Brazilian cattle herds. *Veterinary Medicine and Science*, 4(3), 183–189. <https://doi.org/10.1002/vms3.102>
- Fernandez, F. M., Conner, M. E., Hodgins, D. C., Parwani, A. V., Nielsen, P. R., Crawford, S. E., ... Saif, L. J. B. (1998). Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SAll rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. 16(5), 507–516.
- Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H., Woode, G. N., Bridger, J. C., & Derrick, J. M. (1974). Relation Between Viruses From Acute Gastroenteritis of Children and Newborn Calves. *The Lancet*, 304(7872), 61–63. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(74\)91631-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)91631-6)
- Foster, D. M., & Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25(1), 13–36. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.013>
- Fukutomi, T., Tsunemitsu, H., & Akashi, H. (1999). Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Archives of Virology*, 144(5), 997–1006. <https://doi.org/10.1007/s007050050562>
- Fulton, R.W., Ridpath, J. F., & Burge, L. J. (2013). Bovine coronaviruses from the respiratory tract: Antigenic and genetic diversity. *Vaccine*, 31, 886–892.
- Fulton, Robert W., Step, D. L., Wahrmund, J., Burge, L. J., Payton, M. E., Cook, B. J., ... Confer, A. W. (2011). Bovine coronavirus (BCV) infections in transported commingled beef cattle and sole-source ranch calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(3), 191–199.
- Fung, T. S., Huang, M., & Liu, D. X. (2014). Coronavirus-induced ER stress response and its involvement in regulation of coronavirus-host interactions. *Virus Research*, 194, 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.09.016>
- Gaber, F., & Kapil, S. (1999). Development of an antigen spot test for detection of coronavirus in bovine fecal samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(4), 542–544. <https://doi.org/10.1128/cdli.6.4.542-544.1999>
- Garaicoechea, L., Bok, K., Jones, L. R., Combessies, G., Odeón, A., Fernandez, F., & Parreño, V. (2006). Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Veterinary Microbiology*, 118(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.004>
- García, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Orden, J. A., Cid, D., Sanz, R., Gómez-Bautista, M., & De La Fuente, R. (2000). Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 23(3), 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(99\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(99)00071-5)

- Ge, Y., Mansell, A., Ussher, J. E., Brooks, A. E. S., Manning, K., Wang, C. J. H., & Taylor, J. A. (2013). Rotavirus NSP4 Triggers Secretion of Proinflammatory Cytokines from Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *Journal of Virology*, 87(20), 11160–11167. <https://doi.org/10.1128/jvi.03099-12>
- Geletu, U. S., Usmael, M. A., & Bari, F. D. (2021). Rotavirus in Calves and Its Zoonotic Importance. *Veterinary Medicine International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6639701>
- Godden, S. (2008). Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 24(1), 19–39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
- Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J. F., & Laude, H. (1992). TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, 188(2), 666–675. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90521-P](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90521-P)
- Gomez, D. E., & Weese, J. S. (2017). Viral enteritis in calves. *Canadian Veterinary Journal*, 58(12), 1267–1274.
- Goto, Y., Kurogi, H., Inaba, Y., & Matumoto, M. (1986). Sequential isolation of rotavirus from individual calves. *Veterinary Microbiology*, 11(1–2), 177–184. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90018-0)
- Greene, H. J. (1983). Minimise calf diarrhoea by good husbandry: treat sick calves by fluid therapy. *Annales de Recherches Veterinaires*, 14(4), 548–555.
- Gülaçtı, I., Işidan, H., & Sözdutmaz, I. (2014). Detection of bovine torovirus in fecal specimens from calves with diarrhea in Turkey. *Archives of Virology*, 159(7), 1623–1627. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-1977-7>
- Gülaçtı, I., Sözdutmaz, I., & Işidan, H. (2016). Molecular characterization of the bovine noroviruses from diarrheic calves in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40(4), 428–433. <https://doi.org/10.3906/vet-1504-67>
- Gülyaz, V., Hasöksüz, M., & Özkul, A. (2006). Türkiye 'de yenidoğan ishalleri buzağılarda ilk rotavirus izolasyonu. *Pendik Vet Mikr.Derg*, 20(2), 1–9.
- Gülyaz, V., Turan, N., Özdemir, S., & Gülaçtı, İ. (2010). Yenidoğan ishalleri buzağılarda bovine rotavirus infeksiyonunun teşhisinde ELISA ve virus izolasyon metodlarının karşılaştırılması. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 37(1), 11–17.
- Gumusova, O., Yazıcı, Z., Albayrak, H., & Çakiroğlu, D. (2007). First report of bovine rotavirus and bovine coronavirus seroprevalance in goats in Turkey. *Veterinarski Glasnik*, 61(1–2), 75–79. <https://doi.org/10.2298/vetgl0702075g>
- Gunn, L., Collins, P. J., O'connell, M. J., & O'shea, H. (2015). Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Veterinary Journal*, 68(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0060-3>
- Haan, C. A. M., Kuo, L., Masters, P. S., Vennema, H., & Rottier, P. J. M. (1998). Coronavirus Particle Assembly: Primary Structure Requirements of the Membrane Protein. *Journal of Virology*, 72(8), 6838–6850. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.8.6838-6850.1998>
- Hall, G. A., Bridger, J. C., Parsons, K. R., & Cook, R. (1993). Variation in Rotavirus Virulence: A Comparison of Pathogenesis in Calves between Two Rotaviruses of Different Virulence. *Veterinary Pathology*, 30(3), 223–233. <https://doi.org/10.1177/030098589303000302>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and

- analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleid Acids Symposium Series*, pp. 95–98.
- Hansa, A., Rai, R. B., Dhama, K., Wani, M. Y., Saminathan, M., & Ranganath, G. J. (2013). Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in vero cell line and its confirmation by direct FAT and RT-PCR. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(21), 1342–1347.
- Hasoksuz, M., Kayar, A., Dodurka, T., & Ilgaz, A. (2005). Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in northwestern Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(1), 137–146. <https://doi.org/10.1556/AVet.53.2005.1.13>
- Herring, A. J., Inglis, N. F., Ojeh, C. K., Snodgrass, D. R., & Menzies, J. D. (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(3), 473–477. <https://doi.org/10.1128/jcm.16.3.473-477.1982>
- Hoshino, Y., Saif, L. J., Sereno, M. M., Chanock, R. M., & Kapikian, A. Z. (1988). Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *American Society for Microbiology*, 62(3), 744–748.
- House, J. A. (1978). Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173, 573–576.
- Hurst, K. R., Koetzner, C. A., & Masters, P. S. (2013). Characterization of a Critical Interaction between the Coronavirus Nucleocapsid Protein and Nonstructural Protein 3 of the Viral Replicase-Transcriptase Complex. *Journal of Virology*, 87(16), 9159–9172. <https://doi.org/10.1128/jvi.01275-13>
- ICTV. (2023a). Rotavirus from https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202104905
- ICTV. (2023b). Betacoronavirus from https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101861
- Inaba, Y., Sato, K., Takahashi, E., Kurogi, H., Satoda, K., Omori, T., & Matumoto, M. (1977). Hemagglutination with Nebraska calf diarrhea virus. *Microbiol. Immunol.*, 21(9), 531–534.
- Isa, P., López, S., Segovia, L., & Arias, C. F. (1997). Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *Journal of Virology*, 71(9), 6749–6756. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6749-6756.1997>
- Işidan, H., Turan, T., Atasoy, M. O., Sözdutmaz, I., & Irehan, B. (2019). Detection and first molecular characterisation of three picornaviruses from diarrhoeic calves in Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(3), 463–476. <https://doi.org/10.1556/004.2019.046>
- Iturriza Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., & Gray, J. (2002). Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *Journal of Virology*, 76(13), 6596–6601. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6596-6601.2002>
- Izzo, M. M., Kirkland, P. D., Gu, X., Lele, Y., Gunn, A. A., & House, J. K. (2012). Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 90(4), 122–129. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00891.x>

- Jerez, J., Gregori, F., Brandão, P., Rodriguez, C., Ito, F., Buzinaro, M., & Sakai, T. (2005). Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in monolayers of HmLu-1 cells. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 207–210.
- Kang, G., Iturriza-gomara, M., Wheeler, J. G., Crystal, P., Ramani, S., Primrose, B., ... Gray, J. (2004). Europe PMC Funders Group Quantitation of Group A Rotavirus by Real-Time Reverse- Transcription-Polymerase Chain Reaction: *J Med Virol*, 73(1), 118–122. <https://doi.org/10.1002/jmv.20053>. Quantitation
- Kapil, S., Trent, A. M., & Goyal, S. M. (1990). Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Arch Virol*, 115, 127–132.
- 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, 2433–2440.
- Karayel-Hacioglu, I., Timurkan, M. O., Pellegrini, F., Marton, S., Gul, B., Bányai, K., ... Alkan, F. (2022). Whole-genome analysis of a rare G15P[21] group A rotavirus detected at a dairy cattle farm. *Journal of General Virology*, 103(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jgv.0.001808>
- Karayel, I., Fehér, E., Marton, S., Coskun, N., Bányai, K., & Alkan, F. (2017). Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015. *Veterinary Microbiology*, 201, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.028>
- Kim, Y., Nielsen, P. R., Hodgins, D., Chang, K. O., & Saif, L. J. (2002). *Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines*. 20, 1248–1258.
- Klausegger, A., Strobl, B., Regl, G., Kaser, A., Luytjes, W., & Vlasak, R. (1999). Identification of a Coronavirus Hemagglutinin-Esterase with a Substrate Specificity Different from Those of Influenza C Virus and Bovine Coronavirus. *Journal of Virology*, 73(5), 3737–3743. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.5.3737-3743.1999>
- Klein, D., Kern, A., Lapan, G., Benetka, V., Möstl, K., Hassl, A., & Baumgartner, W. (2009). Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus A and Cryptosporidium parvum in faecal samples of calves. *Veterinary Journal*, 182(3), 484–486. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.07.016>
- Kohara, J., Hirai, T., Mori, K., Ishizaki, H., & Tsunemitsu, H. (1997). Enhancement of Passive Immunity with Maternal Vaccine against Newborn Calf Diarrhea. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(11), 1023–1025. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.1023>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054>
- Lai, M. M. C. (1990). Coronavirus: Organization, replication and expression of genome. *Annual Review of Microbiology*, 44, 303–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.44.1.303>
- Lanz Uhde, F., Kaufmann, T., Sager, H., Albini, S., Zanoni, R., Schelung, E., & Meylan, M. (2008). Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *Veterinary Record*, 163(12), 362–366. <https://doi.org/10.1136/vr.163.12.362>
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Li, K. S. M., Tsang, A. K. L., Fan, R. Y. Y., Luk, H. K.

- H., ... Yuen, K.-Y. (2015). Discovery of a Novel Coronavirus, China Rattus Coronavirus HKU24, from Norway Rats Supports the Murine Origin of Betacoronavirus 1 and Has Implications for the Ancestor of Betacoronavirus Lineage A. *Journal of Virology*, 89(6), 3076–3092. <https://doi.org/10.1128/jvi.02420-14>
- 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. *Veterinary Record*, 147, 160–162.
- Lee, S. H., Kim, H. Y., Choi, E. W., & Kim, D. (2019). Causative agents and epidemiology of diarrhea in Korean native calves. *Journal of Veterinary Science*, 20(6), 1–13. <https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.e64>
- Light, J. S., & Hodes, H. L. (1943). Studies on Epidemic Diarrhea of the New-born: Isolation of a Filtrable Agent Causing Diarrhea in Calves. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 33(12), 1451–1454. <https://doi.org/10.2105/ajph.33.12.1451>
- Lissenberg, A., Vrolijk, M. M., van Vliet, A. L. W., Langereis, M. A., de Groot-Mijnes, J. D. F., Rottier, P. J. M., & de Groot, R. J. (2005). Luxury at a Cost? Recombinant Mouse Hepatitis Viruses Expressing the Accessory Hemagglutinin Esterase Protein Display Reduced Fitness In Vitro. *Journal of Virology*, 79(24), 15054–15063. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.24.15054-15063.2005>
- Liu, D. X., Yuan, Q., & Liao, Y. (2007). Coronavirus envelope protein: A small membrane protein with multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(16), 2043–2048. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7103-1>
- Liu, L., Hägglund, S., Hakhverdyan, M., Alenius, S., Larson, L. E., & Belák, S. (2006). Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1924. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1924.2006>
- Lu, C., Yao, H., & Eichhorn, W. (1991). Coronavirus as an Agent of Neonatal Calf Diarrhea in a Chinese Dairy Cattle Farm. *Journal Veterinerian Medicine*, 38, 473–476.
- Maes, R. K., Grooms, D. L., Wise, A. G., Han, C., Ciesicki, V., Hanson, L., ... Holland, R. (2003). Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 290–294. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.290-294.2003>
- Matson, D. O., Estes, M. K., Burns, J. W., Greenberg, H. B., Thniguchi, K., & Urasawa, S. (1990). *Serotype Variation of Human Group A Rotaviruses in Two Regions of the USA*. 605–614.
- Matsui, S. M., Offit, P. A., Vo, P. T., Mackow, E. R., David, A., Shaw, R. D., ... Greenberg, H. B. (1989). *Passive Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea by Monoclonal Antibodies to the Heterotypic Neutralization Domain of VP7 and the VP8 Fragment of VP4*. 27(4), 780–782.
- Matsuno, S., & Inouye, S. (1983). Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. *American Society for Microbiology*, 39(1), 155–158.
- Matsuno, Shigeo, Inouye, S., & Kono, R. (1977). *Plaque Assay of Neonatal Calf Diarrhea Virus and the Neutralizing Antibody in Human Sera*. 5(1), 1–4.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., ... Van Ranst, M. (2008). Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals

- a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*, 82(7), 3204–3219. <https://doi.org/10.1128/jvi.02257-07>
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., 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(6), 1177–1182. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Mcdonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Buesa, J., ... Vanranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). *Arch Virol*, 156(8), 1397–1413. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>.Uniformity
- Mayameei, A., Mohammadi, G., Yavari, S., Afshari, E., & Omid, A. (2010). Evaluation of relationship between Rotavirus and Coronavirus infections with calf diarrhea by capture ELISA. *Comparative Clinical Pathology*, 19(6), 553–557. <https://doi.org/10.1007/s00580-009-0920-x>
- Mcintosh, K., & Peiris, J. S. M. (2019). Coronaviruses. In *The Agents - PArt B* (pp. 1155–1171).
- Mcnulty, M. S., Allan, G. M., & Mcferran, J. B. (1977). *Cell Culture Studies With a Cytopathic Bovine Rotavirus*. 209, 201–209.
- Mebus, C. A., Stair, E. L., Rhodes, M. B., & Twiehaus, M. J. (1973). Pathology of Neonatal Calf Diarrhea Induced by a Coronavirus-Like Agent. *Veterinary Pathology*, 10(1), 45–64. <https://doi.org/10.1177/030098587301000105>
- Mebus, C. A., Stair, E. L., Underdahl, N. R., & Twiehaus, M. J. (1971). Pathology of Neonatal Calf Diarrhea Induced by a Reo-like Virus. *Veterinary Pathology*, 8(1), 490–505. <https://doi.org/10.1177/030098587301000105>
- Mebus, C. A., Underdahl, N. R., Rhodes, M. B., & Twiehaus, M. J. (1969). *Calf Diarrhea (Scours): Reproduced with a Virus from a Field Outbreak*.
- Mee, J. F., Berry, D. P., & Cromie, A. R. (2008). Prevalence of, and risk factors associated with, perinatal calf mortality in pasture-based Holstein-Friesian cows. *Animal*, 2(4), 613–620. <https://doi.org/10.1017/S1751731108001699>
- Mee, John F., Geraghty, T., O’Neill, R., & More, S. J. (2012). Bioexclusion of diseases from dairy and beef farms: Risks of introducing infectious agents and risk reduction strategies. *Veterinary Journal*, 194(2), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.001>
- Midgley, S. E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsager, C. K., Jakab, F., ... Böttiger, B. (2012). Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Veterinary Microbiology*, 156(3–4), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.027>
- Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, 202, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
- Min, H. G., Lim, Y. H., & Kang, S. Y. (2006). Determination of porcine rotavirus serotypes by RT-PCR and RFLP analysis. *Journal of Bacteriology and Virology*, 36(4), 255–261. <https://doi.org/10.4167/jbv.2006.36.4.255>
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., & Horzinek, M. C. (1999). *Student MJ Veterinary Virology*. USA: A Division of Harcourt Brace Company.
- Nakagomi, O., Mochizuki, M., Aboudy, Y., Shif, I., Silberstein, I., & Nakagomi, T. (1992). Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for

- transmission of animal rotaviruses to humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(4), 1011–1013. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.4.1011-1013.1992>
- Nal, B., Chan, C., Kien, F., Siu, L., Tse, J., Chu, K., ... Altmeyer, R. (2005). Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *Journal of General Virology*, 86(5), 1423–1434. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80671-0>
- Naslund, K., Traven, M., Larsson, B., Silvan, A., & Linde, N. (2000). Capture ELISA systems for the detection of bovine coronavirus-specific IgA and IgM antibodies in milk and serum. *Veterinary Microbiology*, 72, 183–206.
- Ojeh, C. K., Snodgrass, D. R., & Herrinh, A. J. (1984). *Archives of Virology Evidence for Serotypic Variation Amonfl Bovine Rotaviruses*. 171(15), 161–171.
- Ok, M., Güler, L., Turgut, K., Ok, Ü., Şen, I., Gündüz, I. K., ... Güzelbekteş, H. (2009). The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of Escherichia coli strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56(2), 94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01156.x>
- Oostergetel, G. T., Bartelink, W., Faas, F. G. A., Verkleij, A., Rottier, P. J. M., Koster, A. J., & Jan, B. (2009). Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus : Insights into the structure of the coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805270106>
- Otto, P. H., Rosenhain, S., Elschner, M. C., Hotzel, H., Machnowska, P., Trojnar, E., ... Johne, R. (2015). Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Veterinary Microbiology*, 179(3–4), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.021>
- Özkul, A., Yeşilbağ, K., Karaoğlu, T., & Burgu, I. (2002). Electrophoretotypes of bovine rotaviruses detected in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26(2), 359–362.
- Papp, H., Laszlo, B., Jakab, F., Ganesh, B., Grazia, S., Matthijnsens, J., ... Banyai, K. (2013). Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary Microbiology*, 165(January), 190–199.
- Park, G. N., Kim, D. I., Choe, S., Shin, J., An, B. H., Kim, K. S., ... An, D. J. (2022). Genetic Diversity of Porcine Group A Rotavirus Strains from Pigs in South Korea. *Viruses*, 14(11)(2522). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/v14112522>
- Park, S. J., Jeong, C., Yoon, S. S., Choy, H. E., Saif, L. J., Park, S. H., ... Cho, K. O. (2006). Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3178–3188. <https://doi.org/10.1128/JCM.02667-05>
- Pestil, Z., Gülyaz, V., & Hasöksüz, M. (2016). Marmara bölgesinde yenidoğan buzağı ishallerinde bovine coronavirusların saptanması ve patojenite çalışması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(1), 16–20. <https://doi.org/10.35864/evmd.514149>
- Radostits, O. M. (1991). The role of management and the use of vaccines in the control of acute undifferentiated diarrhea of newborn calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 32, 155–159.
- Rahman, M., Banik, S., Faruque, A. S. G., Taniguchi, K., Sack, D. A., Van Ranst, M., & Azim, T. (2005). Detection and characterization of human group C rotaviruses

- in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4460–4465. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4460-4465.2005>
- Rai, R. B., Wani, M. Y., & Bareilly, U. P. (2013). research article detection of bovine rotavirus in neonatal calf diarrhoea by ELISA. *International Journal of Current Research*, 5(07), 1935–1939.
- Rainsford, E. W., & McCrae, M. A. (2007). Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Research*, 130(1–2), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.06.011>
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *Journal of Virology*, 78(19), 10213–10220. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10213-10220.2004>
- Reber, A. J., Lockwood, A., Hippen, A. R., & Hurley, D. J. (2006). Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1–2), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.014>
- Rodriguez-Díaz, J., López-Andújar, P., García-Díaz, A., Cuenca, J., Montava, R., & Buesa, J. (2003). Expression and purification of polyhistidine-tagged rotavirus NSP4 proteins in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 31(2), 207–212. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00166-9](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00166-9)
- Rougemont, A., & Pothier, P. (2009). Rotavirus. *EM Consulte*, (September), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0000-0000\(10\)52479-3](https://doi.org/10.1016/S0000-0000(10)52479-3)
- Saif, L.J., Wang, Q., Vlasova, A. N., Jung, K., & Xiao, S. (2019). Coronaviruses. In *Diseases of Swine* (pp. 488–522). John Wiley & Sons, Inc.
- Saif, Linda J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(2), 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- Saif, Linda J, Heckert, R. A., Miller, K. L., & Tarek, M. . (1988). Cell culture propagation of bovine coronavirus. *Journal of Tissue Culture Methods*, 11(3), 139–145.
- Saklı, G., Bulut, O., Hasoksuz, M., & Hadımlı, H. (2017). Investigation of bovine coronavirus and bovine rotavirus by rapid diagnosis kit and RT-PCR in diarrheic calf feces. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences Review*, 3(3), 89–94. <https://doi.org/10.30704/http-www-jivs-net.601639>
- Saneketa, T., Yoshida, Y., & Oda, K. (1978). Detection of rotavirus from feces by reversed passive hemagglutination method. *J Clin Pathol*, 32, 963.
- Schoenthaler, S. L., & Kapil, S. (1999). Development and applications of a bovine coronavirus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(1), 130–132. <https://doi.org/10.1128/cdli.6.1.130-132.1999>
- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N., & Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO Journal*, 30(2), 408–416. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.322>
- Shi, Z., Wang, W., Chen, C., Zhang, X., Wang, J., Xu, Z., & Lan, Y. (2020). First report and genetic characterization of bovine torovirus in diarrhoeic calves in China. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02494-1>
- Shin, J., Choe, S., Park, G., Song, S., Kim, K., An, B., ... An, D. (2022). *Isolation and*

- Genetic Characterization of a Bovine Coronavirus KBR-1 Strain from Calf Feces in South Korea.* 1–13.
- Shin, J., Tark, D., Le, V. P., Choe, S. E., Cha, R. M., Park, G. N., ... An, D. J. (2019). Genetic characterization of bovine coronavirus in Vietnam. *Virus Genes*, 55(3), 415–420. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01647-1>
- Siddell, S., Wege, H., & Ter Meulen, V. (1983). The biology of coronaviruses. *The Journal of General Virology*, 64 (Pt 4), 761–776. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-4-761>
- Snodgrass, D. R., Fahey, K. J., Wells, P. W., Campbell, I., & Whitelaw, A. (1980). Passive Immunity in Calf Rotavirus Infections : Maternal Vaccination Increases and Prolongs Immunoglobulin G1 Antibody Secretion in Milk. 28(2), 344–349.
- Soltan, M. A., Tsai, Y. L., Lee, P. Y. A., Tsai, C. F., Chang, H. F. G., Wang, H. T. T., & Wilkes, R. P. (2016a). 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. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.006>
- Soltan, M. A., Tsai, Y., Lee, P. A., Tsai, C., Chang, H. G., Wang, H. T., & Wilkes, R. P. (2016b). 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. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.006>
- Storz, J., Purdy, C. W., Lin, X., Burrell, M., Truax, R. E., Briggs, R. E., ... Loan, R. W. (2000). Isolation of respiratory bovine coronavirus , other cytotidal viruses , and Pasteurella spp of shipping fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(999902), 1599–1604.
- Şahal, M., Terzi, O. S., Ceylan, E., & Kara, E. (2018). Buzağı İshalleri ve Korunma Yöntemleri. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg*, 58, 41–49.
- Şahna, K. C., & Alkan, F. (2013). Sığırların rotavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisinde gebeliğin rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 17(3), 203–209.
- Theil, K. W., Saif, L. J., Moorhead, P. D., & Whitmoyer, R. E. (1985). Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): Characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(3), 340–345. <https://doi.org/10.1128/jcm.21.3.340-345.1985>
- Thomas, C. J., Hoet, A. E., Sreevatsan, S., Wittum, T. E., Briggs, R. E., Duff, G. C., & Saif, L. J. (2006). Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. *American Journal of Veterinary Research*, 67(8), 1412–1420. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.8.1412>
- Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 165–177. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>
- Tsunemitsu, H., El-Kanawati, Z. R., Smith, D. R., Reed, H. H., & Saif, L. J. (1995). Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(12), 3264–3269. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.12.3264-3269.1995>
- Tsunemitsu, Hiroshi, Yonemichi, H., Hirai, T., Kudo, T., Onoe, S., Mori, K., & Shimizu, M. (1991). Isolation of Bovine Coronavirus from Feces and Nasal Swabs of Calves with Diarrhea. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53(3),

- 433–437. <https://doi.org/10.1292/jvms.53.433>
- Urasawa, T., Urasawa, S., & Taniguchi, K. (1981). *Sequential Passages of Human Rotavirus in MA-104 Cells*. 25(10), 1025–1035.
- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W. A., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J. E., & Rottier, P. J. M. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO Journal*, 15(8), 2020–2028. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00553.x>
- Vijaykrishna, D., Smith, G. J. D., Zhang, J. X., Peiris, J. S. M., Chen, H., & Guan, Y. (2007). Evolutionary Insights into the Ecology of Coronaviruses. *Journal of Virology*, 81(8), 4012–4020. <https://doi.org/10.1128/jvi.02605-06>
- Viral Zone. (2023). https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species
- Vlasova, A. N., & Saif, L. J. (2021). Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(March). <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>
- Wang, S., Zhang, C., & Zhang, Y. (2009). Lateral flow colloidal gold-based immunoassay for pesticide. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 504, 237–252. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-569-9_15
- Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 635–664. <https://doi.org/10.1128/mnbr.69.4.635-664.2005>
- Wernery, U., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2017). Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus and dromedaries. *Veterinary Journal*, 220, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.020>
- Wieda, J., Bengelsdorff, H. -J, Bernhardt, D., & Hungerer, K. -D. (1987). Antibody Levels in Milk of Vaccinated and Unvaccinated Cows against Organisms of Neonatal Diarrhoea. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 34(1–10), 495–503. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1987.tb00425.x>
- Wissink, E. H. J., Kroese, M. V., Maneschijn-Bonsing, J. G., Meulenberg, J. J. M., van Rijn, P. A., Rijsewijk, F. A. M., & Rottier, P. J. M. (2004). Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *Journal of General Virology*, 85(12), 3715–3723. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80402-0>
- Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2(8), 1805–1820. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y., & Yuen, K. Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine*, 234(10), 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., ... Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/jvi.06540-11>
- Woode, G. N., & Bridger, J. C. (1978). Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *Journal of Medical*

- Microbiology*, 11(4), 441–452. <https://doi.org/10.1099/00222615-11-4-441>
- Yanar, K. E. (2022). Yenidoğan buzağı ishallerinin nedenleri, tedavileri ve korunma yöntemleri. *Palandöken Journal of Animal Science, Technology and Economics*, 1(1), 54–59.
- Yazıcı, Z., & Akça, Y. (1993). Buzagılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyon. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 40(2), 231–240.
- Yılmaz, V. (2016). Investigation of Rotavirus Infection in Calves with Diarrhea in Northeast Turkey. *Animal and Veterinary Sciences*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.11648/j.av.s.20160401.11>
- Yoo, D., & Deregt, D. (2001). A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 297–302. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.297-302.2001>
- Zaane, D. Van, & Ijzerman, J. (1984). Monoclonal Antibodies against Bovine Immunoglobulins and their Use in Isotype-Specific ELISAs for Rotavirus Antibody. *Journal of Immunological Methods*, 72(January), 427–441.
- Zhang, Y. De, Li, H., Liu, H., & Pan, Y. F. (2007). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the VP8* sialic acid-binding domain of porcine rotavirus strain OSU. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(2), 93–95. <https://doi.org/10.1107/S1744309106055849>
- Zhao, L., Jha, B. K., Wu, A., Elliott, R., Ziebuhr, J., Gorbalenya, A. E., ... Weiss, S. R. (2012). Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host and Microbe*, 11(6), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.011>
- Zhu, L., Xing, Z., Gai, X., Li, S., San, Z., & Wang, X. (2014). Identification of a novel enterovirus e isolates HY12 from cattle with severe respiratory and enteric diseases. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097730>
- Zissis, G., Lambert, J. P., Marbeant, P., Marissens, D., Lobmann, M., Charlier, P., ... Zygraich, N. (1983). Protection studies in colostrum-deprived piglets of a bovine rotavirus vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. *Journal of Infectious Diseases*, 148(6), 1061–1068. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.6.1061>

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|
| % | : Yüzde |
| μ | : Mikrolitre |
| Ab | : Antikor |
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| Ag | : Antijen |
| BCoV | : Bovine Coronavirus |
| bp | : Baz çifti (basepair) |
| BRV | : Bovine Rotavirus |
| cm² | : Santimetre kare |
| dk | : Dakika |
| DMEM | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| E | : Küçük Membran Proteini |
| ELISA | : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| EM | : Elektron Mikroskopi |
| FDS | : Fötal Dana Serumu |
| FFN | : Floresan Focus Nötralizasyon Testi Ve |
| GMEM | : Glasgow Modified Essential Medium |
| HA | : Hemaglütinasyon |
| HADYEK | : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu |
| HE | : Hemaglütinin Esteraz Proteini |
| HI | : Hemaglütinasyon İnhibisyon |
| HRT-18 | : Human Rectal Tumor-18 |
| IBV | : Infectious Bronchitis Virus |
| Ig | : İmmunglobülin |
| IU | : İnternasyonal Ünite |
| kb | : Kilobaz |
| M | : Membran Proteini, |
| MA-104 | : African Green monkey kidney |
| MERS | : Orta Doğu Solunum Sendromu |
| MHV | : Mouse Hepatitis Virus |
| ml | : Mililitre |
| N | : Nükleokapsid Proteini |
| nm | : Nanometre |
| NSP | : Yapısal Olmayan Protein |
| ORF | : Open Reading Frame |
| PBS | : Phosphatebufferedsaline |
| pmol | : Pikomol |
| PRVN | : Plak-Redüksiyon Virus Nötralizasyon |
| RCWG | : Rotavirus Classification Working Group |
| RNA | : Ribonikleikasit |
| RT-PCR | : Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| S | : Spike Glikoproteini |
| SARS | : Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu |

| | | |
|-----------------|---|------------------------------------------------------|
| SDS-PAGE | : | Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez |
| SN | : | Serum Nötralizasyon |
| sn | : | Saniye |
| ssRNA | : | Tek Zincirli RNA |
| TLP | : | Triple Layer Particle |
| VN | : | Virus Nötralizasyon |
| VP | : | Yapısal Protein |
| µg | : | Mikrogram |

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sürecinde beni destekleyen, değerli bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, desteğini esirgemeyen ve akademik hayatımın başlangıcında bana yürümeyi öğreten çok sevdiğim, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Kadir Yeşilbağ' a teşekkürlerimi sunarım.

Zorlu süreç boyunca yardımlarını esirgemeyen, iyi ve kötü her günde her daim yanımda olan sevgili dostum Dr. Öğr. Üyesi Berfin Kadiroğlu' na, tecrübe ve bilgileri ile her zaman fikir veren ve bana ablalık yapan sevgili Doç. Dr. Gizem Aytoğu ve sevgili Dr. Öğr. Üyesi Eda Baldan Toker' e, doktora yeni başlayan kardeşlerim Dokt. Öğr. Nilay Aybey ve Dokt. Öğr. Mevlüt Yaşar' a teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü eğitimim sürecinde her daim birbirimize destek olduğumuz değerli dostlarım Vet. Hek. Öznur Arslan ve Vet. Hek. Aykut Acar' a teşekkür ederim.

Son olarak beni büyüten, okutan, mesleki hayalimi yaşamama olanak tanıyan ve eğitim-öğretim hayatım boyunca tüm zorluklara birlikte göğüs gerdiğim canım babam Emin Ateş, canım annem Kevser Ateş, canım abim Ömer Ateş' e ve diğer tüm aile üyelerine teşekkürü borç bilirim.

Araş. Gör. Özer ATEŞ
2023

9. ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve ortaöğretimi Tekirdağ İnönü İlköğretim Okulu'nda ve lise öğrenimini Tekirdağ Tuğlacılar Lisesi'nde tamamlamıştır. 2009 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinde başlamış olduğu üniversite eğitimini 2015 yılında tamamlayarak mezun olmuştur. Daha sonra 2017 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başlamıştır. Kasım 2021 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır.