

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU KLİNİK BELİRTİLERİ
GÖSTEREN SIĞIRLARDA BOVİNE CORONAVİRUS (BCoV)
ENFEKSİYONLARININ PCR TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Meltem MENEKŞE

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Atilla ŞİMŞEK

KONYA-2018

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU KLİNİK BELİRTİLERİ
GÖSTEREN SIĞIRLARDA BOVİNE CORONAVİRUS (BCoV)
ENFEKSİYONLARININ PCR TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Meltem MENEKŞE

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Atilla ŞİMŞEK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17202054 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2018

ONAY SAYFASI



ii. ÖNSÖZ

Alt ve üst solunum yolları ile barsakları etkileyerek pnömoenterik bir karakter gösteren bovine coronavirus (BCoV)'lar ile ilgili olarak tüm Dünya'da gerçekleştirilen birçok araştırmada enterik sistemi etkileyen suşlar üzerinde yoğunlaşmış olup solunum virusları ve bu sisteme olan etkileri üzerine yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır. Bu araştırma ile solunum sistemi klinik belirtileri gösteren farklı yaş gruplarına sahip sığırlarda BCoV'lerin solunum yolu ile saçılımları, serolojik durumları ve klinik belirtiler değerlendirilerek BCoV enfeksiyonlarının solunum yolu enfeksiyonları arasındaki öneminin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Sibel YAVRU, Prof. Dr. Orhan YAPICI, Prof. Dr. Oya BULUT, Doç. Dr. Oğuzhan AVCI ve Dr. Irmak DİK'e, Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü Veterinerlik Genetiği Arş. Gör. Gonca SÖNMEZ'e, beni her zaman destekleyen Ceren Hayvan Sağlığı ve Laboratuvarı'ndan Dr. Gülşen ORHAN, Vet. Hek. Ali Rıza ÇEŞMECİ ve Betül TAŞCI'ya, çalışmanın örneklerinin toplanmasında yardımcı olan, tez çalışmalarım süresince göstermiş olduğu ilgisi, anlayışı ve sabrı için eşim Vet. Hek. Ahmet MENEKŞE'ye ve bu günlere gelmemde emek ve katkılarından dolayı annem Selma TONGUÇ'a, sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

iii. İÇİNDEKİLER	Sayfa
SİMGE VE KISALTMALAR	iv
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Etiyoloji	5
1.3. Replikasyon Mekanizması	15
1.4. Tarihçe	21
1.5. Epidemiyoloji	22
1.6. Patogenez ve Patoloji	24
1.7. Klinik Bulgular	26
1.8. İmmünite	27
1.9. Aşı Çalışmaları	29
1.10. Teşhis	32
1.10.1. Direkt teşhis	32
1.10.2. İndirekt teşhis	35
1.11. Koruma Kontrol	36
1.12. Tedavi	36
1.13. Zoonotik Durum	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar	39
2.2. Svap Numunelerinin Hazırlanması	41

2.3. Svap Numunelerinden RNA Ekstraksiyonu	41
2.4. RNA Ekstraksiyon Ürünlerinden cDNA Eldesi	42
2.5. PCR Uygulaması	43
2.6. PCR Ürünlerinin Elektroforezisi	44
2.7. Kan Numunelerinin Hazırlanması	44
2.8. ELISA	45
3.BULGULAR	47
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
6. KAYNAKLAR	65
7. EKLER	73
EK A: Etik Kurul Onayı	73
8. ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ab	Antikor
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BEK	Bovine Embriyonic Kidney
BEL	Bovine Embriyonic Lung
BCoV	Bovine Coronavirus
BoHV	Bovine Herpesvirus
Bp	Base Pair
BRDC	Bovine Respiratorik hastalık Kompleksi
BRD	Bovine Respiratorik Hastalık
BRSV	Bovine Respiratory Syncytial Virus
BVDV	Bovine Viral Diyare Virus
CD	Buzağı Diyaresi
CDC	Center For Disease Control and Disease
cDNA	Komplementer DNA
ChRCoV	Chine Rattus Coronavirus
CoV	Coronavirus
CRCoV	Canine Respiratorik Virus
D2BFS	Bovine Fetal Spleen
dk	Dakika
DMV	Çift Zarlı Kesecikler

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dsRNA	Double Stranded Ribo Nükleik asit
EBCoV	Enteric Bovine Coronavirus
ECoV	Equine Coronavirus
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektron Mikroskobu
ER	Endoplazmik Reticulum
ERGIC	Endoplazmik Reticulum-Golgi Aygıtı Arasında Vezikül
FAT	Floresan Antikor Testi
FECV	Feline Enteric Coronavirus
FIP	Feline Infectious Peritonitis
F Primer	Forward Primer
gmRNA	Genomik Ribonükleik Asit
gr	Gram
HA	Hemaglutinasyon
HCoV	Human Coronavirus
HE	Hemaglütinin Esteraz
H&E	Hematoksilen&Eozin
HI	Hemaglutinasyon İnhibisyon
HmLu	Hamster Lung Cell
HRP	Horse Radish Peroksidase

HRT	Human Rectal Tumor
IBV	Infectious Bronchitis Virus
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
Ig	İmmunglobulin
IHC	İmmuno Histokimyasal
kb	Kilobayt
kd	Kilodalton
M	Membran
MAbs	Monoklonal Antikor
MAP	Mitojenle Aktive Protein
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
mg	Miligram
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MHV	Mouse Hepatitis Coronavirus
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MLV	Modified Live Vaccine
mRNA	Messenger Ribo Nükleik Asit
MQ WATER	Milli Q Water

NK	Negatif Kontrol
nm	Nanometre
nsp	Non Structural Protein
OD	Optical Density
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PHEV	Porcine Hemagglutine Encephalomyelitis Virus
PI3V	Parainfluenza 3 Virus
RBCoV	Respiratorik Bovine Coronavirus
PK	Pozitif Kontrol
RNA	Ribo Nükleik Asit
PRCV	Porcine Respiratory Coronavirus
R Primer	Reverse Primer
ROS	Reactive Oxygen Species
RTC	Replication Transcription Complex
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RT-RPA	Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification
S	Spike
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
sgmRNA	Subgenomic Messenger Ribo Nükleik Asit

ssDNA	Single Stranded Deoksiribo Nükleik asit
TAE	Tris Acetate–Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
TGEV	Transmissible Gastroenteritis Coronavirus
TRS	Transcriptional Regulatory Sequences
Ts	Temperature Sensitive
UPR	Unfolded Protein Response
VNT	Virus Nötralizasyon Testi
WD	Winter Disease

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Solunum Yolu Enfeksiyonu Klinik Belirtileri Gösteren Sığırlarda Bovine Coronavirus (BCoV) Enfeksiyonlarının PCR Tekniği ile Araştırılması

MELTEM MENEKŞE

Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2018

Bovine coronavirus (BCoV) solunum ve barsak sistemini etkileyen pnömoenterik bir karakter göstermektedir. Bu virus hem gaita hem de nazal sekresyonlarla saçılmakla beraber akciğerleri de etkileyebilmektedir. Ancak tüm Dünyada ve Ülkemizde solunum yollarını etkileyen BCoV'lar ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, solunum yolu BCoV enfeksiyonlarının bölgemizdeki durumunu ortaya koymak ve bu enfeksiyonlarda virus saçılımı, serolojik durum ve klinik belirtiler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Solunum yolu klinik belirtileri gösteren farklı cinsiyetlere sahip 0 ile 2 yaş arasındaki toplam 92 hayvandan burun svabı örnekleri elde edildi. Svap örnekleri spesifik primerler kullanılarak RT-PCR analizine tabi tutuldu. Buna ilaveten aynı hayvanlardan serum örnekleri toplandı ve serumlar BCoV antikorları yönünden indirekt-ELISA yöntemi kullanılarak incelendi. Sonuç olarak 10 örnek (% 10.87) BCoV yönünden RT-PCR yöntemi ile pozitif olarak belirlendi. İndirekt ELISA testi ile gerçekleştirilen serolojik çalışmada ise antikor pozitif hayvan oranı tüm hayvanlar arasında % 93.48 iken burun akıntıları ile BCoV saçılımı gösterdiği belirlenen hayvanlarda % 90 (9/10) olarak saptandı.

Sonuç olarak bu bulgular, ülkemizde solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan viral etkenler arasında BCoV'ların da göz önünde tutulması, BCoV izolasyonlarının gerçekleştirilmesine yönelik daha fazla araştırmanın yapılması ve izole edilen virusların antijenik ve genetik özelliklerinin ayrıntılı olarak araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bununla beraber Türkiye'deki enterik ve respiratorik coronaviruslar arasındaki farklılıkları belirleyecek çalışmaların hedeflenmesi de önemli bir unsurdur.

Anahtar Sözcükler: Respiratorik BCoV; teşhis; RT-PCR; seroloji

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Bovine Coronavirus (BCoV) Infections in Cattle with Clinical Signs of Respiratory Tract Infection by PCR Technique

MELTEM MENEKŞE

Department of Veterinary Virology

PhD THESIS / KONYA-2018

Bovine coronavirus (BCoV) is a pneumoenteric virus that infects respiratory tract and intestine. It is shed in both feces and nasal secretions and also infects the lung. However, the number of studies on respiratory tract BCoV infections is limited in the world and our country. The aim of this research was to detect the situation in respiratoric BCoV infections and the evaluation of viral sheeding, serologic stuation and clinical signs.

A total of 92 nasal swab samples were obtained from 0-2 years-old cattle having different sex with respiratory symptoms. The collected swab samples were subjected to RT-PCR analysis using specific primers. In addition, serum samples were collected from same animals and BCoV antibodies examined by antibody-detection ELISA. Finally, ten (10.87%) samples were detected as positive for BCoV by RT-PCR. The seroconversion rate was 93.48% (86/92) in animals by ELISA and 90% (9/10) in animals shedding BCoV in the nasal swabs.

In conclusion, these findings suggest that BCoV should be considered among respiratory infections in our country and further studies needed to isolate BCoVs and to investigate their antigenic and genetic properties. However the differences between enteric and respiratoric coronaviruses should be determined in Turkey.

Key Words: Respiratoric BCoV; diagnosis; RT-PCR; serology

1.GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Coronavirüsler (CoV) kuşlarda ve memelilerde solunum sistemi, gastro-enterik, nörolojik ve karaciğer ile ilgili akut ve kronik hastalıklara yol açan RNA virüsleridir (Decaro ve ark 2008a, Saif 2010). Bu virüslerin büyükbaş hayvanlar, kümes hayvanları ve domuzlarda önemli hastalıklara neden olup ekonomik kayıplara yol açtıkları ve kemirgen, kedi, köpek ve tavşanlarda da ciddi hastalıklar meydana getirdikleri bildirilmiştir (Lai ve ark 2007). Örneğin tavuklarda infeksiyöz bronşit ve nefrite; domuz yavrularında gastroenterit ve ensefalite; hindi, köpek ve buzağılarda enterit ve respiratorik problemlere; farelerde hepatit ve ensefalite; sıçanlarda pnömoni ve sialodakriyoadenite; kedilerde infeksiyöz peritonite sebep olmaktadır (Tablo 1). Enfekte olan hayvan türlerinin çeşitliliği ve sebep olduğu hastalıkların şiddeti, CoV'ları en önemli hayvan sağlığı patojenlerinden biri haline getirmiştir (McIntosh 2005, McIntosh ve ark 2005).

Aynı zamanda farklı konakçıların reseptörlerini kullanma yetenekleri, mutasyon ve rekombinasyon yoluyla hızla evrimleşebilmeleri sebebi ile yeni konakçılara ve ekolojilere uyum sağlayarak geniş bir hastalık yelpazesine neden olmaktadır (Lau ve ark 2015).

Coronavirüsler *Nidovirales* dizini içerisindeki *Coronaviridae* familyası içerisinde yer alır (Decaro ve ark 2008a). *Coronaviridae* ailesi Coronavirinae ve Torovirinae alt ailelerine sahiptir (Zhang ve ark 2007a). Coronavirüsler genetik ve serolojik özelliklerine göre Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus ve henüz onaylanmamış Deltacoronavirus olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Bovine CoV (BCoV), Betacoronavirus cinsinin A soyunun Betacoronavirus 1 virus türüne aittir (Bidokhti 2013). BCoV zarlı, tek iplikçikli, pozitif polariteli, segmentsiz bir RNA'ya sahiptir (Fulton ve ark 2013).

Çizelge 1.1. Coronavirus ile ilişkili enfeksiyonlar (Veterinary Virology, Third Edition)

Antijenik Grup	Virus	Hastalık
Grup 1 (Memeli Virusları)	Transmissible gastroenteritis virus of swine	Gastroenteritis
	Porcine epidemic diarrhea virus	Gastroenteritis
	Feline infectious peritonitis virus	Peritonitis, Pneumoni, Meningoensefalitis, Panoftalmitis, Wasting sendrom
	Feline enteric coronavirus	Yavru kedilerde diyare
	Canine coronavirus	Enteritis
	Human coronavirus 229 E	Soğuk algınlığı
	Grup 2 (Memeli ve Kuş Virusları)	Mouse hepatitis virus
Sialodacryadenitis virus (rat)		Sialodacryadenitis
Bovine coronavirus		Gastroenteritis, Respiratorik hastalıklar
Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virüs		Kusma, Kaşeksi, Encephalomyelitis
Human coronavirus OC43		Soğuk algınlığı
Bluecomb virus of turkeys		Enteritis
Grup 3 (Kuş Virusları)	Infectious bronchitis virüs	Trakeabronşitis, Nefritis
Gruplandırılmamış	Tavşan coronavirusları	Enteritis

BCoV, sığırlarda üst ve alt solunum yollarını ve bağırsakları etkileyen pneumoenterik bir virusdur. BCoV enfeksiyonu sonucu sığırlarda etiyolojik açıdan üç farklı klinik semptom ortaya çıkmaktadır. Bunlar buzağı diyaresi (CD), yetişkin sığırlarda hemorajik diyare ile seyreden kış dizanterisi (WD), besi sığırlarında shipping fever veya bovine respiratorik hastalık kompleksi (BRDC) olarak isimlendirilen ve çeşitli yaş gruplarındaki sığırlarda rastlanan respiratorik enfeksiyon sonucu oluşan belirtilerdir (Saif 2010). Bovine respiratorik hastalık (BRD); bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), bovine viral diyare virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), parainfluenza-3 virus (PI3V) ve bovine coronavirusu (BoCV) gibi viral, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* ve *Mycoplasma* spp. gibi bakteriyel etkenler tarafından meydana getirilen kompleks bir enfeksiyonu tanımlar (Fulton ve ark 2016). Respiratorik sendrom sıklıkla, sığırlarda özellikle stres faktörlerinin artması sebebiyle transport esnasında veya sonrasında gözlemlenmiştir (Decaro ve ark 2008a).

Coronavirüsler zoonoz salgınlar da dahil olmak üzere, türler arası bulaşmada büyük bir potansiyel risk oluşturmaktadır (Bidokhti 2013). 2003 yılında Dünya çapında insanları etkileyen SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome) ile Avrupa ve Orta Asya'daki insanları etkileyen MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome)'un hayvansal orijinli olduğu ileri sürülmüştür. İnsanlarda ölümcül enfeksiyonlara neden olan ve türler arası bulaşmaya iyi bir örnek teşkil eden SARS-CoV ve MERS-CoV'unun yarasalardan orjin aldığı düşünülmektedir (Millet ve ark 2015). Elde edilen verilere göre yarasaların MERS-CoV için doğal rezervuar olduğu, dromedary develerinin ise arakonakçı olduğu ileri sürülmüştür. MERS-CoV enfeksiyonu dromedary develerinde genellikle asemptomatik seyretmektedir ancak nadiren hafif respiratorik belirtiler gözlenmiştir (Wernery ve ark 2017). Ayrıca, CoV'lerin tür bariyerini geçebileceği ve öldürücü zoonotik insan patojenlerine dönüşebilecekleri tahmin edilmektedir (Fung ve ark 2014). Özellikle global ticaret, ormanlık alanların azalması, yoğun şehirleşme ve yoğun tarım uygulamaları gibi unsurlar, coronavirusların yeni ve ciddi zoonotik salgınlara yol açma ihtimalini arttırdığı için endişe kaynağıdır (Millet ve ark 2015).

Çeşitli virüsleri barındırmalarına rağmen, araştırmalar sonucunda yarasalarda nadiren hastalık bulguları gözlemlenmektedir. Bu asemptomatik enfeksiyonları açıklamak için hipotezler geliştirilmiştir. Bir hipoteze göre, uçan tek memeli olan yarasaların büyük miktarlarda reaktif oksijen türü (ROS) ürettiği ve böylece oksidatif

stresi sınırlayan genleri modüle ettiği ve bunun da viral replikasyon ve patogeneizde azalmaya neden olabileceği düşünölmektedir (Reshi ve ark 2014). Benzer şekilde, doğuştan modifiye immun yanıt da, yarasalar tarafından barındırılan çeşitli viral havuz oluşmasına katkıda bulunabilir. Doğal katil hücreleri üzerinde yer alan immunoglobulin ve benzeri moleküllere spesifik reseptörler, araştırılan bazı yarasa türlerinde bulunmamakta veya önemli ölçüde az bulunmaktadır. Bu durum potansiyel olarak enfeksiyonu, takiben hastalığı ve hastalığa bağlı olarak hasarı sınırlamaktadır (Zhang ve ark 2013, Ahn ve ark 2016). Yarasaya ait interferon alt tipleri muhtemelen hastalığı sınırlamakla beraber viral enfeksiyonun düşük seviyede devamlılığına izin verir (Zhou ve ark 2016). Başka bir olasılık ise yarasa türleri ile barındırdıkları viruslar arasında ortak bir ilişki olduğudur (Menachery ve ark 2017).

Enfeksiyöz etkenler içerisinde yer alan viral etkenlere, sekonder enfeksiyonlara zemin hazırlamaları, spesifik bir tedavisinin bulunmayışı ve bulaşmalarının daha kolay ve çabuk olması sebebiyle diğer etkenlere nazaran ekstra önem verilmesi gerekmektedir. Bu hastalıkların sonucunda önemli ekonomik kayıplar ile hayvan refahının azaldığı gözlenmiştir. Bu virusun meydana getirdiği negatif sonuçları azaltmanın yolu, sürüler arasında virusun bulaşmasını önlemektir. Sürüler arası bulaşma, direkt olarak canlı hayvan transferiyle veya indirekt olarak kontamine ekipman veya personel ile gerçekleşmektedir. Virusun yayılmasını önlemek için alınacak tedbirler duyarlı hayvanlara virusun bulaşma potansiyeli ve koruyucu bağışıklığın rolü hakkında bilgilendirmeye dayandırılmalıdır (Oma ve ark 2016).

Gözlemlenen ölümler genellikle viral etkenlerle beraber bakteriyel etkenlerin hastalığa karışmasıyla oluşmaktadır. Viruslar solunum yollarında bakteriyel etkenlerin kolonizasyonu ve replikasyonuna olanak sağlayan bir ortam oluştururlar. Bu işlemleri iki mekanizma ile yaparlar; birincisinde viral etkenler, solunum yoluna ait mukozaları yapısal olarak bozarak bakterilerin yapışmasına, mukozal erezyonlara ve bakterilerin kolonizasyonuna olanak sağlar. İkinci mekanizma ise viruslar, alveolar makrofajların fonksiyonlarında bozulma, lenfosit proliferasyonunun baskılanması, apoptozis, sitokin ve yangısal mediatör salınımına yol açarak hastalıkların oluşumuna katkıda bulunurlar (Ridpath ve ark 2010).

Dünya’da ve Ülkemiz’de coronavirusların enterik sisteme olan etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunsa da, respiratorik sisteme yerleşim gösteren virusun teşhisi ve karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar sınırlıdır (Timurkan ve ark 2015).

1.2. Etiyoloji

Nidovirales sınıfı viruslar omurgalıları konakçı olarak kullanan zarlı RNA viruslarıdır. *Nidovirales* dizini *Roniviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* ve *Coronaviridae* virus ailelerini içermektedir (Ulaşlı ve ark 2013, Cong ve ark 2017)(Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. *Nidovirales* takımının mevcut taksonomik organizasyonu (ICTV 2017).

TAKIM	FAMİLYA	ALT FAMİLYA	CİNS
<i>NIDOVİRALES</i>	<i>Coronaviridae</i>	Coronavirinae	Alpha-CoV
			Beta-CoV
			Gamma-CoV
			Delta-CoV
		Torovirinae	Bafinivirus
		Torovirus	
	<i>Roniviridae</i>		Okavirus
	<i>Arteriviridae</i>		Dipartevirus
			Equartevirus
			Nesartevirus
			Porartevirus
			Simartevirus
	<i>Mesoniviridae</i>		Alphamesonivirus

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV) tarafından hazırlanan rapora göre *Nidovirales* takımı içinde yer alan *Coronaviridae* familyası Coronavirinae ve Torovirinae olmak üzere 2 alt aileden oluşmaktadır. *Coronaviridae* ailesinin üyeleri zarlı, pozitif polariteli olup, memeliler (corona ve toroviruslar), kuşlar (coronaviruslar) ve balıkları (bafiniviruslar) etkileyen RNA viruslarıdır. Coronavirusların sınıflandırılması; genom organizasyonları, genom dizilimindeki benzerlikler, viral proteinlerinin antijenik özellikleri, replikasyon stratejileri, virionlarının yapısal özellikleri, etkiledikleri konakçılar, affinite duydukları hücre ve dokular, patojenik ve sitopatojenik özellikleri, yayılma biçimi ve fizikokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır (Lai ve ark 1997, ICTV 2017).

Virionlar; küresel, 120-160 nm çapında (coronavirinae), 170-200 × 75–88 nm (Bafinivirus) olup basiliiform partiküller karakteristik olarak hilal şeklinde içine bükülmüş (torovirus) haldedir. Küresel partiküller elektronmikroskop ile güneş tacını andıran bir görüntü oluşturmuş ve partiküller tipik olarak büyük, sopa veya yaprak şeklinde yüzey peplomerleri ile dekore edilmiştir. *Coronaviridae*'ler bilinen en büyük RNA viruslarıdır (Ulaşlı ve ark 2013). Nükleokapsid helikal simetridir ve deterjanlar ile muamele edildiklerinde viriondan ayrılabilirler. Coronavirus nükleokapsidi gevşek bir şekilde sarılmış gibi görünürken, Torovirinae belirgin şekilde tübüler yapıdadır (ICTV 2011). Coronaviruslar ve toroviruslar arasında herhangi bir dizi benzerliği olmamasına rağmen bu iki virus ailesinin genomik RNA organizasyonu benzerlik göstermektedir (Ulaşlı ve ark 2013). BCoV tek iplikçikli, segmentsiz bir RNA'ya sahiptir (Fulton ve ark 2013).

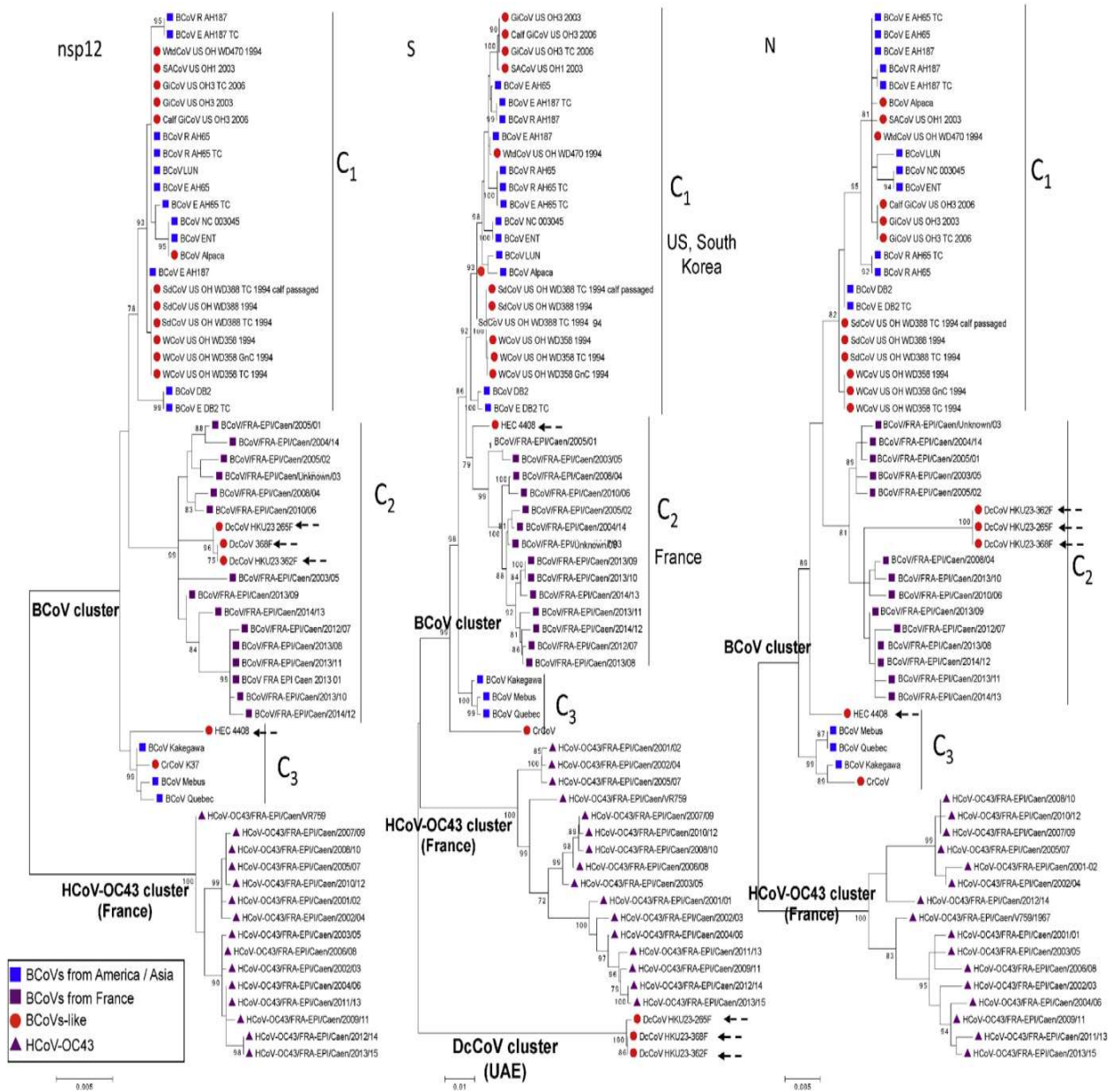
Coronavirus genetik ve serolojik olarak özelliklerine göre 4 gruba ayrılır; Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus ve Deltacoronavirus (Bidokhti 2013, ICTV 2017). Alfacoronavirus domuz, köpek, kedi ve insanı enfekte eden virusları (human coronavirus NL63 (HCoV-NL63), porcine transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), porcine respiratory coronavirus (PRCV)), Betacoronavirus sığır, insan, at, domuz ve yarasa viruslarını içerir (SARS-CoV, MERS-CoV, bat coronavirus HKU4, mouse hepatitis coronavirus (MHV), bovine coronavirus (BCoV), human coronavirus OC43) (Li 2016). Gammacoronavirus ise kuşlara adapte olmuş virusları içerir (González ve ark 2003, Vijgen ve ark 2005). Ancak elde edilen son bulgulara göre Gammacoronaviruslar memelilerde de tespit

edilmiştir (Jonassen ve ark 2005, Mihindukulasuriya ve ark 2008). Deltacoronavirus da ağırlıklı olarak kuşlarda bulunsa da, memelilerde de potansiyel olarak bulunabileceği bildirilmiştir (Dong ve ark 2007, Woo ve ark 2012).

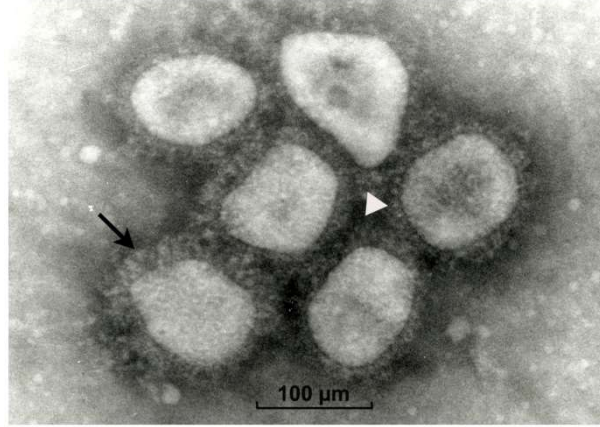
TGEV ve PRCV ile feline infectious peritonitis (FIPV) ve feline enteric coronavirus (FECV)'un, doku tropizmlerinin farklılaşması sonucu birbirlerinin varyantlarını temsil ettikleri ileri sürülmektedir. Coronavirus türlerinin çoğunda, sadece tek bir serotip tanımlanmaktadır. İstisna olarak en az 5 serotipin tarif edildiği IBV vardır. FIPV ve FECV suşları tek bir serotip oluştursa da suşlar enfektivite ve virülansta büyük ölçüde farklılıklar göstermekte ve çoklu biyo-türleri oluşturmaktadırlar. Pnömoenterik coronaviruslardan BCoV, PRCV ve infectious bronchitis virus (IBV), sırasıyla sığır, domuz ve tavuklarda solunum yoluna ait enfeksiyonlara neden olmaktadır. Son iki coronavirus burun mukozası, akciğer ve trakeada replike olurken, BCoV respiratorik sisteme ait dokular ile birlikte ince bağırsağın distalinde ve kolonda replike olmaktadır (Saif 1993).

Betacoronavirus cinsi kendi içerisinde A, B, C, D olmak üzere 4 gruba ayrılır (Castells ve ark 2017). Betacoronaviruslar; başta sığır ve insan olmak üzere, domuz, köpek, deve, ve tavşanları etkileyen, SARS ve MERS gibi zoonotik potansiyele sahip virusları da kapsayan bir gruptur (Woo ve ark 2009). SARS-CoV Betacoronavirus B grubuna, MERS-CoV ise Betacoronavirus C grubuna aittir (Lau ve ark 2015). BCoV, insan coronavirus OC43 (HCoV-OC43), at coronavirus (ECoV) ve domuz hemaglutine ensefalomyelitis virus (PHEV) ile birlikte Betacoronavirus cinsinin A soyunun Betacoronavirus 1 virus türüne aittir (Bidokhti 2013). Tüm BCoV izolatları serotip 1'e (2 alt tip) aittir ve pneumotropiktir. Enterik BCoV (EBCoV) ve respiratorik BCoV (RBCoV) suşlarının sadece S geninde nokta mutasyonlar olduğu ileri sürülmektedir (Khalili ve ark 2006 a).

Çizelge 1.3. 29 BCoV, 16 HCoV-OC43, 17 BCoV-benzerinin tam nsp12, S ve N genlerinin filogenetik analizi (Hu ve ark 2015).

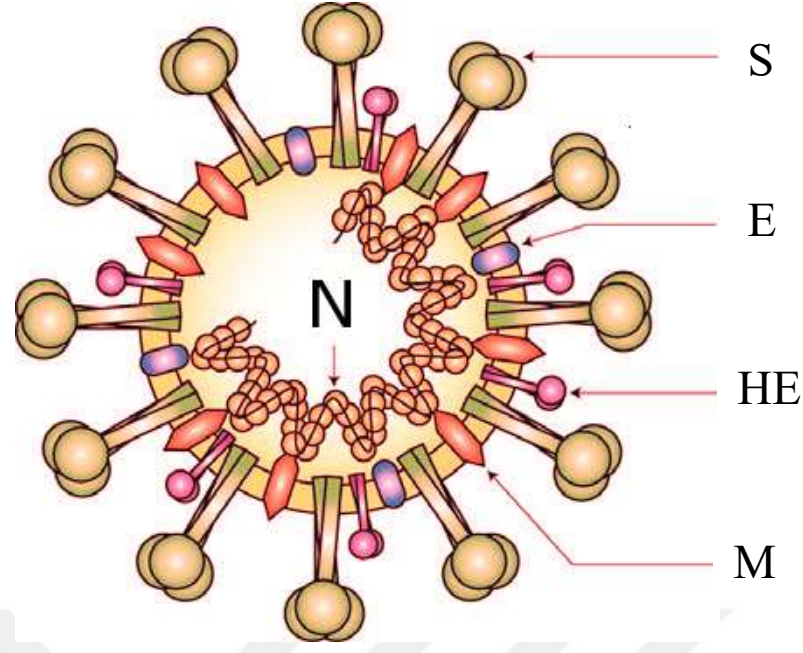


BCoV, pleomorfik şekilli, çift katlı kısa (hemaglütinin) ve uzun (spike) yüzey peplomerleri ile kaplıdır (Şekil 1). Beş ana yapısal proteini kodlayan RNA pozitif anlamlı, büyük bir genoma sahiptir (Saif ve ark 2010).



Şekil 1. Doku kültürüne uyarlanmış respiratorik BCoV'un immun elektron mikroskopik görüntüsü (Saif 2010).

BCoV, translasyona uğramayan 5' ve 3' uçlarına bitişik 13 ORF (Open Reading Frame) içermektedir. ORF'ların bazıları üst üste gelirken, diğerleri intergenik sekanslar olarak ayrılır. ORF 1 a ve 1 b, aktif, olgun RNA polimeraz ve diğer yapısal olmayan proteinleri oluşturmak üzere bölünen poliproteinleri kodlar. Beş ana yapısal protein genomik RNA'da kodlanır: spike (S) glikoprotein (ORF 4), membran (M) protein (ORF 9), nükleokapsid (N) protein (ORF 10), hemaglütinin esteraz (HE) protein (ORF 3) ve küçük membran (E) protein (ORF 8). Geri kalan ORF'lar bilinmeyen veya daha az karakterize yapısal proteinleri kodlar (Liu ve ark. 2006). (Şekil 2 ; Şekil 3)



Şekil 2. Coronavirus virion yapısı. RNA genomu HE, S, E, M viral membran içinde helikal oluşturmak üzere N proteini ile kompleks hale getirilir (Finlay ve ark 2004'den uyarlanmıştır).

S glikoproteini, amino ve karboksil grupları civarındaki belirgin fonksiyonel alanları taşıyan tip 1 membran glikoproteinidir (Hasoksuz ve ark 2005). BCoV S proteini, 1363 amino asitten ibaret olup, amino asit pozisyonları 768 ve 769'da bölünerek S1 ve S2 olarak adlandırılan iki alt birimi oluşturmaktadır (Yoo ve ark 2001). S1 (N-terminal yarımı) ve S2 (C-terminal yarımı) olmak üzere iki altbirimden oluşan S proteini, virus konakçı etkileşimi sırasında birçok önemli fonksiyona sahiptir. S1 altbirimi konakçı hücre reseptörlerine bağlanma ile ilişkili iken, S2 altbirimi viral ve hücrel membranların füzyonuna aracılık etmek için gerekli olan bir transmembran proteindir. Böylece, S proteini virusun konakçı hücreye girişi ve patogenez için önemlidir. S proteinin bir başka önemi ise, antijen özelliğinde olmasıdır. S protein tarafından indüklenen antikorlar yüksek düzeyde nötralizan etkiye sahiptirler ve bir enfeksiyon süresince hemaglütinin esteraz proteini tarafından indüklenen antikorlardan daha kararlıdır. BCoV S1 alt birimindeki tek bir amino asit değişikliği (A528V) virus nötralizasyonuna olan direnci göstermektedir. Coronaviruslar arasındaki doku tropizmi ve konakçı çeşitliliğindeki varyasyon, büyük ölçüde S proteinindeki varyasyona dayandırılabilir (Abraham ve ark 1990, Kubo ve ark 1994, Ballesteros ve ark 1997, Liu ve ark 2006, Saif 2010).

Coronavirüsler, reseptöre bağlanma, füzyonun aktivasyonu ve internalizasyonu içeren hücreye girişin her adımında, çok sayıda mekanizmalar ve stratejiler geliştirmeleri açısından dikkat çekicidirler (Belouzard ve ark 2012).

BCoV N proteini, helikal nükleokapsid formundaki viral genomik RNA'ya bağlanan 50-kd'luk bir fosfoproteindir (Cho ve ark 2001a). N proteini nükleokapsitte bulunan tek proteini oluşturur. N proteini, birbiri ardına dizilmiş boncuk taneleri tarzında viral genoma bağlanır. Aynı zamanda replikaz kompleksinin anahtar bileşenini oluşturan nsp3'ü ve M proteinini de bağlar. Bu protein etkileşimleri muhtemelen viral genomun replikaz-transkriptaz kompleksine bağlanmasına ve kapsit içerisine alınan genomun, viral partiküllerin içerisine doğru paketlenmesine yardımcı olur (Fehr ve Stanley 2015). N proteinine karşı üretilen antikorların *in vitro* RNA polimeraz reaksiyonunu engellemesi olgusundan yola çıkılarak bu proteininin viral RNA'nın replikasyonunda da rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. BCoV'un N proteini aynı coronavirus serogrup 2'nin bir üyesi olan mouse hepatitis virus ile %70'in üzerinde amino asit dizilim benzerliği gösterir ancak, sırasıyla coronavirus serogrup 1 ve 3'ün üyesi olan transmissible gastroenteritis virus ve infeksiyöz bronşitis virus'un N proteini ile % 29 oranında bir benzerliği vardır (Cho ve ark 2001a).

M proteini, virion içinde en fazla miktarda bulunan yapısal proteindir (Armstrong ve ark 1984). Coronavirus M glikoproteininin 3 tane transmembran bölgesi bulunmaktadır. Küçük bir N-terminal glikozile edilmiş ektodomain ve viral partikülün içine doğru 6-8 nm uzanan çok daha büyük bir C-terminal endodomainine sahiptir (Nal ve ark 2005). M proteini, golgi aygıtında glikolize edilmekte (Niemann ve ark 1984, Haan ve ark 1998), virionun hücre içerisine füzyonunda ve proteinin antijenik özellik kazanmasında önem arz etmektedir (Alexander ve ark 1984, Wissink ve ark 2004). N proteini genomik RNA'ya bağlanarak kompleks oluşturur ve daha sonra da M proteini de bu kompleks ile endoplazmik retikulum-golgi aygıtı ara kompartmanında etkileşime geçerek virionların oluşturulmasını tetikler (Haan ve ark 1998, Escors ve ark 2001, Narayanan ve ark 2001).

CoV E proteini küçük bir integral membran proteindir ve tahmini olarak tek bir hidrofobik alana sahiptir. Genellikle iki veya üç sistronik mRNA'da ikinci veya üçüncü mesaj olarak kodlanır. Virionların toplanmasında önemli bir role sahiptir. E proteininin bir N-terminal endodomaini ve bir C-terminali endodomaini vardır ve iyon kanal

aktivitesine sahiptir, konakçı proteinler ile etkileşir ve multiple membran topolojilerine sahip olabilir (Ruch ve ark 2012, Fehr ve Stanley 2015). Coronavirus E proteinleri yaklaşık olarak 76 ile 109 amino asit uzunluğunda olan küçük proteinlerdir. E proteinlerinin N terminalinde bulunan yaklaşık 30 aminoasit dizisi, virusların zarına tutunmayı sağlar (Raamsman ve ark.2000). Ayrıca coronavirus E proteinleri, virionların hücre içerisinde bir araya getirilmesinde ve morfogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. (Ulaşlı ve ark 2013).

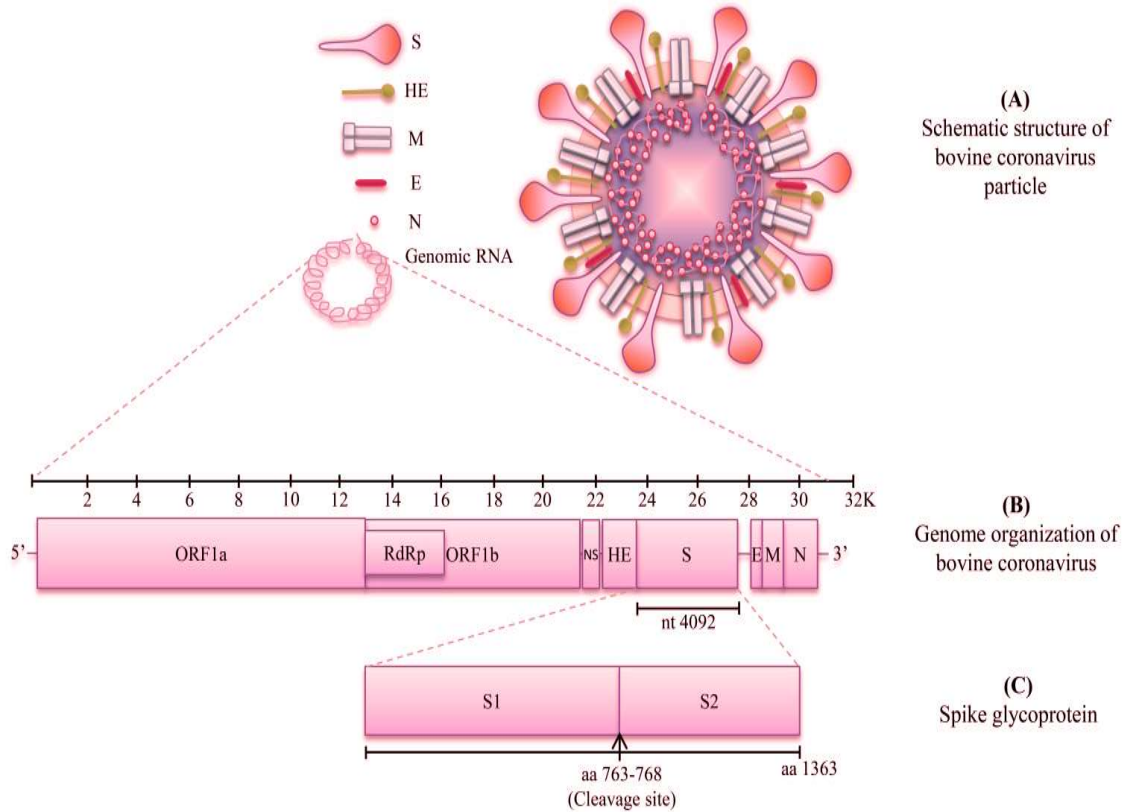
Hemaglütinin esteraz (HE), Betacoronavirusların bir alt kümesinde bulunur. Protein bir hemaglütinin gibi davranır, yüzey glikoproteinleri üzerinde siyalik asitleri bağlar ve asetil esteraz aktivitesini içerir (Klauegger ve ark 1999). Bu aktiviteler S protein aracılı hücre girişini ve virusun mukozadan yayılımını arttırmaktadır (Cornelissen ve ark 1997, Fehr ve Stanley 2015). Bazı coronavirusların virion yüzeyinde hemaglütinin esteraz proteininden oluşan küçük bir peplomer bulunur (King ve ark 1985). BCoV'de HE proteini tahmini molekül ağırlığı 62 ila 65 kDa olan 424 aa içerir. Genellikle virionda disülfat bağı ile bağlanmış 126 kDa homodimeri olarak bulunur. İnfluenza C virusunun HEF proteini ile evrimsel olarak yakından ilgilidir. İnfluenza C virusundaki HEF protein gibi, BCoV HE proteini reseptör bağlama ve reseptör yıkıcı aktiviteleri içerir, ancak füzyon aktivitesine sahip değildir. Reseptör yıkıcı aktivite, asetil grubun konakçı hücre ve eritrositlerdeki N-asetil-9-o-asetilneuraminic asid içeren C-9 pozisyonundan salıvermek için bir ester bağına hidrolize eden asetilesteraz ile ilişkilidir. Çeşitli çalışmalarda, BCoV'a ait HE proteini *in vivo* ve *in vitro* virus enfektivitesini nötralize eden mAB'leri indüklediği gösterilmiş, BCoV HE proteini üzerinde dört nötralizan epitop tanımlanmıştır. BCoV'un HE ve S proteinleri kültüre edilmiş eritrosit hücrelerinde aynı reseptör determine edici olarak tanımlanmıştır. BCoV'un hem S, hem HE proteinlerinin virus enfeksiyonu için gerekli olduğu ancak, tek bir proteinin enfeksiyon başlatmak için yeterli olmadığı anlaşılmıştır (Popova ve ark 2002).

Moleküler biyolojik araştırmalar açısından fare hepatit virusun (MHV) en çok çalışılan CoV'lardır ve *Coronaviridae* ailesi üyelerini araştırmak için iyi bir model sistemdir. MHV coronaviruslarının hücre kültürü ortamında replikasyonu için HE proteinlerine ihtiyaçları yoktur. Onun için moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarında HE proteinini kodlayan gen bölgesi çıkarılarak rekombinant viruslar

oluşturulabilmektedir. HE gen bölgesinin yerine farklı mutant gen bölgeleri eklenebilmektedir (Ulaşlı ve ark 2013).

Virus partiküllerinde glikoproteinlerden en fazla miktarda bulunan M proteinini olup, en az miktarda bulunan protein ise E proteinidir. Bütün zarlı proteinler ve N proteinini virionların tamamında bulunmaktadır. Ayrıca, bu proteinlerin aralarındaki etkileşim sayesinde virus partiküllerinin bir araya toplandığı düşünülmektedir (Ulaşlı ve ark 2013).

Yapılan bir çalışmada coronavirus E ve M proteinleri memeli ekspresyon vektörleri aracılığıyla birlikte eksprese edilerek hücre içerisinde virus partiküllerine benzer yapılar oluşturduğu gözlenmiştir (Baudoux ve ark 1998, Bos ve ark 1996). Yapılan diğer bir çalışmada bu durumu destekler biçimde genomundan E proteinini çıkarılmış rekombinant fare hepatit virusu (MHV) ve SARS viruslarının enfekte edebilme yeteneklerinde ciddi oranda düşüşler tespit edilmiştir (DeDiego ve ark 2007, Kuo ve ark 2003).



Şekil 3. BCoV partikülleri ve bileşenlerinin şematik diyagramı. A) Bütün yapısal komponentleri taşıyan BCoV parçacığı. B) BCoV'un viral protein genlerini karakteristik olarak gösteren açılmış genomik RNA görüntüsü. C) S glikoproteininin alt üniteleri: S1 ve S2 (Saif 2010'dan uyarlanmıştır).

Diğer zarlı viruslar gibi, BCoV'ler de deterjanlara, yağ çözücülere (eter, kloroform vb) karşı duyarlı olup dezenfektanlar, ısı ve formalin ile inaktive olmaktadır (Saif ve ark 2010). CoV düşük sıcaklıklarda ve düşük ultraviyole ışık yoğunluklarında enfeksiyözitesini korumaktadır (Bidokhti 2013).

1.3. Replikasyon Mekanizması

Diğer zarlı viruslarla karşılaştırıldığında coronavirusların replikasyonu yavaştır. Örneğin İnfluenza virusunda replikasyon süresi 6-8 saatken, CoV'da 24 saattir (Liecester University Department of Microbiology and Immunology, Coronaviruses 2017).

Coronaviruslar ya hücre yüzeyine doğrudan veya endozomal olarak füzyon yoluyla giriş yapabilirler (Millet ve ark 2015). Coronavirusların hücre kültürü ortamında replikasyon ve transkripsiyon mekanizmalarını anlamak için MHV model sistem olarak kullanılmaktadır (Ulaşlı ve ark 2013). MHV-4 suşunun bir varyantının, nötral pH'da hücre yüzeyine direkt olarak bağlanabildiği ve ayrıca endositik yolla hücrelere girebildiği gösterilmiştir (Nash ve Buchmeier 1997). Bunun dışında hepatit, ensefalit, immundemiyelinizan ve multipl skleroz (MS) hastalığının fare modeli oluşturulmasında MHV coronavirusları kullanılmaktadır (Ulaşlı ve ark 2013).

Coronavirusların bütün replikasyonu konakçı hücrenin sitoplazmasında gerçekleşmektedir. Virus öncelikli olarak S protein aracılığıyla hücre yüzeyinde bulunan reseptöre bağlanmaktadır. S proteini reseptöre bağlandığında S proteinin yapısında konformasyonel bir değişiklik meydana gelmekte ve virusun hücre içerisine giriş süreci başlamaktadır (Holmes ve ark 1997, Bosch ve ark 2003). Coronaviruslar, füzyon peptidinin hedef hücre membranlarının içerisine zamanında salınımına izin veren S proteinini aktive etmek için, reseptöre bağlanma, düşük pH ve proteolitik aktivasyon gibi çeşitli mekanizmaları kullanırlar. Bu durum, viral giriş basamakları arasında zamansal olarak bir uyumun sağlanmasına olanak verir. Konakçı hücre reseptörlerine bağlanma ile birlikte, viral zarın konakçı hücre membranları ile füzyonu başarılı bir enfeksiyon için kritik bir adımdır (Millet ve ark 2014). Birçok coronavirus hücre içerisine reseptör aracılığıyla pH'a bağlı endositoz ile girmektedir. Hücre içerisine girmesinden sonra virusun genomik RNA'sının üçte ikisinden direkt olarak pp1a ve pp1b diye isimlendirilen iki tane büyük protein sentezlenmektedir. Bu proteinlerin sentezinden sonra pp1a ve pp1b, viral proteazlar yardımıyla 16 tane yapısal olmayan proteine (nsp)

dönüştürülmektedir. Bu 16 nsp'ler kendi arasında etkileşim kurarak çift zarlı kesecikler (DMV) oluştururlar. Bu çift zarlı kesecikler aynı zamanda virusun replikasyon ve transkripsiyon kompleksleridir (RTC). Bu nsp'ler virus replikasyonunda ve transkripsiyonunda hayati öneme sahiptirler. Coronavirusların transkripsiyonunda ise pozitif polariteye sahip g mRNA ve sgmRNA'nın sentezi için negatif polariteye sahip g mRNA ve sgmRNA kalıp vazifesi görmektedir. Pozitif ve negatif polariteye sahip RNA'lar enfeksiyonun belirli aşamalarında çift sarmallı RNA (dsRNA) oluştururlar. dsRNA'nın DMV'lerin içerisinde olduğu ve toplandığı gösterilmiştir. Coronavirusların replikasyonu sırasında oluşturulan dsRNA'lar interferon- β uyarılmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı dsRNA'nın DMV'lerin içerisinde toplanması bir nevi bağışıklık sisteminden kaçış olarak da düşünülmektedir (Ulaşlı ve ark 2013). Yapısal proteinlerin translasyonu için farklı boylarda mRNA'lar sentezlenmektedir (Lai ve ark 1997, Pasternak ve ark 2006). Farklı boydaki mRNA'lara alt genomik mRNA (sub-genomic mRNA (sgmRNA)) denilmektedir. Coronavirusların transkripsiyonu devam etmeyen RNA sentezi şeklinde olmaktadır (Sawicki ve ark 2007). Bütün sgmRNA'lar 5' ucunda öncül diziler içermektedir. Ayrıca sgmRNA'ların 3' ucunda poliadenilleşme olmaktadır (Ulaşlı ve ark 2013). Virusun oluşturduğu sgmRNA konakçı hücrenin mRNA'sına yapısal olarak benzerlik göstermektedir. Viral sgmRNA'larda translasyona uğramayan bölgeler vardır. Bu bölgeler virusların replikasyonu ve transkripsiyonu için önemlidir (Sawicki ve ark 2007). Genom, replikaz proteinlerinin translasyonu için bir mRNA gibi davranmasına izin veren 3' poli (A) kuyruğu ile birlikte bir 5'cap yapısı içermektedir. Yapısal olmayan proteinleri (Nsps) kodlayan replikaz geni, sadece viral genomun yaklaşık olarak 10 kb'ini oluşturan yapısal ve yardımcı proteinlerin aksine, genomun yaklaşık 20 kb'lik bir kısmını kaplar. Genomun 5' ucu, RNA replikasyon ve transkripsiyonu için gerekli olan multiple yapıları içeren bir lider dizisi ve translasyona uğramayan bölge içermektedir (Fehr ve Stanley 2015). Bütün viral yapısal proteinler virusların sgmRNA'larından sentezlenmektedir. Sentezlenen yeni yapısal proteinler endoplazmik retikulumun içerisine bırakılmaktadır. Bütün yapısal proteinler virionların üzerinde bulunmaktadırlar (Sawicki ve ark 2007).

Coronavirus S proteininin, konakçı hücrenin salınım bölgesinde lokalize olduğu, M proteininin ise yoğun olarak golgi cisimciği üzerinde lokalize olduğu, E proteininin ise endoplazmik retikulumda ve golgi cisimciğinde lokalize olduğu gösterilmiştir. Bir araya

getirilen virionlar hücrenin genel salgı yolumu kullanarak hücreden salınmaktadır (Ulaşlı ve ark 2013).

Elektron mikroskopu incelemelerine göre virus tomurcuklanmasının meydana geldiği yer, ERGIC denen endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı arasındaki düz duvarlı vesiküllerdir. Fakat enfeksiyon ilerlerken endoplazmik retikulum da virus olgunlaşma yeri olmaktadır. Her zaman, M ve E proteinleri arasındaki etkileşim, normal virus tomurcuklanma sürecini tetiklemektedir. E proteini virionda çok küçük miktarlarda bulunur; bir E proteinine karşılık 100 M proteini olabilir. Buna göre E proteini belki de virion oluşumunda yapısal bir role sahip değilse de, virion morfogenezinde gereken membran değişimini başlatıcı unsur olarak görev yapmaktadır (Holmes ve ark 1996).

Tomurcuklanmadan sonra virus partikülleri golgi aygıtına giderler, daha ileri morfolojik değişimler geçirerek olgunlaşırlar ve salgısal vesiküllere ulaştıklarında, sıkı ve elektron-yoğun öz (kor) kısımlarıyla olgun bir virus partikülü görünümü almış olurlar. Virionlar büyük, düz duvarlı vesiküllerde birikir. Bu vesiküller plazma membranına ekzositozla yapışır ve ekstraselüler alana virusları salar (Lai ve ark 2007). Ya da apoptozis ile hücreden salınırlar (Pyrce ve ark 2007). Yani virionlar plazma membranından tomurcuklanmazlar. Çok sayıda virion, infekte hücrenin plazma membranına yapışmış halde kalır (Holmes ve ark 1996).

Virus salınımı, virusa ve hücre tipine bağlı olarak, apikal ya da bazolateral membranlardan, ya da her ikisinden olabilir. CoV'la enfekte olmuş epitel hücreleri birkaç gün sonra sitolize olurlar ve virüs etrafa saçılır. Apikal salınım, respiratorik ya da enterik kanal hücrelerine virusun yayılımında etkili iken; bazolateral salınımın, virusun sistemik yayılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Holmes 2001).

Coronavirus replikasyonu yapısal ve fonksiyonel olarak, ökaryotik hücrelerde protein sentezi, modifikasyonu ve sıralaması gibi önemli bir alan olan endoplazmik retikulum (ER) ile ilişkilidir. ER hemostazında çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında karışıklık oluşabilir. ER'a giren proteinlerin katlanma kapasitesi doygunluğa ulaştığında, proteinler ER'de birikir ve ER stresine yol açar. ER stresine yanıt olarak katlanmamış protein cevabın (UPR) sinyal yolları aktive edilir. UPR; reverzibl translasyon zayıflaması, ER proteinlerin katlanma kapasitesinin arttırılması ve ER'a bağlı yıkımın aktivasyonu ile ER stresine uyum sağlanılmasını kolaylaştırır. Bununla birlikte,

ER stresi devam ederse, UPR, aşırı stresli hücrelerin apoptotik hücre ölümünü tetikleyebilir. Yapılan araştırmalar sonucunda CoV'ların ER stresine yol açtığı ve enfekte olmuş hücrelerde UPR'yi indüklediği gösterilmiştir. UPR, otofaji, apoptoz, mitojenle aktive protein (MAP) kinaz yolları, doğuştan gelen bağışıklık ve pro-enflamatuar yanıtı da içeren bir miktar önemli sinyal yolları ile yakından ilişkilidir (Fung ve ark. 2014).

CoV yüksek sıklıkta RNA rekombinasyonu yeteneğine sahiptir (Lai 2007). Yeni tiplerin ortaya çıkışı da muhtemelen, mutasyon ve rekombinasyon yoluyla meydana gelmektedir (White 1994).

RNA replikasyonunda, RNA'ya bağlı RNA polimerazın eksik prof-reading aktivitesi sayesinde çoğu RNA virusu gibi CoV'lar da, RNA polimerazın yüksek hata frekansı ile yüksek sıklıkta mutasyon geçirirler (Lai ve ark 2007). Bu durum her replikasyon döngüsünde her genom başına yaklaşık bir mutasyon gibi yüksek bir mutasyon oranı ile sonuçlanır (Moya ve ark 2004, Drake ve ark 1999). CoV'un genom uzunluğu ve diğer viruslardaki RNA polimerazın hata sıklığı göz önüne alındığında, CoV genomik RNA'sı muhtemelen, her replikasyon döngüsü boyunca, birkaç nokta mutasyonu biriktirir (Holmes ve ark 1996). Yüksek mutasyon hızı virusun özelliklerinde, konakçılarında ve hastalık biçimlerine değişimler olmasına yol açar (Mahony ve ark 2007). Ek olarak, genetik rekombinasyon mekanizması CoV'lar arasında geniş bir genomik çeşitlilik sağlar (Keck ve ark 1987, Chang ve ark 1996, Herrewegh ve ark 1998, Zhang ve ark 2005, Woo ve ark 2009, Smith ve ark 2012).

Çeşitli tipte mutantlar izole edilmiştir. Isıya duyarlı (temperature-sensitive=ts) olan MHV mutantları en az yedi gruba ayrılmıştır ve bunlardan beşi, uygun olmayan ısı koşullarında RNA sentezleyemez. Delesyon mutantları da sık ortaya çıkar. Çoğu doğal MHV suşu, S proteininin çok değişken bir bölgesinde 200'e varan aminoasit delesyonuna sahiptir ve *in vivo* ortamda biyolojik özelliklerinde değişimler gösterir. Delesyon mutasyonunun biyolojik önemini gösteren en ilginç örnek, Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV)'dan PRCoV'un ortaya çıkmasıdır. İki virusun nukleotid sekanslarının karşılaştırılması sonucu PRCoV'un, TGEV'un S proteininde büyük bir delesyona uğramış hali olduğu anlaşılmıştır (Zhang ve ark 2007a).

Coronavirus genomu içerisinde yeralan tekrar eden dizinlerde meydana gelen mutasyonların virusun türler arası bulaşmasında rol oynayabileceği ileri sürülmektedir

(Graham ve ark 2010). Bununla birlikte, viral replikasyonda veya virusun türler arası bulaşmasında N1285K mutasyonunun rolü önemli görülmüştür (Martinez ve ark 2012).

Evrimsel analiz açısından Bidokhti ve ark (2013) 45 yıl boyunca (1965- 2010) elde edilen tam uzunluktaki S geninin Betacoronavirus 1 sekansının geniş bir veri dizisini incelemişlerdir. BCoV'un S geninde yer alan nükleotidlerdeki yer değiştirmenin tahmini oranının ($8.7 \times 10^{-4}/\text{yıl}$), diğer RNA viruslarının standart oranıyla (10^{-3} ile 10^{-5}) kıyaslanabilir nitelikte olduğu görülmüştür (Donker ve ark 2012). Son zamanlarda izole edilen BCoV suşları ile HCoV-OC43 suşlarının spike genlerinin moleküler analizi sonucu yılda 4.1×10^{-4} oranında değişim olduğu tahmin edilmiştir (Vijgen ve ark 2005). Betacoronavirus 1 içerisindeki diğer virus türleri ile birlikte BCoV suşlarının evrimsel analizi sonucu, BCoV'un, domuz ve at CoV'una nazaran, köpek ve insan CoV'una daha yakın bir ilişkisinin olduğu gösterilmiştir. BCoV ve CRCoV (Canine Respiratorik Coronavirus) suşlarının ayrılma zamanının, BCoV ve HCoV-OC43 suşlarından 50 yıl sonra meydana geldiği ve daha yakın bir ortak ataya sahip oldukları tahmin edilmektedir. CRCoV-4182/UK/03'un S proteininin, HCoVOC43/VR759/UK/67'den daha çok BCoV/Mebus/US/72 ve BCoV/LY138/US/65'e genetik benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir (Erles ve ark 2007).

S glikoprotein geninin çok değişken bölgesine yönelik filogenetik çalışmalar, Brezilya'da bulunan BCoV suşlarının iki farklı dala (cluster) ait olduğunu göstermiştir. Ayrıca Brezilya'da tespit edilen bazı BCoV suşlarının S1'i kodlayan gen içerisinde yer alan çok değişken bölgedeki 18 nükleotid dizilimi gösterilmiş, Brezilya'da bulunan BCoV'un evriminde bir parafiletik grup oluşturulmuştur. Benzer dizilimler solunum yolu hastalıklarına sebebiyet veren domuz ve insan CoV suşlarında da bildirilmiştir. Domuz CoV'larının S proteinindeki bu dizilimlerin varlığı enterik ve respiratorik tropizmdeki değişimle ilişkilendirilmiştir (Bok ve ark 2015). Takiuchi ve ark (2008) tarafından S1 kodlama geninin tamamı için Brezilya BCoV suşlarının Mebus suşundan uzak olduğunu (nükleotidler için %97,8 ve aminoasitler için %96,8 benzerlik) ve Amerikan BCoV- ENT suşu 182 NS'ye ve diğer Kanada suşlarına (nükleotidler için %98,7, amino asitler için %98,7 benzerlik) daha fazla benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Bok ve ark 2015).

Çin'de Norveç sıçanlarından Chine Rattus Coronavirus (ChRCoV) HKU24 ismi verilen yeni bir Betacoronavirus A keşfedilmiştir. Yeni ChRCoV'un N-terminal bölgesi

BCoV N-terminal bölgesine, MHV N-terminal bölgesinden daha yüksek bir sekans benzerliği göstermiştir (Lau ve ark 2015).

S proteinini kodlayan dizilimler, 2002-2003 yılları arasında Kore'de kış dizanterisi gözlenen sığırlardan izole edilen dokuz adet BCoV izolatu ve daha önce karakterize edilen BCoV suşları ile karşılaştırılmıştır. Bu dokuz izolatu yakın zamanda izole edilmiş respiratorik BCoV suşu OK ve enterik BCoV suşu LY-138 ile prototip BCoV referans suşu Mebus'tan daha yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. CoV zaman içerisinde evrimleşmekte ve enterik tropizmden ikili respiratorik ve enterik tropizme dönüşebilmektedir. Benzer şekilde Kanno ve ark (2007b)'nın 1999-2000 yılları arasında Japonya'da yaptıkları bir çalışmada, toplanan 55 adet BCoV pozitif numunede S proteinini kodlayan dizilimler referans suşlarla karşılaştırılmıştır. Bu 55 izolatu, prototip enterik BCoV suşlarından (Mebus, Quebec, Kakegawa, F-15 ve LY138) belirgin genetik farklılıkları olduğu anlaşılmıştır. Yeni gözlenen Amerika Birleşik Devletleri (ABD) izolatu'nun S protein kodlama sekanslarının referans suşlarla kıyaslamaya ek olarak, bu suşları bir aşı suşu ile de kıyaslamışlar ve BCoV'a maruz bırakılmış olan sığırlardan alınan konvelesant serum kullanılarak bir karşılaştırma yapmışlardır. Sonuçta, son zamanlarda Japonya ve Kore suşlarına benzer şekilde ABD'de dolaşımda olan BCoV suşlarının, 50-60 yıl önce izole edilen prototip BCoV suşlarından farklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca, prototip Mebus suşu ile daha yeni suşlar arasında da antijenik farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçların BCoV'un farklılaşması ile ilgili ortaya konulan görüşle tutarlılık gösterdiği belirlenmiştir (Fulton ve ark 2013).

Park ve ark (2007) tarafından Güney Kore kış dizanterisi suşu KWD3 ile yapılan bir çalışmada buzağılarda respiratorik hastalık belirtileri gelişmeden diyare gelişmiş, bu çalışmada histopatolojik olarak ise KWD3 suşunun sebep olduğu hafiften şiddetliye kadar değişken intersitisyel pneumoni gözlemlenmiştir. Japonya'da Kanno ve ark (2007) kış dizanterisi suşunun S geni analizi ve Fulton ve ark (2013) ABD kökenli respiratorik ve enterik izolatu'nun analizleri sonucu BCoV suşlarının filogenetik olarak enterik ve respiratorik tropizme sahip olan ikili evrimiyle sonuçlandığını ileri sürmüşlerdir.

Zhang ve ark (2007b)'nin yaptıkları bir çalışmada, enterik ve respiratorik BCoV izolatu'nun S glikoprotein S1 altbiriminin moleküler analizinde, bazı BCoV-R ve BCoV-E genlerinin genomlarında anlamlı sayıda dizilim belirsizliği bulunmuştur. Human Rectal Tümör (HRT-18) doku kültürü pasajlarında respiratorik izolatta 8

nükleotid, enterik izolatta ise 104 nükleotid değişikliğinin olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle dikkat çekici olan, enterik izolattaki nükleotid değişikliğinin büyük bir kısmı, aynı hayvanda respiratorik suşta meydana gelen mutasyonlar ile aynı pozisyonda şekillenmiş olmasıdır. Enterik BCoV izolatları genetik değişikliklere daha yatkındır ve doku kültürü pasajından sonra respiratorik BCoV suşlarına benzemek için mutasyon gösterebilmektedir.

Sekanslama yapılan BCoV izolat sayısının yetersiz olması nedeniyle, BCoV ile BRCoV kökeninin doğru bir şekilde karşılaştırılması zordur. Ayrıca, zamansal değişiklikler ve coğrafi farklılıklar da göz önünde bulundurulmalıdır (Park ve ark 2007).

Bu bulguların aksine Bidokhti ve ark (2013)'nın, tam uzunluktaki S genine dayanılarak 26 adet İsveç ve 7 adet Danimarka CoV suşu ile yaptıkları bir çalışmada, respiratorik ve enterik enfeksiyonlardan elde edilen BCoV suşları arasında bağıntılı bir fark bulunmadığını göstermişlerdir.

1.4. Tarihçe

CoV ile ilgili ilk bilgiler 1937'de tavuklardan IBV, 1940'larda MHV ve domuzlardan TGEV izolasyonlarının gerçekleştirilmesine dayanmaktadır (Beaudette ve ark 1937, Doyle ve ark 1946, Cheever ve ark 1949)

1970 yılından sonra BCoV, buzağı diyarelerinden sorumlu olan bir ajan olarak kabul edilmiştir (Stair ve ark 1972). 1980'li yıllarda ise kış dizanterisi ile ilişkisini bulmak için çalışmalar yapılmıştır (Espinasse ve ark 1982, Takahashi ve ark 1980). Serolojik sonuçlar doğrultusunda bu virusun kış dizanterisinin etkeni olduğu doğrulanmıştır (Emanuelson ve ark 1989). Kış dizanterisinin ilk raporu 1915 yılında ABD'den bildirilmiş ve daha sonra bunu pek çok ülkeden gelen raporlar izlemiştir (Jones ve ark 1931). İsveçte ilk salgın 1946 yılında bildirilmiştir ve 1948 yılının mart ayında kış dizanterisi ülke çapında endemik bir hastalık olarak kabul edilmiştir (Hedström ve ark 1951, Hick ve ark 2012, Brandao ve ark 2006, Khalili ve ark 2006b, Valle ve ark 2006, Hasoksuz ve ark 2005).

Küba'da BCoV'un varlığı ilk olarak 2006 yılında rapor edilmiştir. Daha sonra bu bölgede sporadik salgınlar devam etmiştir (Martinez ve ark 2012). Günümüzde BCoV

enfeksiyonu tüm kıtalarda sığırlarda epidemik olarak gözlemlenmektedir (Bidokhti 2013).

BCoV'a bağıli respiratorik hastalık, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Türkiye, Japonya, Finlandiya, İsveç dahil olmak üzere dünya çapında farklı bölgelerde tespit edilmiştir. Finlandiya'da yapılan bir çalışmada, BCoV ile ilişkili olarak mikoplazma (başlıca Mycoplasma bovis ve Mycoplasma dispar), Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica ve Arcanobacterium pyogenes ile özellikle BPIV-3, BRSV ve Bovine Adenovirus başta olmak üzere diğeri viral patojenlerle birlikte çeşitli mikroorganizmalar teşhis edilmiştir (Decaro ve ark 2008a).

1.5.Epidemiyoloji

BCoV, sığır popülasyonlarında yaygın olarak görülmekte ve et ile süt endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Boileau 2010). Yapılan çalışmalarda birçok ülkede sığır çiftliklerinde BCoV enfeksiyonlarının yüksek prevalansı gösterilmiştir (Siddell ve ark 1983, Addie ve ark 2003). Virus tüm kıtalarda tespit edilmiş olup çoğu sığırın yaşamları boyunca BCoV'a maruz kaldığını gösteren serolojik insidans mevcuttur. Kapil ve ark (2008) yapılan son çalışmalarda, BCoV'un akciğerlerdeki varlığının bovine herpesvirus'tan sonra ikinci sırada yer aldığını ileri sürmüşlerdir. Ölümcül pnemoni vakaları bulunan sığırların nazal sekresyonları ve akciğer dokularından izole edilen coronaviruslar sığır respiratorik coronavirusu olarak sınıflandırılmıştır (Boileau 2010).

BCoV, süt veriminde düşüş, vücut kondüsyon kaybı, genç hayvanların ölümü ile sonuçlanan enfeksiyonlara yol açtığı için sığır endüstrisini olumsuz etkilemektedir. BCoV salgınları mevsimsel olarak çoğunlukla sonbahar ve kış mevsimi boyunca görülmektedir. Ancak, çeşitli iklim bölgelerinde yapılan çalışmalarda BCoV salgınları daha sıcak mevsimlerde de rapor edilmiştir (Siddell ve ark 1983, Addie ve ark 2003). Diyet değişiklikleri, doğum, çok sayıda hayvanın dar bir alanda kapalı bırakılması, laktasyon, soğuk hava, transport, diğeri mikroorganizmaların varlığı ve hava sıcaklığındaki ani değişimler gibi stres faktörleri hastalığın oluşumu için gereken risk faktörleridir. Daha önce salgına yakalanmış olan büyük sürülerde enfeksiyonun yenilenme riski yüksektir. BCoV oldukça bulaşıcıdır ve ziyaretçiler, taşıyıcı hayvanlar, çeşitli araç ve gereçler tarafından sürüye kolaylıkla bulaştırılabilir. Bu nedenle, BCoV

enfeksiyonuna yol açtığı bahsedilen faktörlerin besi ve sütçü sığır sürüleri arasında yüksek seroprevalans ile yaygınlaşmasına neden olmaktadır. Bazı çalışmalarda klinik olarak sağlıklı ineklerden virusun saçılımı gözlenmiştir (Bidokhti 2013).

BCoV, üst solunum yolu mukozal salgılarıyla ve gastrointestinal sistem atıklarıyla bulaştırılır (Bidokhti 2013). Replikasyon virusun nazal sekresyon ve gaita ile saçılımına yol açar (Park ve ark 2007). Bazı araştırmacılar aynı zamanda sürüde BCoV'un düşük titrelerde oküler saçılımını tespit etmişlerdir. Bu durum oküler svapların, BCoV'un tespitinde kullanılabileceğini akla getirmiştir (Saif ve ark 2010).

Yapılan tüm klinik çalışmaların sonuçları BCoV RNA'sının tespitiyle iyi bir korelasyon göstermiştir. BCoV RNA saçılımıyla genel depresyon ve öksürük bulgularının ilişkili olduğu bulunmuştur. Solunum sayısı ve rektal ısıdaki artışın, virusun en fazla saçılımının olduğu dönemden itibaren bir hafta sonraya kadar sürebileceği tespit edilmiştir (Poissy ve ark 2014).

CoV'lar zarlı virus olduğu için çevre şartlarına duyarlıdır. Ancak, ortamda organik materyallerin varlığında üç güne kadar bulaşıcı kalabilmektedirler. CoV'lar *in vitro* olarak kil, kil minarelli ve odun kömürünü son derece iyi bağlayabilirler ve %99 oranında adsorbsiyon gerçekleştirebilirler. (Clark ve ark 1998). Bu bulgular ışığında killi toprakların yüzeylerinde BCoV'u toplayabildiği ve bu otlaklarda otlayan hayvanların BCoV'a maruz kalabilecekleri tahmin edilmektedir. Köpekler de BCoV enfeksiyonunda rol oynayabilirler. Köpek respiratorik coronavirus (CRCoV) genetik olarak BCoV enfeksiyonu ile ilişkilidir ve Kennel Cough vakalarında tespit edilmiştir (Lorusso ve ark 2009).

Ayrıca gnotobiotic buzağılara bulaşabilen BCoV benzeri coronavirusların çeşitli vahşi ruminant popülasyonlarında tespit edildiği bildirilmiştir. Enfeksiyondan altı hafta sonraya kadar lenf düğümleri, ileum ve kolonda BCoV RNA'sı tespit edilmiş ancak bu durumun bulaşma açısından önemli olup olmadığı belirlenmemiştir. Diğer coronavirusların fare ve kedilerde persiste veya kronik enfeksiyon oluşturduğu bilinmektedir (Siddell ve ark 1983, Addie ve ark 2003). MERS-CoV'un insanlarda bir aydan daha uzun süre etrafa saçıldığı gösterilmiştir (Poissy ve ark 2014).

Sığırlardakine benzer CoV'lar, bazı evcil hayvanlar ve vahşi ruminantlar (bufalo, elk, zürafa, alpaka, geyik, antilop, Afrika antilobu) ile son zamanlarda Avrupa bizonu,

çeşitli geyik ve antilop türleri (sitotunga, tahr ve niyala) dahil olmak üzere hayvanat bahçelerinde yer alan çeşitli hayvanlarda izole edilmiştir. Gnotobiotik buzağılara virusun bulaşma yeteneği ve BCoV ile yakın genetik ilişkileri buzağı enfeksiyonları için potansiyel rezervuar olarak tahmin edilmiştir (Bidokhti 2013).

Alıkonulan ve doğal hayattaki vahşi ruminantlarda BCoV ile antijenik olarak birbiriyle yakın ilişkili CoV'ların sirkülasyonda olduğu kabul edilmiştir. Antijenik olarak ilişkili zürafa, sambar, geyik, antilop CoV'ları ile enterik ve respiratorik BCoV suşları arasında yüksek (%99.3- %99.6) amino asit dizilimi benzerliği bu virusların yakın genetik ilişkilerini desteklemektedir. Vahşi ruminantların sığırlara, sığır coronavirus benzeri etkenleri bulaştırabileceği ve bunun tersinin de mümkün olabileceği anlaşılmıştır. Bu tarz türler arası enfeksiyonlar, rekombinantları da içeren genetik olarak daha farklı BCoV suşlarının ortaya çıkmasını sağlayarak enfeksiyonun diğer türlere geçiş olasılığını arttırmaktadır. CoV genomik sekans analizi sonuçları, domuz HEV ve insan respiratorik CoV OC-43'ün muhtemelen atasal BCoV suşlarından evrimleşen CoV'ları temsil ettiğini ortaya koymuştur (Vijgen ve ark 2006, Saif ve ark 2010).

Yakın tarihlerde yapılan çalışmalarda HECov-4408 (üst solunum yolu ve bağırsak) suşunun gnotobiyotik buzağıları enfekte ettiği ve intestinal lezyonlar ile diyareye sebep olduğu doğrulanmıştır. Bu suşun, virulent BCoV- DB2 enterik suşuna karşı çapraz koruyucu immunitiyi indüklediği belirlenmiştir. BCoV'un geniş bir konakçı aralığına sahip olmasının nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak BCoV'un yapısında yer alan hemaglütininin farklı hücre tiplerine bağlanabilme özelliğinin bu konuyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Saif ve ark 2010).

1.6.Patogenez ve Patoloji

BCoV üst solunum yolları epitellerinde ve intestinal enterositlerde replike olabilen pneumoenterik bir virustur (Park ve ark 2007). Solunum yollarında virus replikasyonu gerçekleşen buzağuların, nazal konka, trakea ve akciğer epitellerinde spesifik viral antijen tespit edilmiştir (McNulty ve ark 1984, Saif ve ark 1986). Park ve ark (2007) solunum sisteminde meydana gelen BCoV enfeksiyonlarının ya inhalasyon, ya da BCoV'un yutulmasından sonra intestinal kaynaklı monosit ilişkili viremi ya da cell-free viremi ile gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir.

Araştırmacılar nazal sekresyonda BCoV'un replikasyon ve saçılımının önce respiratorik yol (orofarinks) ile başladığını ve daha sonra büyük miktarlarda virusun yutulması ile birlikte gastrointestinal sisteme yayıldığını düşünmektedirler. Yangısal mediatörler bu organlarda aşırı sekresyona sebep olurlar. Hasar gören epitel hücreler immatur hücrelerle değiştirilir ve enfeksiyon normal olarak kendi kendini sınırlar (Bidokhti 2013). Yapılan bazı araştırmalarda (Reynolds ve ark 1985, Thomas ve ark 2006) ise BCoV'un aynı hayvanda hem nazal yolla hem de dışkı ile eşzamanlı olarak saçıldığı belirtilmiştir.

Yaygın akciğer lezyonları, akciğer volumünün % 50-80'ini içeren nekrotizan lobar pneumoni ve subakut eksudatif lezyonlardan oluşmaktadır. Histolojik akciğer lezyonları fibrinöz, nekrotizan lobar pneumoni ile karakterizedir fakat orta düzeyde ya da şiddetli bronşit ile bronşioliti de kapsayabilmektedir. Araştırmacılar bronş veya akciğer alveolleri, trakea ve nazal sekresyonlardan BCoV izolasyonu veya respiratorik epitelial hücrelerden BCoV antijen varlığını gerçekleştirmişler ve bakteriyel enfeksiyonlar ile birlikte intersitisyel amfizem, bronşiolitis ve alveolitis olgularını gözlemişlerdir (Millet ve ark 2015).

Park ve ark (2007), BCoV'un bir kış dizanterisi suşu ile oral olarak deneysel yolla enfekte edilen buzağılarda immunohistokimyasal (IHC) test sonucu intersitisyel pneumoni ile eş zamanlı nazal konka, trakea ve akciğerlerin dejenere ve nekrotik epitelium hücrelerinin sitoplazmasında BCoV antijeni tespit etmişlerdir. Lenf dokusu (BALT) hiperplazisi ile ilişkili bronşioler lümen ve bronşlarda identifiye edilen çok çekirdekli sinsityal epitelium hücrelerini içeren histolojik değişiklikler ise Hick ve ark (2012) tarafından PCR kullanılarak BCoV teşhisi konan doğal bir salgında tespit edilmiştir.

Oma ve ark (2016) doğal olarak enfekte olmuş 6 adet buzağı ile doğrudan temas halinde bırakılan 4 adet buzağıdan alınan nazal svap, gaita, kan ve doku örneklerini RT-qPCR ile viral RNA yönünden incelemişlerdir. Yapılan çalışmada buzağılarda hafif klinik belirtiler gözlenmiş ve en belirgin bulguların respiratorik sistemde oluştuğu saptanmıştır. Challenge çalışmasından sonraki ilk üç hafta boyunca viral RNA'nın saçılımı gerçekleşmiştir. Genel depresyon ve öksürük BCoV RNA'sının saçılımıyla en iyi korelasyon gösteren klinik belirtiler iken, en fazla solunum hızı ve en yüksek rektal ısı artışının en yoğun viral RNA saçılımından bir hafta gibi uzun bir süre sonra ortaya çıktığı

gözlenmiştir. Virusun nazal saçılımı fekal saçılımından önce meydana gelmiş ve buzağuların dışkılarında aralıklı olarak 35 gün, nazal sekresyonlarında ise 28 gün boyunca viral RNA tespiti yapılabilmektedir. Viral RNA kanda tespit edilememiş ancak challengedan sonraki 42. günde lenfatik dokuda bulunmuştur. Viral RNA, enfeksiyondan üç, dört, beş, altı hafta sonra ötenazi uygulanan buzağulara ait lenf nodüllerinde tespit edilebilmiştir. Viral RNA, enfeksiyondan beş ve altı hafta sonra ötenazi edilen hayvanlardan alınan ileum ve kolonda tespit edilmiş fakat akciğer dokusunda bulunamamıştır. Bu çalışma, BCoV ile enfekte olan buzağuların beş hafta boyunca viral RNA saçtığını ve bağırsak dokuları ile lenf nodüllerinde daha uzun süre viral RNA'yı barındırdığını göstermiştir (Oma ve ark 2016). Viral RNA düşük konsantrasyonlarda kan veya lenf düğümlerine drenaj yapan lenf yoluyla, antijen sunan hücreler veya serbest virus partikülleri olarak transfer edilmelidir (Oma ve ark 2016). Thomas ve ark (2006) diğer çalışmalarla uyumlu olarak virusun fekal saçılımının nazal saçılımından sonra başladığını ileri sürmüşlerdir. Saif ve ark (1986)'nın yaptıkları çalışmada, buzağuların intranasal canlı aşı ile aşılınmaları sonucu, BCoV'un ilk olarak nazal epitelyum hücrelerinde, ikinci olarak ise dışkıda tespit edildiği bildirilmiştir. Buna karşılık oral olarak aşılanan buzağularda BCoV'un fekal tespiti nazal swap örneklerinden önce gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda etkenin giriş yolunun respiratorik veya intestinal enfeksiyon sırasını belirleyebileceği anlaşılmıştır.

Respiratorik yol direkt kontakt ile doğal olarak enfekte olan buzağularda en yaygın görülen enfeksiyon şeklidir. Dolaylı olarak virus yayılımı ise fekal-oral yolla daha yaygın gerçekleşebilir. Tanı amaçlı olarak nazal swap örnekleri BCoV ile ilişkili hastalıklardan şüphelenilen buzağularda virus saptanması için fekal örneklerden daha avantajlı gözükmektedir (Oma ve ark 2016).

1.7. Klinik Bulgular

Bovine coronavirus, yetişkin sığırlarda (kış dizanterisi), yenidoğan buzağularda şiddetli diyare (neonatal buzağı diyaresi) olgularından sorumlu etken olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda, BCoV'un yetişkin sığırlarda ve genellikle 2-6 aylık buzağularda solunum yollarına ait enfeksiyonlarla da ilişkili olduğu bilinmektedir (Saif ve ark 2010, Decaro ve ark 2008a). Deneysel koşullar altında BCoV inoküle edilen kolostrumdan yoksun, yenidoğan buzağularda hırıltılı solunum ve ağız açık solunuma gibi solunum yolu belirtileri gelişmiştir (Kapil ve ark 1991). Boileau ve ark (2010) ise doğal

koşullar altında BRCoV'un neden olduğu pneumoni olgularının 6 ila 9 aylık buzağılarda görülebiliğini, etkilenen hayvanlarda ateş, serözden mukopurulente kadar değişebilen nazal akıntı, öksürük, taşipne ve dispne gelişebildiğini vurgulamışlardır.

BCoV'un yukarıda belirtilen klinik bulgulara ilaveten hem yetişkin sığırlarda hem de buzağılarda pneumoni ve diyareyi içeren kombine enfeksiyonlara da neden olduğu bildirilmektedir (Carman ve ark 1992, Storz 1998). Bovine respiratorik sendrom (BRD) sıklıkla, stres faktörlerinin artması sebebiyle seyahat eden sığırlarda transport esnasında veya sonrasında gözlenmiştir. BRD'nin etiyolojik ajanı olarak aynı zamanda respiratorik distresten de sorumludur. BRD; BRSV, BoHV-1, BPIV-3, BVDV gibi birçok virusun neden olduğu kompleks multifaktoriyel bir hastalıktır. Eşzamanlı bakteri ve mikoplazmal enfeksiyonlar viral hastalıkların seyrini daha da şiddetlendirerek, morbidite ve mortalite oranlarını arttırabilir (Decaro ve ark 2008a, Saif ve ark 2010).

Kış dizanterisi nedeni olarak BCoV (BCoV-WD), sığırlarda epizootik bir şekilde ortaya çıkan, sporadik, akut, bulaşıcı bir enterokolite yol açmaktadır. BCoV- WD'den etkilenen hayvanlarda trakeal mukozada hiperemi ve lokalize pneumoni odakları gözlemlenmiştir (MacPherson ve ark 1957). Orta şiddette solunum yolu enfeksiyonu belirtileri bu tür hayvanlarda diyareden önce veya diyare ile eş zamanlı olarak gelişebilmektedir. Enfeksiyondan etkilenen laktasyon dönemindeki ineklerin süt veriminde önemli derecede bir düşüş gerçekleşmektedir (Guard ve ark 2009). BCoV enfeksiyonunun diğer negatif etkileri vücut kondüsyon kaybı ve genç hayvanlarda meydana gelen mortalitedir (Bidokhti ve ark 2013).

Yapılan araştırmalar sonucunda, BCoV'un enzootik pneumonide birincil ve önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. BCoV'un İrlanda'da respiratorik yola ait belirtiler gösteren buzağılardan alınan nazal svapların %23'ünden identifiye edildiği belirtilmiş ve respiratorik enfeksiyonlarda en yaygın görülen viral patojen olduğu vurgulanmıştır. BCoV, İtalya'da solunum yollarına ait enfeksiyon gözlenen 2-3 aylık buzağuların yaklaşık olarak %75'inde tespit edilmiştir (MacLachlan ve ark 2017)

BCoV enfeksiyonunun sebep olduğu respiratorik enfeksiyona bağlı salgınlar 1-2 hafta sürebilir. Bir sürüdeki tüm duyarlı hayvanlara kısa sürede yayılabilir (Bidokhti 2013).

1.8.İmmunite

Sığırlarda hem lokal hem de sistemik enfeksiyonlarda, yüksek düzeyde immunglobulin M (IgM) antikor cevabı ile uzun süreli immunglobulin A (IgA) antikor cevabının geliştiği gözlemlenmiştir. IgM antikor cevabının, serum ve sütte uzun süreli, nazal sekresyonlarda ise daha kısa süreli olarak oluştuğu tespit edilmiştir. BCoV spesifik IgM seviyesi enfeksiyonun 2-7. günlerinden itibaren artmakta ve seronegatif hayvanların deneysel enfeksiyonundan sonra izotip capture ELISA ile 3-6 hafta boyunca tespit edilebilir düzeylerde kalmaktadır (Tråvén ve ark 2001). Sığırların BCoV enfeksiyonuna yakalanmaları açısından immülojik risklerin başında düşük immunglobulin G (IgG) titreleri gelmektedir (Jee ve ark 2013). BCoV'ye spesifik IgG, serum ve sütte enfeksiyondan sonra 9-11. günden itibaren saptanabilmektedir (Tråvén ve ark 2001). IgG reeneksiyon olmaksızın enfeksiyondan sonra en az bir yıl saptanabilir seviyede kalmaktadır (Alenius ve ark 1991). İmmunolojik açıdan olumsuz unsurlardan bir tanesi sütçü ineklerde BCoV'e karşı gelişen IgA titrelerinin düşük seviyede gerçekleşmesidir (Jee ve ark 2013). IgA, enfeksiyon sonrası 7-9. günden itibaren tespit edilmeye başlamakta ve birkaç ay boyunca saptanabilir düzeyde kalmaktadır (Alenius ve ark 1991).

Sığırların bağışıklık sistemi tarafından ilk olarak virusa ait HE ve S glikoproteinleri tanınmakta ve ilk enfeksiyonun geç aşaması ve reeneksiyonun erken aşaması boyunca N proteini antikor cevabını indüklemektedir. M glikoproteini, ana yapısal viral proteinler içerisinde en az immunojenik olanıdır (Lin ve ark 2000).

Buzağılar immunolojik olarak hassas ve agammaglobulinemik olarak doğarlar, çünkü sığır plasentası doğumdan önce maternal antikorların fetüse transferine izin vermez. Bu nedenle, yeni doğan bir buzağının doğumdan sonra kendi immun sistemi olgunlaşmaya kadar hastalıklardan korunmak için mümkün olan en kısa sürede kolostrum yoluyla maternal antikorları alması gerekir. Bu sebeple coronavirus enfeksiyonları yeni doğanlarda daha şiddetli seyretmektedir (Windeyer ve ark 2014). Antikorlar kolostrum yoluyla yeni doğan yavrulara geçirildiğinde yaklaşık olarak 5-6 aylık olana kadar serumda saptanabilmektedir. Pasif olarak derive edilmiş antikorlar buzağılarda enfeksiyona karşı aktif antikor cevabını geciktirebilmekte veya azaltabilmektedir (Heckert ve ark 1991).

Enterik ve respiratorik coronavirus enfeksiyonlarına karşı korunmanın en etkili yolu viral replikasyonun primer yerleşim yerinde pasif veya aktif immunitenin varlığıdır. Serum antikor varlığının ise genellikle enterik CoV enfeksiyonlarından korunmada etkin bir rol oynamadığı düşünülmektedir. Bu görüşe uygun olarak domuzlarda PRCV ve buzağılarda BCoV'ye karşı düşük titredeki maternal antikorların, respiratorik yollardaki viral replikasyonu engellemediği tespit edilmiştir (Saif, 1993).

Doğal olarak kazanılmış bağışıklığın süresi ve etkinliği tam olarak bilinmemektedir (Saif 2010).

1.9. Aşı Çalışmaları

Solunum yolu BCoV enfeksiyonlarının patogenezinin ve bu organlara virusun nasıl yayıldığına anlaşılması, aşı stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacak en önemli unsurlardır. Bununla beraber BCoV'un hem respiratorik hem de enterik epitelyal hücreleri etkilediği göz önüne alınırsa, optimum koruma sağlamak için her iki enfeksiyona karşı etkili aşılarda geliştirilmesi temel esastır. Ancak mukozal patojenlere karşı geliştirilen aşılarda, doğal veya deneysel respiratorik BCoV enfeksiyonlarında gözlemlendiği gibi (Heckert ve ark 1990, Cho ve ark 2001a) bağışıklığı uyarmada veya respiratorik reenfeksiyonları önlemede başarısız olduğu gözlenmektedir (Saif 2010).

Buzağılar yeni ahırlarına gönderilmeden, transport öncesinde aşılanmalıdır. Ancak, ekonomik etkisine rağmen besi sığırlarının BRDC'si için veya genç buzağılarda BCoV ile ilişkili pnemonilerini önlemek için respiratorik BCoV aşısı henüz geliştirilememiştir. Sığırlarda BCoV enfeksiyonlarının epidemiyolojik çalışmalarından elde edilen veriler sınırlıdır. Ancak BCoV'a ait serum antikor titrelerinin respiratorik koruma için bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Yapılan birden fazla çalışmada doğal olarak enfekte olmuş buzağılarda veya sığırlarda transport sonrasında serum antikor titrelerindeki BCoV antikor izotipi (IgG1, IgG2, IgA), nötralize edici ve hemaglutinin inhibe edici (HI) antikor titreleri ve miktarı respiratorik hastalık ile pnemoniye karşı korunma veya BCoV'un respiratorik saçılımı ile korelasyon göstermiştir. Ancak serum antikorlarının respiratorik hastalıklara karşı korunmayla ilişkisinin olup olmadığı veya önceden BCoV'a enterik veya respiratorik yolla maruz kalındığını yansıtmadığı henüz açıklanamamıştır ve bu konuda ek çalışmaların yapılması gerekmektedir. Gerçekten serumda bulunan BCoV nötralizan antikorlarının, respiratorik BCoV

enfeksiyonuna karşı oluşan bağışıklıkta rol oynayabiliyorsa, mevcut BCoV antikorlarının seviyelerini yükseltmek için parenteral aşı uygulamalarının koruyuculuğunun artırabileceği düşünülmüştür (Saif 2010).

Yapılan çalışmalar sonucunda BCoV buzağı diyare suşunun intranasal uygulamasının sahada bir respiratorik BCoV suşuna maruz kalmaya karşı çapraz koruma sağladığı gösterilmiştir. Buzağı diyaresi, kış dizanterisi veya respiratorik CoV suşları ile gnotobiyotik veya kolostrumdan mahrum kalmış buzağılara yapılan inokülasyonlar, nazal veya fekal olarak CoV saçılımına yol açmıştır. Sonuç olarak farklı klinik sendromlardan olanlar da dahil olmak üzere farklı BCoV saha suşlarına karşı koruyucu aşilar geliştirmenin bir amacı vardır. WD, CD ve respiratorik izolatları temsil eden suşların bir karışımının aşıya dahil edilmesi, respiratorik hastalıkları içeren her bir klinik sendromla ilişkili BCoV enfeksiyonlarına karşı etkili geniş spektrumlu tek bir BCoV aşısı geliştirilmesinin hastalık ile mücadelede ideal bir strateji olabileceği ileri sürülmektedir (Saif 2010).

Respiratorik suşun (438/06/TN) kademeli atenüasyonu ile BCoV enfeksiyonunun solunum yolu formuna karşı canlı modifiye bir aşı geliştirilmiştir. Dört adet kolostrumdan yoksun bırakılan yeni doğan buzağıya oro-nazal olarak 10 doz aşı uygulanması sonucu bu hayvanların sağlıklı kalması aşının güvenilirliğini ortaya koymuştur. Aşının immunojenitesi, otuz adet iki üç aylık BCoV açısından antikor negatif olan buzağılara bir aşı dozunun intramuskuler enjeksiyonuyla belirlenmiştir. Aşılardan otuz gün sonra tüm aşılanan buzağılar BCoV'e karşı yüksek antikor titreleri sergilemişlerdir. Vahşi tip ve hücreye adapte 438/06-TN suşunun S geninin sekans analizinde 9 tanesi sinonim olmamak üzere 10 nükleotid değişiklik tespit edilmiştir. Aşı değerlendirmesi amacıyla toplam 42 hayvan kullanılmıştır. Bunların 6 tanesi kolostrumdan yoksun bırakılmış bir günlük yeni doğan buzağı, geri kalan 36 tanesi ise BCoV antikor negatif 2-3 aylık buzağılardan oluşmaktadır. Tüm buzağılar başlangıçta dışkıda BCoV-RNA açısından Real time RT-PCR ile, serumda BCoV antikorları açısından ELISA ve hemagglütinasyon inhibisyon testi ile negatif olarak test edilmiştir. Testin güvenilirliği amacıyla kolostrumdan mahrum bırakılmış bir günlük dört adet buzağıya 10 ml virus 438/06-TN-50, 2 adet yeni doğan buzağıya ise 10 ml fizyolojik tuzlu su solüsyonu oro-nazal olarak uygulanmıştır. İmmünojenite testi için yaşları 2- 3 ay arası olan 30 adet BCoV antikor negatif buzağıya 1 ml aşı boynun yan tarafından intramuskuler olarak inokule edilmiştir.

Kalan altı hayvana ise 1ml fizyolojik tuzlu su solüsyonunun intramuskuler inokulasyonu ile kontrol grubu oluşturulmuştur. Serum örnekleri ise aşılardan 30 gün sonra toplanmıştır. Tüm kolostrumdan mahrum bırakılmış buzağular gözlem periyodu boyunca sağlıklı kalmışlardır. İnokülasyon yapılmış yeni doğan buzağular BCoV-RNA'sını dışkı ve nazal sekresyonlarıyla saçmışlardır. BCoV-RNA'sı nazal svaplarda Real Time RT-PCR ile inokülasyondan 2 ila 16 gün sonra 15 gün boyunca tespit edilmiştir. Dışkı ile BCoV'un saçılımı ise inokülasyondan 5 ila 13. günden itibaren 9 gün boyunca devam ettiği gözlemlenmiştir. Tüm yenidoğan buzağularda inokülasyondan 30 gün sonra BCoV antikorları tespit edilebilir düzeyde bulunmuştur. İnokülasyon yapılmış olan tüm buzağularda, inokülasyondan 30 gün sonra ELISA, hemaglutinasyon inhibisyon (HI) ve virus nötralizasyon testleri (VNT) ile BCoV'a karşı yüksek antikor titreleri gözlenmiştir (Decaro ve ark 2009).

CoV'lar için aşı geliştirmede bazı zorluklar bulunmaktadır. Birinci neden mukozal enfeksiyonlarda, doğal olarak oluşan enfeksiyon bir sonraki enfeksiyonu engellemeyebilir, bu yüzden aşılarda orijinal virustan daha iyi bağışıklık oluşturmalı veya en azından ikincil bir enfeksiyon esnasında maruz kalınan hastalığın şiddetini azaltmalıdır. İkincisi ise, virusların rekombinasyon eğilimi, aşırı kullanışsız hale getirmekte ve potansiyel olarak vahşi yaşamda evrimini ve çeşitliliğini artırarak problemlere yol açmaktadır. Nsp1 veya E proteinlerinde büyük delesyonlar yaparak, genomun 3' ucunun yeniden düzenlenmesi ile transcriptional regulatory sequences (TRS) dizilerinin modifiyesi veya anormal derecede yüksek mutasyon oranlarına sahip mutant viruslar kullanılarak virus attenüe edilebilir (Fehr ve Stanley 2015)

Adjuvan ile parenteral yolla uygulanan inaktif aşılarda, BCoV, TGEV, CCV ve IBV'a karşı aktif veya pasif bağışıklığı indüklemek için kullanılabileceği bildirilmiştir. Fakat bu aşılarda sahadaki başarılarının bir takım potansiyel problemlerle tehlikeye girebileceği düşünülmektedir. Canlı virus aşılarda ise aktif bağışıklığı etkili bir şekilde uyandırabilmesi ve mukozal bağışıklığın indüklenmesi için optimal bir dereceye kadar virusun replike edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Enterik CoV enfeksiyonları, respiratorik mukozal yüzeylerde koruyucu olan bağışıklığı indükler. Ancak, lokalize respiratorik enfeksiyonlara neden olan CoV enfeksiyonları söz konusu olduğunda bu durum gerçekleşmeyebilir. Genellikle parenteral uygulanan inaktif aşılarda için, sıklıkla IgA antikorlarının yüksek titrede oluşumunda sorunlarla karşılaşılabilir ve bağışıklık süreleri

kısa olabilir. Öte yandan, inaktif aşular, CoVlar ile doğal enfeksiyondan iyileşen hayvanlarda antikor titrelerinin arttırılmasında etkili olabilir (Saif 1993).

Rekombinant DNA tekniklerinin CoV'lara uygulanması, çeşitli genlerin komplementer DNA (cDNA) klonlanması ile sonuçlanmıştır. Çoğu çalışma S glikoproteini üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü nötralize edici antikorları indükler, ancak diğer yapısal proteinler de immunitede rol oynayabilir. Genel olarak, parenteral veya oral yoldan çözünebilir proteinlerin uygulanması mukozal immun yanıtı zayıf bir şekilde uyarır veya bu proteinlere karşı tolerans şekillenir. Bu nedenle subunit CoV aşularının oral yolla uygulanması sonucu oluşacak mukozal bağışıklığı stimüle etmek için yeni mukozal adjuvanlar ve hedef bölgelere yönlendirilmeleri için farklı sistemler geliştirilmelidir. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılan bir başka strateji, canlı aşuların geliştirilmesine yönelik çalışmaları içermektedir. Viral genoma ait belirli olmayan kısımlarının silinmesi (delesyon mutagenesi) viral patojenleri attenüe etmek için kullanılmıştır (Saif 1993).

Solunum yolu klinik belirtileri gösteren sığırlardan BCoV izolasyonlarının son yıllarda gittikçe artıyor olması respiratorik BCoV suşları ile hazırlanmış monovalent aşulara olan ihtiyacı da arttırmaktadır. Hazırlanacak olan aday aşının muhtemelen canlı modifiye bir aşı olması gerektiği ileri sürülmüştür. Attüenüe aşuların aynı zamanda aktif antikor ve hücre aracılıklı bağışıklığa sebep olabileceği de tahmin edilmektedir (Decaro ve ark 2009).

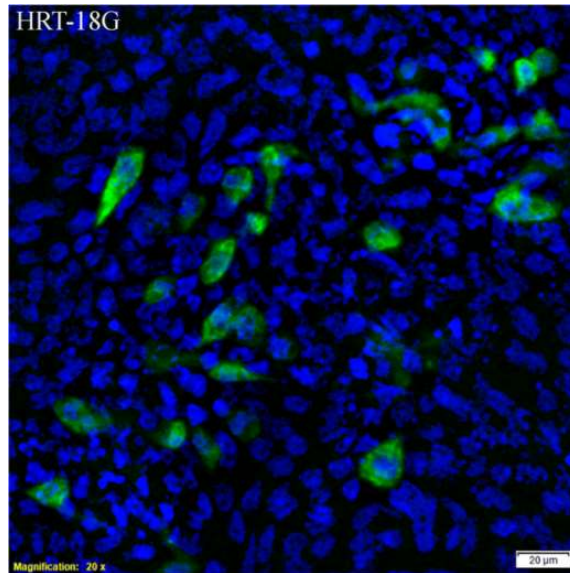
1.10. Teşhis

Saha örneklerinin BCoV yönünden hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edilmesi, bu enfeksiyonun kontrolünde oldukça önemlidir. Moleküler tekniklerin ilerlemesi ile BCoV enfeksiyonunun hızlı ve duyarlı teşhisi, hastalığın kontrolünde alınacak aşılama ve karantina gibi tedbirlerin hızlı bir şekilde uygulanmasında oldukça değerlidir. Böylece salgınların neden olduğu ciddi ekonomik kayıpların önüne geçilebileceği düşünülmektedir (Timurkan ve ark 2015).

1.10.1.Direkt teşhis

BCoV'un izole edilmesi zordur, bu sebeple virusun doku kültüründe izolasyonu teşhis amacıyla nadiren kullanılmaktadır. Ancak, BCoV trakeal ve bağırsak organ kültürlerinde (Clark ve ark 1993), human rectal tümör-18 (HRT-18), VERO (African green monkey kidney), BEK-1 (bovine embriyonic kidney), D2BFS (bovine fetal spleen), BEL (bovine embriyonic lung), Madin Darby bovine kidney (MDBK) ve Madin Darby canine kidney 1 (MDCK1) hücre kültürlerinde çoğaltılabilmektedir (Benfield ve ark 1990, Tsunemitsu ve ark 1995). HRT-18 esas olarak tripsin varlığında virusun primer izolasyonunda kullanılabilinecek en duyarlı hücre hattıdır (Benfield ve ark 1990, Tsunemitsu ve ark 1991). Hamster akciğer-1 (HmLu-1) monolayer hücre kültürleri BCoV'a yüksek permissivite göstermektedir (Jerez ve ark 2005).

Hansa ve ark (2013) BCoV ile VERO hücre hattında yaptıkları bir çalışmada virusun endoplazmik retikulumda replike olduğunu ve virus kümelerinin intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği oluşturduğunu belirlemişlerdir. Enfekte hücreler H&E boyama yöntemi ile boyanmış ve enfekte hücrelerde sinsityal ve eozinofilik intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri gözlenmiştir. BCoV'un VERO hücresine adaptasyonu ise sitoplazmada yaygın yeşil floresans ve spesifik granüler görünüm ile floresan antikor testinde (FAT) teyit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Nazal svaptan elde edilen BCoV ile enfekte HRT-18G hücreleri. Hücreler fluorescein isothiocyanate ve 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) nükleer kontrast boyası ile etiketlenmiş olan anti coronavirus antikorları ile boyanmıştır (Oma ve ark 2016).

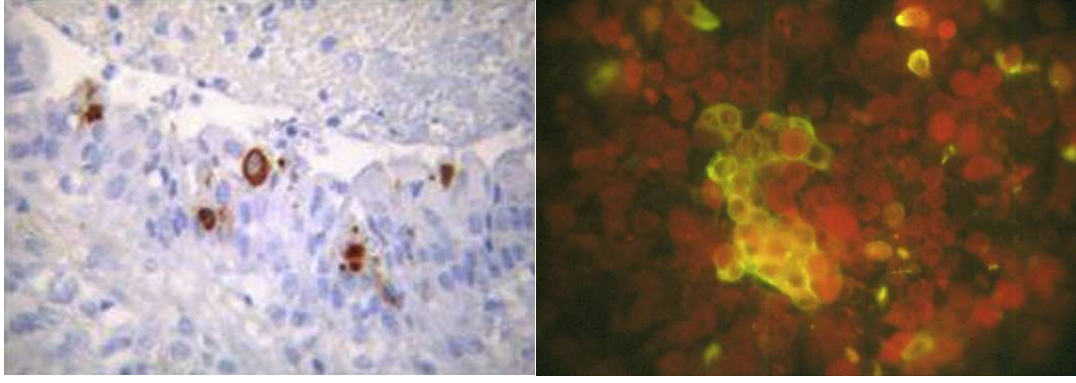
FAT ile antijenik seviyede virusun tespiti ve doğrulanması için genomik temelli metodların kullanılması yeterli değildir (Hansa ve ark 2013).

Virolojik çalışmalarda teşhis amaçlı olarak bazı genler hedef alınarak PCR yapılabilir. Bu genler genellikle mutasyonel açıdan korunaklı gen bölgeleridir. Coronaviruslar açısından Center for Disease Control and Prevention (CDC) kuruluşunun belirttiği gibi virusun teşhisi açısından N geni hem izleme hem de doğrulama amaçlı olarak PCR çalışmalarında kullanılabilir (Timurkan ve ark 2015).

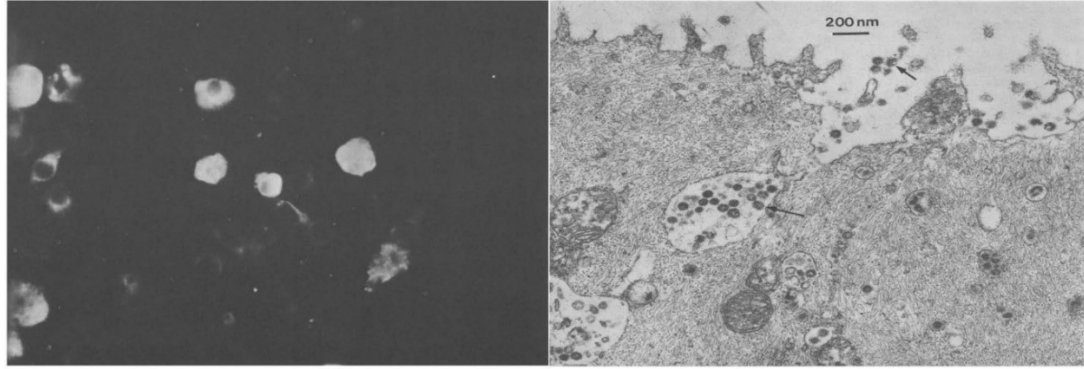
RT-PCR testi, az miktarlardaki nükleik asidi saptamak için faydalı ve enfeksiyöz hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılan bir teşhis yöntemidir (Khalili ve ark 2006 a).

Real Time RT-PCR donanımlı bir laboratuvar gerektirdiği ve nispeten pahalı olduğu için yeni arayışlara girilmiş ve BCoV tespiti için reverz transkripsiyon rekombinaz polimeraz amplifikasyon (RT-RPA) geliştirilmiştir (Amer ve ark 2013). RPA izotermal bir DNA amplifikasyonudur (Piepenburg ve ark 2006). PCR'ın aksine, amplifikasyon sabit bir sıcaklıkta kullanılan enzimlerin ve proteinlerin spesifik bir kombinasyonuna bağlıdır (Euler ve ark 2012 a,b). Amer ve ark (2013) tarafından BCoV RT-RPA hızlı (10-20 dakika) analitik duyarlılığa sahip olduğu belirtilmiştir. Sığırlarda gastrointestinal ve/veya respiratorik enfeksiyonlara neden olan diğer viruslarla (bovine rotavirus, bovine viral diyare virus, enfeksiyöz bovine rhinotrakeitis virus, bovine parainfluenza tip 3, bovine respiratory sinsityal virus) çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Klinik örnekler üzerinde testin performansı, 16 fekal numune ve 14 nazal svap ile test edilerek RT-PCR ile karşılaştırılmış ve doğrulanmıştır. Her iki test de kıyaslanabilir sonuçlar sağlanmıştır. RT-RPA testi, Real Time RT-PCR'den önemli ölçüde hızlı bulunmuştur. BCoV RT-RPA testi, BCoV teşhisinde kullanılan ortak ölçümlere uygun, doğru, hassas ve hızlı bir alternatif oluşturmaktadır (Amer ve ark 2013).

Nazal türbinatlar ve nazal bezler ile gerçekleştirilen immunohistokimyasal (IHC) ve immünofloresan testlerinde BCoV için güçlü pozitif cevaplar elde edildiği görülmüştür (Dar ve ark 1998) (Şekil 5, Şekil 6).



Şekil 5. Alt solunum yolu enfeksiyonu gözlenen yetişkin bir ineğin akciğerlerinde bulunan makrofajlardaki BCoV antijenlerinin immunohistokimyasal yöntemle görünümü (Boileau ve ark 2010). Anti- BCoV floresein izotiyosiyanat konjugat kullanılarak gerçekleştirilen direkt floresan antikor testinde BCoV pozitif nazal hücreler. Svaplar BCoV ile deneysel olarak enfekte olmuş pneumoenterik bir buzağıdan toplanmıştır (Boileau ve ark 2010).



Şekil 6. Coronavirus ile enfekte edilmiş trakeal organ kültüründen alınan hücrenin elektron mikroskop görüntüsü. Stoplazmik vakuollerde ve plazma membranının dışında Coronavirus benzeri vakuoller gözlemlenmektedir (McNulty ve ark 1984).

BCoV'un teşhisi için monoklonal Z3A5 antikorları ile hazırlanmış antijen-capture ELISA kullanılabilir. Bir başka yararlı diagnostik reaktif ise, virusun en baskın proteini olan, BCoV nükleokapsidine bağlanan 8F2 monoklonal antikorudur (Boileau ve ark 2010).

1.10.2.İndirekt teşhis

Serum örneklerinde BCoV'e karşı gelişen antikorların tespiti için kullanılan birçok immunolojik yöntem mevcuttur. VNT ve HI BCoV'e karşı gelişen antikor miktarı ve suşlar arası antijenik varyasyonun karşılaştırılması için kullanılmıştır (Fulton ve ark 2013, Decaro ve ark 2008). Benzer şekilde ELISA serolojik çalışmalarda sığır populasyonlarının toplu olarak izlenmesi için kullanılmaktadır. BCoV'a karşı gelişen

antikorlar serum ve süt numunelerinden saptanabilmektedir (Ohlson ve ark 2013, Nslund ve ark 2000, Alenius ve ark 1991).

Serolojik araştırmalar, Dünya çapındaki sığır populasyonlarının yaklaşık olarak %90'ının BCoV'a karşı antikorlara sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, vahşi ruminantlar, köpekler ve atlar arasında benzer BCoV suşlarının tespiti, buzağılara deneysel türler arası bulaşmanın kanıtları ile birlikte bu türlerin CoV'leri sığırlara bulaştırmasını veya tam tersi yönde bir bulaşmayı açıklamaktadır (Bok ve ark 2015).

1.11.Koruma ve Kontrol

Virusun yol açtığı negatif etkileri azaltmanın tek yolu sürüler arasında virus bulaşmasını engellemektir. Sürüler arasında bulaşma muhtemelen direkt olarak canlı hayvan transferi yoluyla olmakta veya indirekt olarak kontamine personel veya ekipman ile gerçekleşmektedir. Sürüler arasında virusun yayılımını önleyici tedbirler, viral saçılım, hassas hayvanlara virusun bulaşma potansiyeli ve koruyucu immunitenin rolü hakkındaki bilgilere dayandırılmalıdır (Decaro ve ark 2008b, Fulton ve ark 2011, Mee ve ark 2012).

BCoV respiratorik hastalığı için kontrol önlemleri sınırlıdır. BCoV için mevcut olan aşılar neonatal enterik hastalığın kontrolü için lisanslıdır (Saif 2010, Cho ve ark 2001b). Neonatal enterik hastalığın kontrolü için lisanslı  inaktif aşi vardır ve bunlar gebe inek veya düvelere gebelikleri sırasında humoral aktiviteyi uyarmak için kullanılmaktadır (Fulton ve ark 2013).

ABD'den BCoV içeren MLV aşısı kullanımını rapor edilmiş (Plummer ve ark 2004) ancak korunma yöntemi olarak immunitenin ilişkisi tam olarak ortaya konulamamıştır. Optimum immunitenin sağlamak için, aşi antijenlerinin dolaşımdaki virusa olabildiğince benzer olması gerekmektedir. BCoV'u kontrol amacıyla immunojen olarak kullanılan virus veya virusların sahada dolaşımda olan BCoV ile antijenik ve genetik olarak benzer olması önemlidir (Fulton ve ark 2013). Günümüzde ise mevcut aşılar, hali hazırda dolaşan BCoV suşlarından genetik ve antijenik olarak farklı eski enterik BCoV suşlarına dayanmaktadır (Fulton ve ark 2013). Bu nedenle, pozitif seçilim alanlarındaki dizi değişikliklerinin sürekli izlenmesi, gelecekte hakim olan salgın suşların tanımlanması için potansiyel olarak yararlı veriler sağlayabilir (Bidokhti ve ark 2013).

Ülkemizde de özellikle enterik CoV'larla mücadelede gebe ineklere gebeliğin son döneminde Corona (Mebus suşu), Rota ve E. coli kombine aşuları uygulanmaktadır. Ancak ülkemizde de direkt respiratorik CoV'a yönelik aşı bulunmamaktadır.

1.12.Tedavi

BCoV enfeksiyonu için spesifik bir antiviral tedavi bulunmamaktadır.

1.13.Zoonotik Durum

Yapılan sekans analizleri, BCoV'un insanlara bulaşma potansiyelinin mevcut olabileceğini göstermiştir ve araştırmacılar daha önce diyareli bir çocukta sığır benzeri CoV izolasyonunun gerçekleştiğini teyit etmişlerdir (Vijgen ve ark 2005, Martinez ve ark 2012).

BCoV'un halk sağlığı üzerine etkisi, ilk olarak coronaviral şiddetli akut respiratorik sendrom (SARS-CoV) ve akut diyareli bir çocuktan BCoV benzeri insan enterik CoV'un 4408/US/94 (HECV-4408/US/94) izole edilmesiyle ortaya çıkmıştır (Zhang ve ark 1994). HCoV-OC43 izolatlarının moleküler evrimsel analizi, BCoV'un diğer CoV türleri ile karşılaştırıldığında genetik olarak en yakın benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir. BCoV ile HCoV-OC43 arasında %96 oranında nükleotid benzerliği olduğu ortaya konulmuştur (Vijgen ve ark 2005). HCoV-OC43 ile BCoV nükleotidleri arasındaki ayırımın 19. yüzyılın sonlarında olduğu tahmin edilmektedir (Kın ve ark 2016). Son zamanlarda yeni bir CoV olan HCoV-EMC'nin, SARS-CoV'a benzer klinik belirtiler ile ölümlere neden olduğu ve Ortadoğu'da sirkülasyonda olduğu tespit edilmiştir. SARS-CoV 2002-2003 yılları arasında ölüm oranı yaklaşık olarak %10 ile 8000'den fazla vakada tespit edilmiştir (Peiris ve ark 2004). MERS-CoV ise 2012 yılında Orta Doğu'da ortaya çıkmıştır (Zaki ve ark 2012). Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından bildirilen 502 ölümcül vakayı içeren 1413 adet MERS-CoV vakası laboratuarda teyit edilmiştir (Institut National de Veille Sanitaire-INVS) 2015). Hem SARS-CoV hem de MERS-CoV hayvan barınakları ile yakın temasta olan insanlar için zoonotik bir potansiyele sahiptir (Kın ve ark 2016). Bu tür veteriner ve halk sağlığını ilgilendiren endişeler, BCoV suşlarının evrimi ve genetik çeşitliliği ve diğer betacoronaviruslar ile ilişkisine dair çalışmaları teşvik etmektedir (Bidokhti 2013). BCoV ile yakın ilişkili olan 1967 yılında izole edilen HCoV OC43 ile son yapılan çalışmalarda enfeksiyonun sığırlardan insanlara zoonotik bir

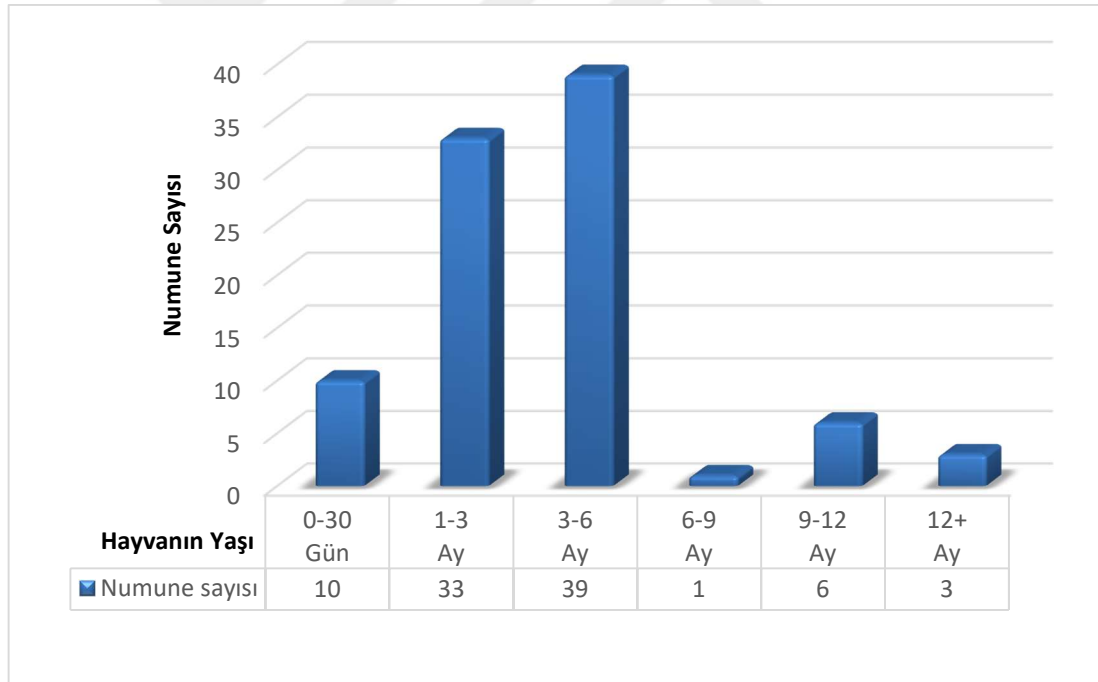
bulaşmadan kaynaklandığı ortaya konulmuştur (McIntosh ve ark 1967, Castells ve ark 2017).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

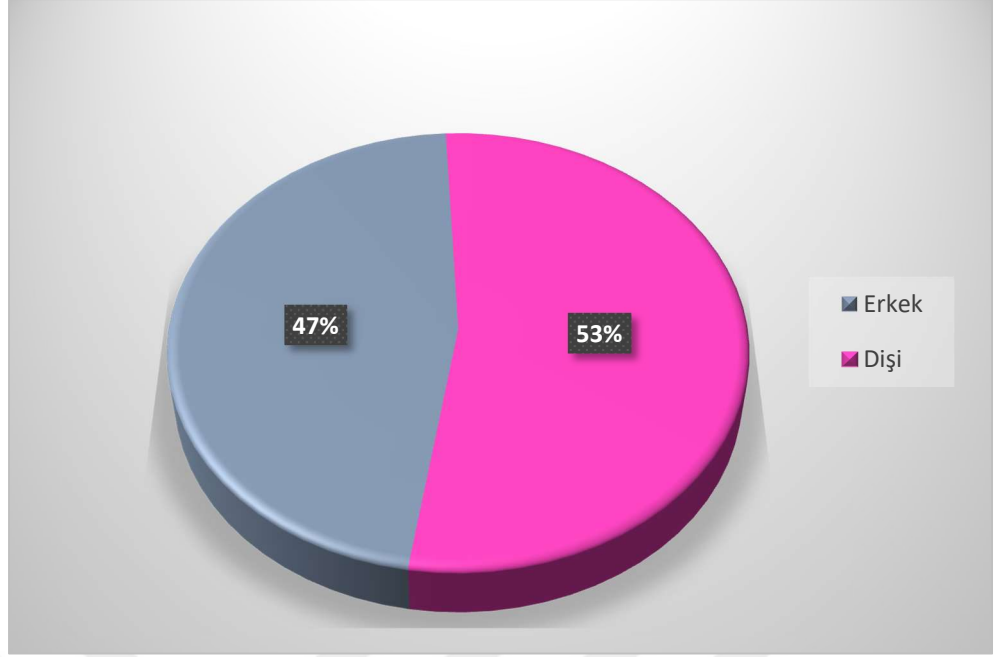
2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar

Bu araştırmada kullanılan nazal svap ve kan serumu numuneleri, Konya ve Isparta illeri ile çevrelerindeki büyükbaş çiftliklerinde bulunan ve solunum sistemi enfeksiyonu belirtileri gösteren 92 adet sığırdan temin edilmiştir. Örneklenen toplam 92 hayvan, 0-2 yaş arası farklı cinsiyetteki sığırlardan oluşmuştur. Örneklemeler Ocak 2017 ile Şubat 2018 tarihleri arasında yapılmış olup numune alınan hayvanların yaş aralıkları ve cinsiyetlere göre dağılımları Şekil 2.1 ve Şekil 2.2’de sunulmuştur. Solunum sistemi enfeksiyonu gözlenen sürülerden istatistiki olarak daha sağlıklı sonuçlar elde edebilmek amacıyla aynı sürüde yer alan en fazla 2 adet hayvandan numune alınmasına dikkat edilmiştir. Araştırmada hayvanlara yapılan uygulamalar için S.Ü. Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu’ndan 26.08.2016 tarih ve 2016/76 numaralı onay alınmıştır.



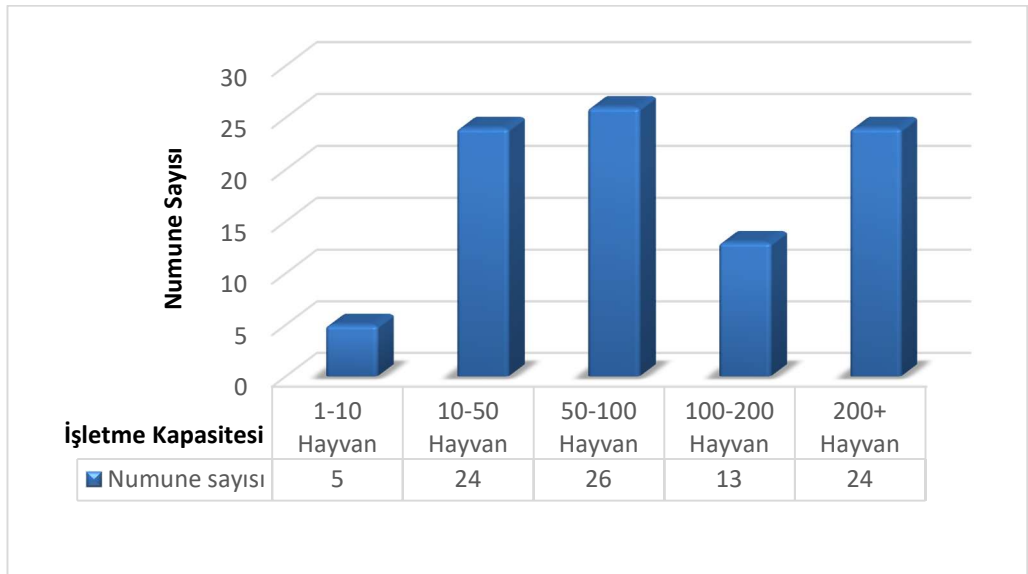
Şekil 2.1. Örneklenen hayvanların yaş aralıkları.

Çalışmada kullanılan hayvanlar 0-30 günlük, 1-3 aylık, 3-6 aylık, 6-9 aylık, 9-12 aylık ve 12 ay üzeri olarak yaş gruplarına ayrılmıştır. Toplanan numune sayıları yaşlara göre sırasıyla 10, 33, 39, 1, 6 ve 3 adettir.



Şekil 2.2. Örneklenen hayvanların cinsiyetlere göre dağılımları

Araştırmada kullanılan hayvanlar cinsiyetlerine göre gruplandırıldığında % 47'sinin erkek, % 53'ünün ise dişi hayvanlardan oluştuğu görülmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.3. İşletme kapasitesine göre numune sayıları

Solunum sistemi semptomları sergileyen hayvanların bulunduğu ve en fazla 2 adet hayvandan örnekleme yapıldığı işletmeler, kapasitelerine göre 1-10 hayvan, 10-50

hayvan, 50-100 hayvan, 100-200 hayvan, 200 ve üzeri hayvan bulunduran işletmeler olmak üzere gruplandırılmıştır (Şekil 2.3).

2.2. Svap Numunelerinin Hazırlanması

Bovine Coronavirus enfeksiyonundan şüpheli ya da solunum sistemi enfeksiyonu belirtileri gösteren toplam 92 adet sığırdan alınan ve soğuk zincirde muhafaza edilen nazal svap numuneleri laboratuvara getirildikten sonra PCR uygulamasında kullanılmak üzere - 80 °C’de saklandı. Ekstraksiyon işlemi öncesinde nazal svapların her birine 1cc steril PBS ilave edildi ve 1 dakika boyunca vortekslendi. PBS ilave edilmiş olan svaplar 24 saat +4°C’de buzdolabında bekletildi. Daha sonra PBS ile muamele edilmiş nazal svaplar buzdolabından çıkarılarak RNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere tekrar 1 dakika boyunca vortekslendi.

2.3. Svap Numunelerinden RNA Ekstraksiyonu

Toplanan nazal svap örneklerinden viral RNA ekstraksiyon işlemleri, pozitif kontrol ile birlikte ‘QIAmp cador Pathogen Mini Kit’ (QIAGEN, 54104, Almanya) ile gerçekleştirildi. Bu amaçla;

1. 20 µl proteinase K 2 ml’lik steril ependorf tüpüne aktarıldı.
2. Her bir proteinase K’ nin üzerine PBS içeren nazal svaptan 200 µl ilave edildi.
3. Üzerine carrier RNA içeren buffer AVE ile buffer VXL karışımından 100 µl ilave edildi. Steril ependorf tüpü içerisindeki solüsyonlarda homojen bir dağılımın gerçekleşmesi amacıyla 1 dakika boyunca vortekslendi.
4. Süspansiyonlar 20-25°C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. Örnekler kısa süreli santrifüj edildi (8.000 rpm, 30 saniye).
6. Süspansiyona 350 µl buffer ACB ilave edildi. Örnekler 10 saniye vortekslendikten sonra kısa süreli santrifüj yapıldı.
7. Ependorf tüpünde bulunan toplam 670 µl süspansiyon, filtreli toplama tüpüne aktarıldı ve 6.000 x g (8.000 rpm)’de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Filtreler yeni toplama tüplerine aktarıldı.
9. Her bir örneğe 600 µl buffer AW1 ilave edildi ve 6.000 x g (8.000 rpm)’de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Filtreler yeni toplama tüplerine aktarıldı.

11. Her bir örneğe 600 µl buffer AW2 ilave edildi ve 6.000 x g (8.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Filtreler tekrar yeni toplama tüplerine aktarıldı ve 20.000 x g (14.000 rpm)'de 2 dakika santrifüj edildi.
13. Filtreler steril ependorf tüplerine aktarıldı.
14. Filtrelerin üzerine 75 µl buffer AVE eklendi ve 20-25°C'de 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
15. 20.000 x g (14.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
16. Filtreler atıldı ve ependorfta kalan RNA ekstrasyon ürünleri cDNA elde edilmek üzere +4°C'de muhafaza edildi.

2.4. RNA Ekstraksiyon Ürünlerinden cDNA Eldesi

RNA ekstraksiyon ürünlerinden cDNA eldesi amacıyla, 'BIO-RAD iScript cDNA Synthesis Kit' (BIO-RAD, 170-8891, California) kullanıldı.

Kit içerisindeki bileşenlerden her numune için;

5 x iScript reaction mix 4 µl,

iScript reverse transcriptase 1 µl,

Nuclease- free water 14 µl,

RNA template (ekstraksiyon ürünü) 1 µl kullanılmıştır.

Thermal cycler'da reaksiyon protokolü ;

25 °C'de 5 dakika

42 °C'de 30 dakika

85 °C'de 5 dakika

Thermal cycler'dan çıkan cDNA ürünleri PCR'da kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.5. PCR Uygulaması

PCR yöntemine tabi tutulacak olan ve -20 °C’de muhafaza edilen cDNA ürünleri çözdürüldü. RT-PCR işleminde kullanılan primer dizilimi Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. BCoV’e yönelik olarak kullanılan primer çifti dizilimi (Cho ve ark 2001).

Primer Adı	Primer Dizilimi	Gen	Ürün (bp)
NOF	5’ GCA ATC CAG TAG TAG AGC GT 3’	N	730
NOR	5’ CTT AGT GGC ATC CTT GCC AA 3’	N	730

PCR yönteminde kullanılan karışım:

MQ water	740,5 µl
10 x Buffer	150 µl (Taq Buffer + KCL)
MgCl ₂	90 µl
dNTP mix	12 µl (3x4)
Taq Polimeraz	7,5 µl

Yukarıda tarif verilen PCR karışımından numune başına 10 µl, nükleaz free dH₂O 2,8 µl, F-R Primer 0,2 µl, cDNA ürününden 2 µl olacak şekilde 92 numune için hesaplanarak gereken solüsyon hazırlanıp termal cyclus (Bio-Rad T100, Singapur) içerisine yerleştirildi.

Termal cyclus’daki PCR aşamaları ve bu aşamalar sırasında uygulanan derece (°C)/ süre değerleri Çizelge 2.2’de belirtilen şekilde 30 siklus olarak gerçekleştirildi.

Çizelge 2.2. PCR aşamasında kullanılan zaman ve ısı döngüsü.

Zaman	Isı
3 dakika	94 °C
1 dakika	94 °C
2 dakika	58 °C
1 dakika	72 °C
7 dakika	72 °C

2.6. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi için elektroforez tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla, %1'lik agaroz (Sigma, Almanya) 0,5xTAE (Tris Acetate – Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) tamponunun içerisinde karıştırılarak mikrodalga fırında eritildi. Agaroz 65–70 °C'ye kadar soğutulduktan sonra jel içerisine 100 ml için 5 µl olacak şekilde Ethidium Bromide (EtBr-Sigma, Almanya) ilave edildi. Agaroz jel yatağı elektroforez tankına (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Carl-Benz, Blue Marine 100, Almanya) yerleştirildi. Pozitif ve negatif kontrol dahil olmak üzere PCR ürünlerinin de (15 µl) bulunduğu DNase ve RNase free eppendorf tüplerine jel loading solution (Sigma, Almanya)'dan 5 µl konularak pipete edildi. Agaroz jeldeki ilk kuyucuğa 10 µl, 100 base pair (bp)'lik DNA Ladder (Solis BioDyne 100 bp DNA Ladder, Tartu, Estonia), 2. kuyucuğa 20 µl pozitif kontrol, 3. kuyucuğa 20 µl negatif kontrol (PCR ürünü yerine RFW eklenerek hazırlandı) ve takiben sırasıyla PCR ürünlerinden 20'şer µl konuldu. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağı (Serva, Blue Power Plus, Almanya) 120 V'ye ayarlandı ve 45 dk jelde katot (–)'dan anot (+)'a doğru numuneler yürütüldü. Bu süre sonunda jel, transilluminatör (UVP Inc., Upland CA, ABD) altında incelenerek PCR sonrasında oluşan bantlar (730 bp yönünden) değerlendirildi ve fotoğrafları kaydedildi.

2.7. Kan Numunelerinin Hazırlanması

BCoV enfeksiyonundan şüpheli ya da solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gösteren ve svap örnekleri alınan toplam 92 adet sığırın aynı zamanda vena jugularisinden

en az 5 ml olacak şekilde kan numuneleri alındı. Kan numuneleri soğuk zincirde muhafaza edilerek laboratuvara ulaştırıldı. Tüp içerisindeki kan 10 dakika 2000xg'de santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri antikor-ELISA'ya tabi tutulmak üzere -80°C 'de saklandı.

2.8. ELISA

Svap numunelerinin alındığı 92 adet sığırın her birinden ayrıca alınan kan serumu numuneleri BCoV antikor varlığı yönünden ticari indirekt ELISA kiti (SVANOVIR BCoV-Ab -Uppsala, İsveç) kullanılarak incelendi.

ELISA Kitinin İçeriği:

Enfeksiyöz olmayan BCoV antijeni ve kontrol antijeni ile kaplı 96 kuyucuklu 2 adet mikroplyet (tek sayılı sütunlarda bulunan kuyucuklar viral antijen kaplı, çift sayılı sütunlarda bulunan kuyucuklar ise kontrol antijen ile kaplı),

Negatif kontrol,

Pozitif kontrol,

Konjugat ,

Substrat,

Stop solüsyonu,

20x Yıkama solüsyonu ve

Sulandırma solüsyonundan oluşmaktadır.

ELISA Testinin Uygulanması:

- Soğuk zincirde muhafaza edilen kan serumu numunelerinin ve ELISA kitinin uygulamaya başlamadan 1 saat önce oda ısısına gelmesi sağlandı.

- Viral antijen ve kontrol antijeni ile kaplı tüm kuyucuklara 100 µl sample diluent konuldu ve 4 µl pozitif (PK) ve negatif (NK) kontroller olarak sırasıyla pleytin A1, B1- A2, B2 ve C1, D1- C2, D2 kuyucuklarına konuldu.

- Viral antijen ve kontrol antijeni ile kaplı diğer kuyucuklara (E1, F1, ..) serum numunelerinden 4 µl çift kuyucuk olacak şekilde ilave edildi.

- 1 saat 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Hazırlanan yıkama solüsyonu ile 3 kez kuyucuklar yıkandı.

- Tüm kuyucuklara HRP konjugat'dan 100'er µl ilave edildi. 1 saat 37 °C'de inkubasyona bırakıldı.
- 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Tüm kuyucuklara substrat solüsyonundan 100'er µl ilave edildi. 10 dakika oda ısısında inkube edildi.
- İnkubasyon süresi sonunda tüm kuyucuklara, içerisindeki solüsyonlar boşaltılmadan 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu.
- Mikropleytlar sonuçlar değerlendirmek üzere ELISA okuyucusuna yerleştirildi.

Testin Değerlendirilmesi:

Sonuçlar ELISA okuyucusunda (Rayta RT-2100C, Çin) 450 nm dalga boyunda okutularak Optik Dansite (OD) değerleri belirlendi ve sonuçlar kit prosedürüne göre değerlendirildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Kontroller kullanılarak testin "OD Corr" değeri hesaplandı;

$$OD BCoV - OD kontrol = OD Corr$$

PP (Yüzde pozitif değer) = $OD Corr (örnek veya negatif kontrol) / OD Corr (Pozitif kontrol) \times 100$

$$OD Corr Pozitif kontrol > 0.5$$

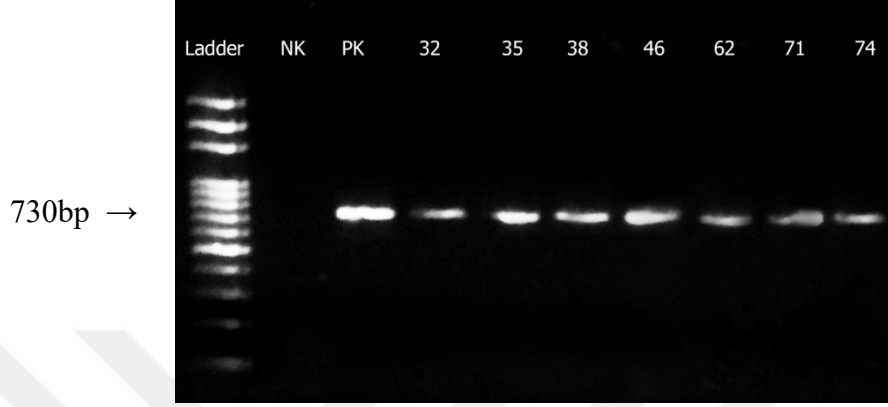
$$PP Negatif kontrol < 10$$

$$PP < 10 \text{ Negatif}$$

$$PP \geq 10 \text{ Pozitif}$$

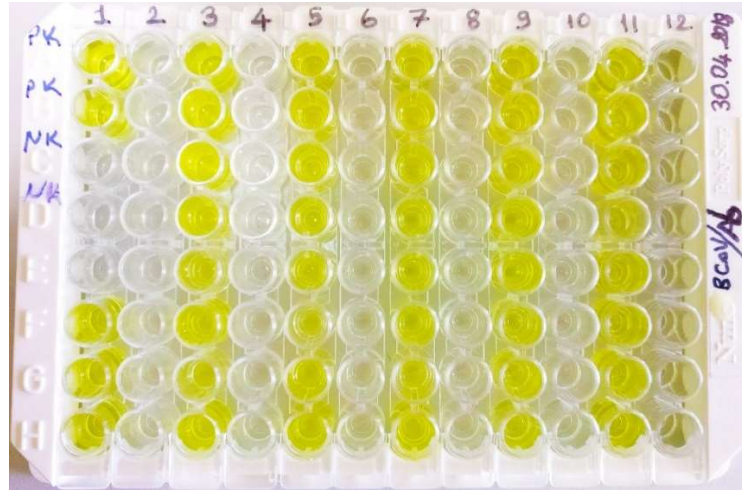
3. BULGULAR

Konvansiyonel PCR ile incelenen (Şekil 3.1) 92 adet sığıra ait svap numunelerinden 10 adedi (%10,87) BCoV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 82 adedi (% 89,13) negatif olarak belirlendi (Çizelge 3.1., 3.2.).



Şekil 3.1. Bazı numunelerden elde edilen RT-PCR ürünlerinin elektroforez sonuçları
Ladder: 100bp DNA leader, NK: BCoV negatif kontrol, PK: BCoV pozitif kontrol, 32,35, : Örnek no.

BCoV antikor varlığı yönünden, ticari indirekt ELISA kiti (BCoV Ab-ELISA) ile incelenen (Şekil 3.2) 92 adet sığıra ait kan serumu numunelerinden 86'sı (%93,48) virusa spesifik antikorlar yönünden pozitif olarak tespit edildi (Çizelge 3.1., 3.2.). Numunelerden 6 adedinin (% 6,52) ise BCoV antikor varlığı yönünden negatif olduğu saptandı.

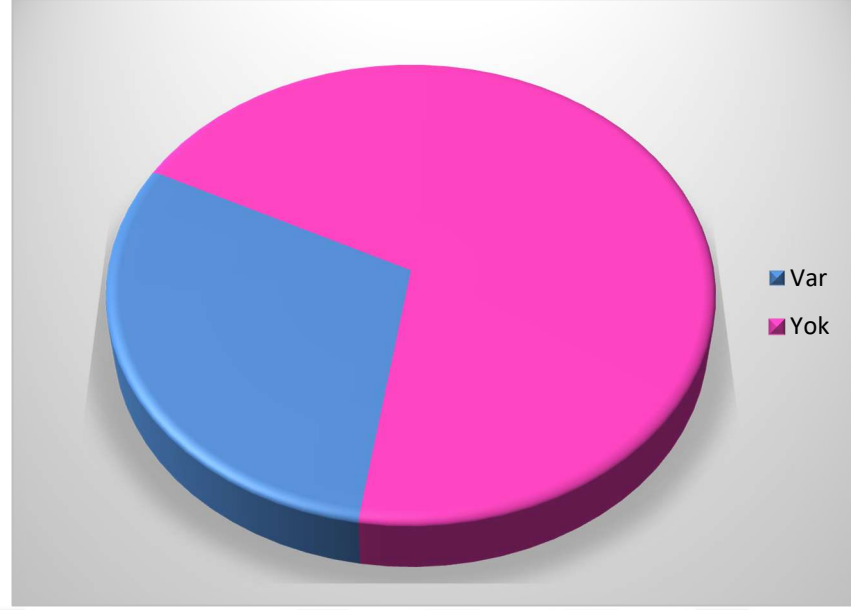


Şekil 3.2. Serum numunelerinin bir kısmı ile gerçekleştirilen BCoV Ab-ELISA sonuçları

BCoV yönünden pozitif olduğu belirlenen nazal svap numunelerinin alındığı hayvanların bulunduğu yerler, cinsiyet, yaş, örnekleme yapılan hayvanların bulunduğu

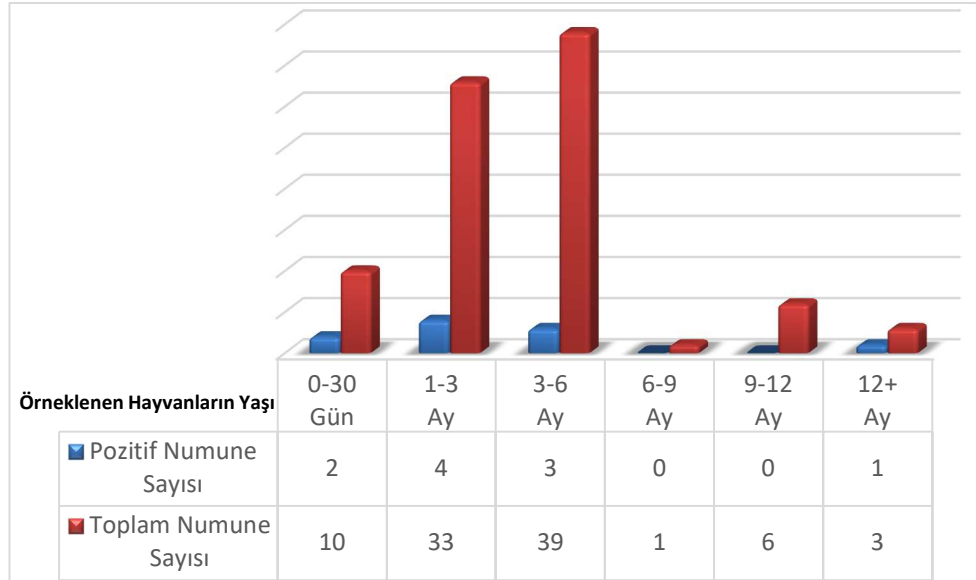
işletmedeki toplam hayvan sayısı ve bu hayvanlarda solunum yolu enfeksiyonu bulguları haricinde gözlenen klinik belirtiler (ateş ve enterit) Çizelge 3.1’de özetlenmiştir. Buna göre 11, 32, 35, 38, 46, 62, 71, 74, 75 ve 83 nolu hayvanlara ait svap numuneleri olmak üzere toplam 10 adet örneğin RT-PCR yöntemi ile BCoV yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir. BCoV-Ab ELISA kiti ile 86 adet serum numunesinin pozitif olduğu örneklerin haricindeki 50, 74, 88, 89, 90, 91 numaralı hayvanlara ait serum örnekleri olmak üzere toplam altı adet numunenin BCoV yönünden seronegatif olduğu saptanmıştır. Bu hayvanlardan sadece 74 numaralı hayvana ait svap numunesinin BCoV yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Svap örneklerinin BCoV yönünden pozitif olduğu belirlenen diğer 9 adet hayvana ait serum numunelerinin ise antikor yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir.

Şekil 3.3’de, belirtilen sayısal dağılıma göre RT-PCR ile BCoV yönünden pozitif belirlenen numunelerde respiratorik enfeksiyona eşlik eden enteritise dair hayvanların verileri yansıtılmaktadır. Buna göre, RT-PCR ile BCoV yönünden pozitif bulunan hayvanların % 30’unda (3/10) enteritis mevcut iken % 70’inde (7/10) bu bulguya rastlanmamıştır. Hem solunum yolu enfeksiyonu belirtileri hem de ishal semptomları gözlenen 7 hayvana ait svaplarda ise BCoV varlığı belirlenememiştir. Buna ilave olarak numune alındıktan kısa bir süre sonra ölüm meydana gelen 3 ve 4 nolu hayvanlarda da BCoV tespit edilememiştir. Ayrıca yüksek ateş gözlenen, 2 yaşın üzerinde ve aynı sürüde yer alan iki hayvanın (46 ve 47) sürüye yeni dahil edildikleri ve transport geçmişleri olduğu saptanmıştır. Bu hayvanlardan 46 nolu hayvana ait svap örneğinden BCoV varlığı ortaya konulmuştur.



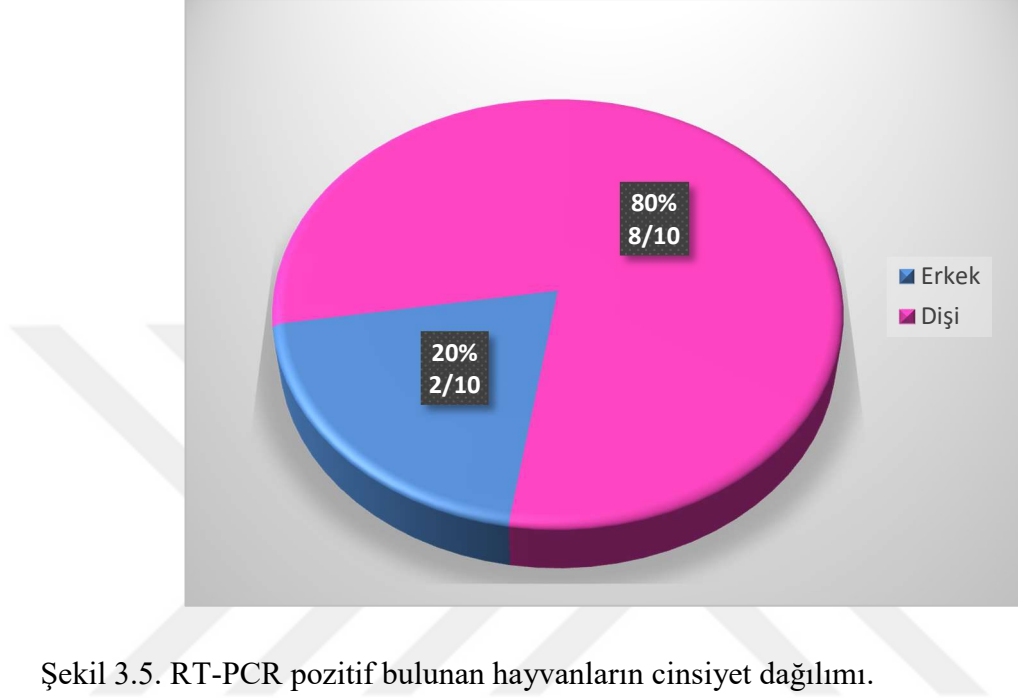
Şekil 3.3. RT-PCR ile pozitif bulunan numunelerde respiratorik klinik belirtilere eşlik eden enteritis oranı.

BCoV yönünden RT-PCR ile pozitif belirlenen hayvanların yaşlarına göre dağılımı Şekil 3.4' de verilmiştir. Numunelerin alındığı hayvanlardan yaşları 0-30 günlük olanlardan 2, 1-3 ay arası 4, 3-6 ay arası 3, 12 ay üzeri yaş aralığındaki hayvanlardan ise 1 adet BCoV pozitivitesi elde edildi.



Şekil 3.4. RT-PCR ile BCoV pozitif tespit edilen hayvanların yaşa göre dağılımı.

B_{CoV} bakımından RT-PCR pozitif bulunan hayvanların cinsiyet dağılımı ise Şekil 3.5’de belirtilmiştir. Bu durumda pozitif tespit edilen numunelerin %80’i dişi, %20’si erkek olarak saptanmıştır.



Şekil 3.5. RT-PCR pozitif bulunan hayvanların cinsiyet dağılımı.

Araştırmada kullanılan toplam 92 hayvanın 5 tanesinde B_{CoV}’a spesifik hem antijen hem de antikor negatif, 77 tanesinde antijen negatif-antikor pozitif, 1 tanesinde antijen pozitif-antikor negatif, 9 tanesine ise hem antijen hem de antikor pozitif sonucu elde edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı hayvanlara ait bilgiler ve test sonuçları.

Örnek No	Alındığı Yer (İlçe)	Cinsiyet	Yaş (Gün)	İşletme Hacmi (Hayvan Sayısı)	Klinik Bulgu			RT-PCR	BCoV/Antikor
					Ateş	Nazal Akıntı	Enterit		
1	Selçuklu	♀	45	150	40,5	+	-	-	+
2	Meram	♀	150	50	40	+	-	-	+
3	Meram	♂	7	50	39,7	+	-	-	+
4	Karatay	♂	25	30	40,5	+	-	-	+
5	Karatay	♂	75	30	39,5	+	-	-	+
6	Karatay	♂	120	80	41	+	-	-	+
7	Karatay	♂	120	80	41	+	-	-	+
8	Karatay	♂	150	80	40,3	+	-	-	+
9	Karatay	♂	180	80	38,5	+	-	-	+
10	Meram	♀	20	80	40,5	+	-	-	+
11	Meram	♀	15	120	40	+	+	+	+
12	Karatay	♀	40	30	41	+	-	-	+
13	Karatay	♂	60	20	40,5	+	+	-	+
14	Karatay	♂	75	20	40,5	+	+	-	+
15	Karatay	♀	300	20	40	+	-	-	+
16	Karatay	♂	180	80	40	+	-	-	+
17	Meram	♀	50	40	40,5	+	-	-	+
18	Gönen	♀	210	20	40	+	-	-	+
19	Gönen	♀	90	20	40,5	+	-	-	+
20	Gönen	♂	75	15	41	+	-	-	+
21	Gönen	♂	120	15	40	+	-	-	+
22	Gönen	♀	60	23	39,7	+	-	-	+
23	Gönen	♂	120	23	39	+	-	-	+
24	Gönen	♀	180	10	40	+	-	-	+
25	Gönen	♀	150	40	38,9	+	-	-	+
26	Gönen	♀	180	90	40	+	-	-	+
27	Gönen	♂	180	85	41	+	-	-	+
28	Meram	♂	300	80	40,8	+	-	-	+
29	Meram	♂	360	80	40,5	+	-	-	+
30	Meram	♂	300	80	39,7	+	-	-	+
31	Meram	♂	330	80	39,8	+	-	-	+
32	Karatay	♀	50	70	38,7	+	+	+	+
33	Karatay	♂	60	70	39,8	+	+	-	+
34	Karatay	♀	45	70	38,7	+	-	-	+
35	Selçuklu	♂	60	150	38,5	+	-	+	+
36	Çumra	♂	75	1000	40	+	-	-	+
37	Çumra	♀	65	1000	40,5	+	-	-	+
38	Çumra	♀	40	1000	41	+	-	+	+
39	Çumra	♀	55	1000	39	+	-	-	+
40	Çumra	♂	30	1000	40	+	-	-	+
41	Çumra	♂	20	1000	38,5	+	-	-	+
42	Çumra	♀	15	1000	39	+	-	-	+
43	Çumra	♂	55	1000	40	+	-	-	+
44	Çumra	♀	40	1000	39,7	+	-	-	+
45	Çumra	♂	70	1000	39	+	-	-	+
46	Meram	♀	700	7	41,7	+	-	+	+

Kırmızı satır: RT-PCR ile BCoV yönünden pozitif hayvanlar

Çizelge 3.1.(Devam) Örneklerin alındığı hayvanlara ait bilgiler ve test sonuçları.

Örnek No	Alındığı Yer (İlçe)	Cinsiyet	Yaş (Gün)	İşletme Hacmi (Hayvan Sayısı)	Klinik Bulgu			RT-PCR	BCoV/Antikor
					Ateş	Nazal Akıntı	Enterit		
47	Meram	♀	720	7	40	+	-	-	+
48	Selçuklu	♀	90	15	40,5	+	-	-	+
49	Karatay	♂	450	70	39	+	-	-	+
50	Karatay	♂	45	70	39	+	-	-	-
51	Meram	♀	60	120	40,8	+	+	-	+
52	Meram	♂	90	120	41	+	-	-	+
53	Meram	♀	90	120	39,1	+	-	-	+
54	Selçuklu	♀	120	15	39	+	-	-	+
55	Meram	♀	180	2	41,1	+	-	-	+
56	Selçuklu	♂	150	10	40	+	-	-	+
57	Meram	♂	15	50	40,1	+	-	-	+
58	Meram	♂	90	40	40,7	+	-	-	+
59	Meram	♂	60	40	40,5	+	-	-	+
60	Selçuklu	♀	60	60	38,6	+	+	-	+
61	Selçuklu	♀	60	60	39	+	+	-	+
62	Selçuklu	♀	30	150	39,6	+	+	+	+
63	Meram	♂	120	40	40,2	+	-	-	+
64	Meram	♂	120	40	39,7	+	-	-	+
65	Selçuklu	♀	180	100	39	+	+	-	+
66	Karatay	♂	300	80	40,5	+	-	-	+
67	Meram	♀	30	120	40,2	+	-	-	+
68	Selçuklu	♂	150	100	38,5	+	-	-	+
69	Meram	♂	180	80	40,7	+	-	-	+
70	Meram	♂	100	80	40	+	-	-	+
71	Sarayönü	♀	60	300	39	+	-	+	+
72	Sarayönü	♀	120	300	39	+	-	-	+
73	Sarayönü	♀	150	300	40	+	-	-	+
74	Meram	♂	100	120	40,6	+	-	+	-
75	Meram	♀	120	120	39,6	+	-	+	+
76	Sarayönü	♀	70	300	41,6	+	-	-	+
77	Meram	♂	120	12	40	+	-	-	+
78	Çumra	♀	120	1000	40	+	-	-	+
79	Çumra	♀	150	1000	39,7	+	-	-	+
80	Çumra	♂	120	1000	41	+	-	-	+
81	Çumra	♀	130	1000	40	+	-	-	+
82	Çumra	♀	160	1000	41	+	-	-	+
83	Çumra	♀	180	1000	39,8	+	-	+	+
84	Çumra	♀	100	1000	39	+	-	-	+
85	Çumra	♀	120	1000	38,7	+	-	-	+
86	Çumra	♀	150	1000	41	+	-	-	+
87	Çumra	♀	150	1000	39	+	-	-	+
88	Karatay	♀	90	200	40	+	-	-	-
89	Karatay	♂	100	200	40,5	+	-	-	-
90	Karatay	♀	150	200	41	+	-	-	-
91	Meram	♀	45	80	40	+	-	-	-
92	Karatay	♂	180	80	41,5	+	-	-	+

Kırmızı satır: RT-PCR ile BCoV yönünden pozitif hayvanlar

Çizelge 3.2. RT-PCR ve ELISA pozitiflik oranları

Test Adı	Pozitif/Toplam hayvan sayısı (%)
RT-PCR BCoV Pozitivitesi	10/92 (% 10,87)
BCoV Antikor-ELISA Pozitivitesi	86/92 (% 93,48)

Çizelge 3.3. BCoV antijen ve antikor durumunun hayvanların yaş gruplarına göre dağılımı.

BCoV	0-30 gün	1-3 ay	3-6 ay	6-9 ay	9-12 ay	12+ ay	Toplam
Antijen -, Antikor -	0/10	2/33	3/39	0/1	0/6	0/3	5/92
Antijen -, Antikor +	9/10	25/33	34/39	1/1	6/6	2/3	77/92
Antijen +, Antikor -	0/10	0/33	1/39	0/1	0/6	0/3	1/92
Antijen +, Antikor+	1/10	6/33	1/39	0/1	0/6	1/3	9/92

4. TARTIŞMA

Global sığır nüfusu 2018 yılında yaklaşık olarak 1.001.84 milyara ulaşmıştır (Statista, 2018). Günümüzde giderek artan insan nüfusu ile orantılı olarak beslenme ihtiyaçları da artmaktadır. Beslenme ihtiyaçlarının artması daha fazla hayvan ve hayvansal ürün gerektirmektedir. Bu ilişki hayvan sağlığı ile ilgili konuları önemli hale getirmiştir. Hastalıklardan kaynaklanabilecek verim kayıplarını en aza indirgeyebilmek için veteriner hekimlerin birçok hastalığın yanı sıra özellikle sığırlarda gözlenen viral hastalıklar konusuna da eğilmelerini sağlamıştır.

Solunum sistemi hastalıklarının (BRD) İngiltere sığır endüstrisine yıllık 80 milyon sterline mal olduğu tahmin edilmekte olup maliyetin hayvan başına hafif vakalarda 30 sterlin, ölümlü vakalarda ise 500 sterlin civarında olduğu bildirilmektedir. Mali kayıpların mortalite ve antibiyotik tedavisi maliyetlerinden meydana geldiği ancak en büyük kaybın hastalığın sürünün büyük bir kısmını etkilemesi ve bu hayvanların uzun tedavi süreçlerinden dolayı ortaya çıkan kilo kaybından kaynaklandığı belirtilmiştir (Scott, 2018). Solunum yolu enfeksiyonuna neden olan etkenlerin (viral, bakteriyel vb.) fazlalığı ve sığırlarda solunum yolu CoV'larına yönelik çalışmaların sınırlı olması, tüm Dünya ve Ülkemizde bu virusun bahsedilen ekonomik kayıplardaki payının ne ölçüde olduğu konusunda tam bir bilgi sahibi olunamamasına yol açmaktadır.

Genç ve yetişkin sığırlarda gözlenen solunum yolu enfeksiyonlarında sebep olarak birçok viral ve bakteriyel etken sorumlu tutulmaktadır. Bu araştırmada solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gösteren, çoğunluğunu 0-6 aylık buzağuların oluşturduğu (82/92) sığırlarda BCoV enfeksiyonlarının virolojik ve serolojik olarak araştırılarak Ülkemizdeki respiratorik enfeksiyonlara neden olan etkenler arasındaki durumunun ortaya konulması amaçlanmıştır.

CoV'lar geniş konakçı yelpazesine sahip viruslardır. Hem RNA yapısında olmaları hem de mutasyonlara açık olmaları sebebiyle meydana getirebilecekleri salgınlarla dikkat çekici özellik taşımaktadırlar. Son yıllarda CoV'ların, MERS ve SARS salgınları ile insan sağlığını tehlikeye düşürebilecek ciddi tehdit unsurları olarak karşımıza çıkmış olmaları güncelliklerini korumalarına ve araştırmacıların bu konuda yoğunlaşmalarına neden olmaktadır.

Dünyada ve Ülkemizde bugüne kadar gerçekleştirilen birçok araştırmada ve saha çalışmalarında (Alenius ve ark 1991, Cho ve ark 1991, Heckert ve ark, 1991, Tsunemitsu ve ark 1991, Alkan ve ark 1998, Trávén ve ark 2001, Hasöksüz ve ark 2005, Bok ve ark 2015, Yavru ve ark 2016) BCoV'nin özellikle 1-3 haftalık genç buzağılarda ishal ve ineklerde kış dizanterisine neden olduğu bildirilmiştir. BCoV'nin bu iki önemli enfeksiyonun yanısıra 6 aylık oluncaya kadar buzağılarda bazen ishalle eş zamanlı olmak üzere öksürük ve hafif solunum yolu belirtileri ya da pnömoni ile karakterize enfeksiyonlardan da sorumlu olduğu vurgulanmaktadır (McNulty ve ark 1984, Saif ve ark 1986, Heckert ve ark, 1990, Cho ve ark 2001b, Hasöksüz ve ark 2005, Beuttemuller ve ark 2017).

Respiratorik BCoV'un hem enterik hem de solunum sistemi belirtileri yoluyla saçılım gösterdiği, bu saçılımın ise 0-4. günlerde pik düzeyde olduğu da bildirilmiştir (Thomas ve ark 2006). Solunum belirtileri ve ateş belirtisi göstermeyen seropozitif hayvanların beşte birinde nazal saçılımın tespit edilmiş olması da (Tsunemitsu ve ark 1999b) ilginç bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Solunum yolunda virusun öncelikli etkilediği bölgeler, burun boşluğunun epitel hücreleri ve trakeadır. Bu bölgelerde virus; rhinitis, aksırma ve öksürme gibi belirtilerle kendini gösteren orta şiddette üst solunum yolu enfeksiyonuna neden olmakta, aynı zamanda virus alt solunum yolunu da enfekte edebilmekte ve küçük çapta akciğer lezyonlarına sebep olabilmektedir. BCoV nedenli solunum yolu enfeksiyonları, çoğunlukla tedavi gerektirecek kadar şiddetli seyretmese dahi buzağuları, daha ağır semptomlara yol açan sekonder alt solunum yolu enfeksiyonlarına predispoze kılarlar. BCoV ile enfekte olan buzağuların, virusu solunum ve intestinal kanallarının her ikisinde birden aynı anda bulundurabilecekleri de bildirilmiştir (Reynolds ve ark 1986, Tsunemitsu ve ark 1991, Hasöksüz ve ark 1999a). BCoV solunum yolu enfeksiyonları, genellikle enterik patojenler tarafından bulaşmada kullanılan fekal-oral yola ilave olarak, aerosol-nazal yol ile de virus bulaşmasına yol açabilmeleri nedeniyle oldukça önemli görülmektedir (Clark 1993, Hasöksüz ve ark 2005). Bu araştırmada örnekleme yapıldıktan 2-3 gün sonra ölüm meydana gelen iki adet (3 ve 4 nolu hayvanlar), transport geçmişi olan 10 adet olmak üzere tümü klinik olarak hafiften şiddetliye kadar değişen solunum yolu semptomları gösteren hayvanlar kullanılmıştır.

BCoV'nin dışkı ve nazal örneklerden yapılan RT-PCR ve nested PCR ile moleküler tanısı oldukça duyarlı bir yöntem olarak kabul edilmekte ve rutinde yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR tabanlı metotların (klasik ya da Real-Time) antikor varlığında bile viral antijen tespitinde geleneksel metotlardan çok daha duyarlı olduğu bilinen bir gerçektir (Cho ve ark 2001, Hasöksüz ve ark 2002, Brandao ve ark 2006, Takiuchi ve ark 2008, Decaro ve ark 2008, Bok ve ark 2015). Hasöksüz ve ark (2002) RT-PCR gibi moleküler tekniklerin ELISA gibi testlere göre duyarlı ve özgül olduğunu özellikle de subklinik enfeksiyonların teşhisinde önemli bir yer tuttuğunu bildirmişlerdir.

Bu araştırmada RT-PCR ile virusun N genine yönelik primerlerin kullanılmış olmasının sebebi bu bölgenin virusun diğer genlerine nazaran daha stabil bir yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim Amerikan Center for Disease Control and Prevention (CDC) kuruluşu da virusun teşhisi açısından N geninin hem izleme hem de doğrulama amaçlı olarak PCR çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmiştir. (Timurkan ve ark 2015).

Direkt ELISA yöntemi ile karşılaştırıldığında RT-PCR tekniğinin 50, nested PCR tekniğinin ise 5000 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Cho ve ark 2001). Ayrıca RT-PCR'm hücre kültürü izolasyonu gibi klasik yöntemlere göre daha hızlı, duyarlı ve daha az zahmetli bir yöntem olduğu çok açıktır. (Escutenaire ve ark 2007, Decaro ve ark 2008).

Decaro ve ark (2008) çiftliklerden topladıkları 92 dışkı ve 82 nazal svab örneğini Real Time RT-PCR yöntemi ile BCoV yönünden incelemişler ve 43 dışkı ve 54 nazal svap örneğinde pozitif sonuç tespit etmişlerdir.

Alkan ve ark (2011) BCoV'un respiratorik ve enterik S1 gen bölgesinin genetik karakterizasyonlarını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada ishal ve solunum yolu belirtileri gösteren sığırlardan aldıkları 147 dışkı ve 199 nazal svap örneğini hem ELISA hem de RT-PCR yöntemleri ile incelemişler, 16 dışkı ve 2 adet nazal svap örneğinde pozitiflik belirleyerek her iki tipin de ülkemizde yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Timurkan ve ark (2015)'nin yaptıkları bir çalışmada ise Erzurum ili ve ilçelerinden elde edilen 8 adet akciğer örneği ve 46 adet nasal svap örneğine nested-RT-PCR testi yapılmış ve % 20.4 pozitiflik elde edilmiştir.

Hasöksüz ve ark (2005)'nin yaptıkları bir çalışmada, Türkiye'nin Kuzeybatısındaki illerde yer alan ve klinik belirtiler gösteren sığırlardan alınan 96 adet serum, fekal ve nazal svap numuneleri antijen-ELISA ve antikor-ELISA ile analiz

edilmiştir. 0-30 gün, 4-12 ay ve 2-7 yaş arası olarak gruplanan hayvanlardan sadece 4-12 ay arası yaş grubunda bulunan bir hayvanda BCoV'un nazal olarak saçıldığı tespit edilmiştir. Tüm sığırların % 50'sinde BCoV antikor titresini ELISA ile tespit edildiğinde ≤ 100 iken, sığırların % 27.1'i 1.600 ila 25.600 arasında değişen yüksek titrelerle sahip olduğu belirlenmiştir. Dışkı yoluyla BCoV'u saçan hayvanlarda serokonversiyon oranı % 7.3 (7/96) ve ELISA ile saptanan fekal saçılımın negatif sığırlarda % 42.7 (41/96) ve dışkıda serokonversiyon BCoV bulunmayan sığırlarda % 20.8'i olduğu bildirilmiştir. Serokonversiyon ile nazal veya fekal BCoV saçılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını kabul etmişlerdir. Bu araştırmada svap örneklerinde BCoV tespitinin 92 hayvandan 10 tanesinde (% 10.86) gerçekleştirilmiş olması, solunum yolu ile virusun saçılım oranının, Hasöksüz ve ark (2005) tarafından yapılan çalışmaya göre yüksek olduğunu göstermiştir. Araştırmada elde edilen veriler daha önce 199 nazal svap örneğinin sadece 2 adedinde BCoV pozitifitesi belirleyen Alkan ve ark (2011)'nin bildirdiği oranlara bakıldığında da yüksek bulunmuştur. Ülkemizde Timurkan ve ark (2015)'nin Erzurum yöresinde yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise RT-PCR ile belirlenen pozitiflik oranının bu araştırmaya göre yüksek olduğunun belirlenmesi (% 20.4) Erzurum yöresinin respiratorik CoV varlığı açısından endemik bir bölge olabileceğini ve bölgenin özellikle kış aylarındaki coğrafi koşullarının göz önünde tutulması gerektiğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda solunum yolu svap örnekleme yapılan hayvanların sadece 10 adedinde enteritis olgusu tespiti yapılmıştır. Ancak araştırmada asıl hedef özellikle solunum yolu enfeksiyonları etkenleri arasındaki BCoV'nin durumu hakkında bilgi edinmek olduğundan, rektal svap veya gaita numunesi örnekleme yapılmamış olması hayvanlardaki BCoV'nin enterik saçılımı konusunda bir fikir yürütülememesine neden olmuştur.

Fulton ve ark (2016) tarafından yapılan bir çalışmada besi sığırlarında BRD'ye sebep olan viruslar (BoHV-1, BVDV, BRSV, BCoV, PI3V) ile ilgili olarak, BRD belirtileri gösteren 114 hayvandan nazal svap alınmış ve daha sonra bu numunelere yedi adet nekropsi örneği dahil edilmiştir. Nazal svap ve doku homojenatları jel bazlı PCR (G-PCR), kantitatif PCR (qPCR), kantitatif real time reverz transkriptaz PCR (qRT-PCR) ve hücre kültürü ile test edilmiştir. 114 nazal svap BCoV açısından qRT-PCR ile test edildiğinde 72, G-PCR ile 30, hücre kültüründe ise 21 tanesi pozitif bulunmuştur.

Nekropsi örneklerinin tümü G-PCR ile BCoV açısından negatif, hem qRT-PCR hem de kültür sonuçlarına göre ise ikişer adet pozitif numune tespit edilmiştir. qRT-PCR ile BCoV açısından pozitif bulunan 72 numunenin 19 tanesi kültür sonucunda da pozitif bulunmuş, G-PCR ile test edilen 72 numunenin 30 tanesi BCoV açısından pozitif bulunmuştur. Toplam 121 numuneden 13 tanesinin BCoV açısından çalışılan 3 yöntemde de pozitif olduğu ortaya konulmuştur.

Bettenmuller ve ark (2017)'nin yaptıkları bir çalışmada Brezilya'nın güneyinde yer alan Parana eyaletinde bulunan besi sığırlarından BRD salgını sırasında toplanan nazal svaplardan BRCoV (BR-UEL11 suşu) elde edilmiştir. BCoV varlığı, N genini hedefleyen semi-nested PCR kullanılarak teyit edilmiştir. Spike polimorfik bölgesinin kısmi sekansı diğer BCoV suşlarıyla karşılaştırılmıştır. Brezilya'da daha önce izole edilmiş buzağı diyaresi (BECoV) ve kış dizanterisi (BRCoV) ile ilişkili olan BCoV'ler ile BR-UEL11'in klasik referans prototipler ile filogenetik ilişkileri analiz edilmiştir. Brezilyada'ki BRCoV suşları; buzağı diyaresi ile ilgili çoğu izolatlardan ve Mebus, Nebraska ve LYVB gibi soy olarak prototip suşlardan farklı bir grupta kümelenmiştir. Brezilyada'ki BRCoV suşlarının, kış dizanterisi ile ilgili son yıllarda izole edilen suşlarla %98-99 oranında nükleotid benzerliği gösteren bir grupta kümelendiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Brezilya'da izole edilen suşların enterik viruslardan evrimleşerek hem enterik hem de respiratorik bir karaktere dönüştüğü ileri sürülmüştür. Araştırmacılar (Bettenmuller ve ark 2017) CoV'ların başlıca nötralize edici antijeninin spike proteini olmasından dolayı Brezilya suşları ile BCoV prototipleri (Mebus, Nebraska vb) arasındaki S gen dizisinde farklılık tespit edilmesi sebebiyle kullanılan aşuların etkinliğinin değerlendirilmesi gerektiğinin önemini vurgulamaktadırlar. Çünkü Türkiye de dahil olmak üzere sahada halen birçok ülkede kullanılan, Mebus suşu gibi buzağılarda diyare oluşturan suşlarla üretilen aşuların özellikle solunum ve kış dizanterisine sebep olan suşlara karşı etkinliğini azaltabileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde Timurkan ve ark (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada solunum sistemine ait örneklerden elde edilen 1 adet BCoV pozitif PCR ürününün dizi analizi sonrası coronavirus ailesinin Betacoronavirus A grubunda yer aldığı ve Türkiye'de kullanılan BCoV aşı suşları ile aynı clusterda olduğu filogenetik olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise elde edilen PCR ürünlerinde dizi ve filogenetik analiz

yapılmadığı için Türkiye’de daha önce tespit edilmiş olan enterik ve respiratorik BCoV suşları ile akrabalık derecesi belirlenememiştir.

Bu çalışmada Konya ve Isparta çevresindeki bölgelerden toplanan 92 adet respiratorik sisteme ait hastalık belirtileri gösteren buzağı ve sığırlardan alınan nazal svap numuneleri RT-PCR ile BCoV varlığı ve serum numuneleri ELISA ile spesifik antikorlar yönünden araştırıldı. Uygun yöntemlerle hazırlandıktan sonra RT-PCR ile incelenen 92 adet nazal svap numunesinden 10’u (%10.87) BCoV yönünden pozitif bulundu. Usulüne uygun olarak hazırlanan 92 adet serum numunesinden 86’sı (%93,48) ELISA ile BCoV antikor varlığı yönünden pozitif olarak tespit edildi.

Bu araştırmada BCoV tespiti yapılan 10 hayvanın 9 tanesi 6 aylığa kadar olan hayvanlar olup sadece bir tanesi 1 yaş üstü hayvandan oluşmaktadır. Altı aylığa kadar olan antijen pozitif hayvanların sekiz tanesinde aynı zamanda spesifik BCoV antikor varlığının tespiti ilginç bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmamıza paralel bir bulgu olarak Hasöksüz ve ark (2005) tarafından yapılan araştırmada, 0-30 günlük 4, 4-12 aylık 2 hayvan ve 2 yaşın üzerindeki 1 hayvanda olmak üzere toplam 7 hayvanda gaitada virus saçılımı ile beraber serum antikor pozitivitesi saptandığı bildirilmiştir. Ülkemizde Alkan ve ark (2011) tarafından gerçekleştirilen araştırmada ise enterik BCoV saçılımı gösteren 1 ila 2 aylık 7 adet buzağının 4’ünde ve 3 yaşındaki bir sığırdaki aynı zamanda nötralizan antikor varlığı belirlenmiştir. Bu hayvanların 2’sinde (1-2 aylık) enterik saçılımın yanında nazal BCoV saçılımı ve 1/80 titrede nötralizan antikor varlığı belirlenmiştir. Saif (1993) bu konu ile ilgili olarak respiratorik coronavirus enfeksiyonlarında kolostrum yoluyla pasif olarak yavrulara geçen serum antikorlarının rollerinin tam olarak açıklanamadığını bildirmiştir. Domuzlarda PRCV ve buzağılarda BCoV ile ilgili bazı çalışmalarda da (Cox et al., 1990; Heckert et al., 1991) düşük titredeki maternal antikor varlığının solunum yolu enfeksiyonlarında viral replikasyonu engelleyemediği vurgulanmıştır. Serum antikor varlığının ise genellikle enterik CoV enfeksiyonlarından korunmada etkin bir rol oynamadığı düşünülmektedir. Bu görüşe uygun olarak domuzlarda PRCV ve buzağılarda BCoV’ye karşı düşük titredeki maternal antikorların, respiratorik yollardaki viral replikasyonu engellemediği tespit edilmiştir (Saif, 1993). Nitekim bu araştırmada BCoV antijen tespiti yapılan 10 hayvanın 9 tanesinde spesifik antikor tespitinin yapılmış olması bu görüşü destekler niteliktedir.

Ancak antikor titresi tespiti yapılmadığı için titre-koruma düzeyi konusunda herhangi bir yorum yapılamamıştır.

Lin ve ark (2001) BRDC ile ilişkili bir pnömoni epizootiyolojisi sırasında sığırların serumlarında respiratorik BCoV'a karşı nötralize edici ve HI antikor yanıtlarının kinetiğini değerlendirmişlerdir. Epizootik pnömoninin başlangıcında respiratorik BCoV saçılımı gerçekleşen buzağılar düşük seviyelerde nötralizan ve HI antikorlarına sahipken, HE ve S viral glikoproteinlerine karşı yüksek seviyede antikor barındıran sığırlar respiratorik BCoV için negatif bulunmuştur. Ayrıca, ölçülen tüm BCoV antikor izotipleri (IgM, IgG1, IgG2), nötralizan ve HI antikorları ile anlamlı şekilde bağlantılı bulunmuştur. Ölümcül respiratorik BCoV enfeksiyonlarına sahip sığırlarda sadece IgM antikor yanıtları tespit edilmiştir. Lokal olarak indüklenmiş interferon veya IgA antikorlarının BCoV ile ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca verilere göre, BCoV buzağı diyare suşunun intra nazal (IN) uygulamasının respiratorik BCoV'a maruz kalmaya karşı çapraz korumayı indüklediği belirtilmiştir. Bulgular farklı klinik orjinli BCoV suşları arasında çapraz korumayı doğrulayan, buzağuların deneysel challenge çalışmaları sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Gnotobiotik veya kolostrumdan mahrum kalmış buzağuların buzağı diyaresi, kış dizanterisi ve respiratorik BCoV suşları ile inokülasyonu hem nazal hem de fekal olarak BCoV'un saçılmasına yol açmış, ardından da bir buzağı diyare suşu ile challengedan sonra diyareye karşı tam bir koruma sağladığı anlaşılmıştır. Heterolog BCoV suşları ile karşılaşan buzağılarda subklinik nazal ve fekal olarak virusun saçılımı (sadece RT-PCR ile saptanmış), subklinik BCoV enfeksiyonlarını belgeleyen saha çalışmalarını ve subklinik olarak enfekte olmuş hayvanların BCoV için potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olduğunu doğrulamıştır.

BCoV enfeksiyonlarının serolojik teşhisi için, nötralizasyon (Carman ve ark., 1992) ve indirekt ELISA (Trávén ve ark., 1999) en yaygın olarak kullanılan testlerdir. Yapılan araştırmalarda (Saif, 1990) enfekte sürü içinde çoğu buzağı ve yetişkin sığırların BCoV'una karşı serum antikorlarına sahip oldukları bildirilmiştir.

Hasırcıoğlu (2005) ishallerde bulunan buzağılarda CoV tespiti ve sağlıklı sığırların epidemiyolojideki rolünü araştırdığı çalışmasında, ishallerde bulunan hayvanların % 25 (9/36)'inde, sağlıklı annelerinde ise %76 (35/46)'sında seropozitiflik saptamıştır.

Saif ve ark (1991) 6 farklı sürüde bulunan Winter Dysentery (WD) sendromlu sığırların %90'ında (26/29), aynı işletmelerde bulunan sağlıklı görünümlü sığırların ise

%9'unda (1/11) BCoV'un saçılımını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar (1991), WD ve sağlıklı görünümlü sığırlarda seropozitiflik oranlarının ise sırasıyla %73 ve %25 olarak bildirerek, sağlıklı sığırların epidemiyolojik önemine dikkat çekmişlerdir.

Yıldırım ve ark (2008) tarafından Ülkemizin kuzeydoğu bölgesinde VNT ile yaptıkları bir çalışmada BCoV seroprevalansını %26.3, BCoV'a yönelik antikoları ise %4.2 olarak bildirmişlerdir.

Bu araştırmada aşı uygulanmamış hayvanlarda % 93.47 oranında seropositivite tespit edilmiş olması hayvanların kolostrum yolu ile veya hayatlarının belli bir döneminde BCoV'ye maruz kaldıklarını göstermektedir. Ancak svap örneklerinde BCoV tespit edilen 10 hayvanın 9'unda aynı zamana BCoV'ye özgü antikoların bulunuyor olması bu antikoların respiratorik BCoV enfeksiyonlarına karşı korunmadaki etkinliklerini şüpheye düşürmektedir. Araştırmadaki serolojik bulgulara uygun bir biçimde Alkan ve ark (2002) dokuz farklı işletmeye ait 919 adet erişkin sığırdan sağladıkları kan örneklerini BCoV spesifik antikoları yönünden mikronötralizasyon testi ile kontrol ettikleri çalışmalarında 150 adet (%16.3) kan serumunda BCoV'a spesifik antikoların varlığını saptadıklarını bildirmişlerdir. Kontrol edilen işletmelerin tümünde erişkin sığırlarda BCoV enfeksiyonunun varlığı serolojik olarak belirlenmiş, işletmelere göre seroprevalans değerleri %4.4-100 arasında tespit edilmiştir. Yavru ve ark (2016) Burdur ve çevresindeki klinik olarak ishal semptomu gösteren 184 adet buzağıdan ve annelerinden topladıkları kan serum örneklerini indirekt ELISA yöntemi ile BCoV'e spesifik antikolar yönünden inceledikleri çalışmalarında %93.99 oranında yüksek seropozitiflik saptadıkları belirlemişlerdir. Alenius ve ark (1991)'de İsviçre'de kış dizanterisi enfeksiyonu gözlenen 549 düveyle yaptıkları serolojik bir çalışmada hayvanların % 61'inin BCoV'ye karşı seropozitif olduğunu, bu hayvanlarda BCoV antikoları yanında BVDV'una özgü antikoların da tespit edilmesi nedeniyle BCoV'un BVDV ile birlikte hastalığın seyrini ağırlaştırabileceği düşüncesini ileri sürmüşlerdir.

Bölge ve hayvan sayısı açısından sınırlı bir araştırma olmasına rağmen örneklenen hayvanların svap numunelerinde spesifik antijen, serum örneklerinde ise yüksek oranda seropositivite tespit edilmesi, Ülkemiz için solunum yolu enfeksiyonuna neden olan etkenler arasında respiratorik BCoV enfeksiyonlarının önemli bir yeri olduğunu ortaya koymuştur. BCoV enfeksiyonlarında aerosol bulaşmanın ve respiratorik BCoV enfeksiyonlarının buzağı ishallerinin patogeneğinde etkili olup olmadığını ortaya

koyacak, respiratorik ve enterik BCoV suşları arasındaki ilişkileri açığa kavuşturacak araştırmaların gerçekleştirilmesinin oldukça önemli olduğu kanısına varılmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen veriler ülkemizdeki sığır sürülerinde oldukça sık gözlenen solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan etkenler arasında BCoV'nin önemli bir yeri olabileceği kanısını uyandırmıştır. Bu nedenle etkenin solunum formunun ülke hayvancılığı açısından dikkat edilmesi gereken bir problem olduğu, özellikle genç hayvanları etkileyerek sürülerde hızlı bir bulaşma eğilimi gösterebileceği, bazı durumlarda vakaların ölümle sonuçlanabileceği ve solunum yolu enfeksiyonu tedavi masraflarını arttırabileceği gerekçesiyle ülkemiz üreticilerini ekonomik anlamda etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Solunum yolu klinik belirtileri gösteren hayvanlardan elde edilen BCoV izolatları kullanılarak ileride gerçekleştirilecek çalışmalarda, bu izolatların epidemiyolojik, moleküler, biyolojik ve antijenik özellikleri başta olmak üzere karakterizasyonlarının yapılması ve Türkiye'deki diyare olguları başta olmak üzere farklı klinik vakalardan elde edilen saha suşları ile karşılaştırılmaları önem arz etmektedir.

Gelecekte BCoV'lerin hafif klinik seyir şeklinden ölümle sonuçlanan vakalara kadar değişebilen geniş bir solunum yolu enfeksiyonu spektrumunu nasıl indüklediğine, hastalığın şiddetini, virus saçılımı ve bulaşmasını arttıran unsurların ve etkileşimlerin ortaya konulmasına yönelik çalışmalar hedeflenebilir. Özellikle seropozitif hayvanlarda antijen tespit edilmesi gibi ilginç bulguların açıklığa kavuşturulması için kolostrum almamış gnotobiyotik hayvanlarda deneysel BCoV enfeksiyonları oluşturularak PCR gibi genetik materyalin tespitine dayalı testlerle birlikte doku kültürü izolasyon yöntemleri kullanılarak virus aktivitesinin ve saçılımının izlenmesini içeren çalışmalar hedeflenebilir.

Etkili solunum yolu BCoV aşılı için gerekli temel niteliklerin ve bu niteliklerin korunma ile ilgili bağlantılarının anlaşılabilmesi aşı geliştirilmesinin önündeki engeller olarak görülmektedir. Respiratorik BCoV enfeksiyonlarına karşı oluşan immunitenin tam olarak anlaşılmasına yönelik araştırmaların yapılması da açıklanamayan birçok noktanın açığa kavuşmasını sağlayacaktır. Bu araştırma da dahil tüm Dünyada gerçekleştirilen çalışmalarda sığır sürülerinde BCoV'ye karşı seropozitivitenin yüksek olduğunun belirlenmiş olması nedeniyle, salgın şüphesinin olduğu vakalarda hayvanlardan ikiye

hafta ara ile serum numuneleri alınarak antikor testlerine tabi tutulmasının teşhis için bir kriter oluşturup oluşturmayacağı da araştırılabilir.

Solunum sistemine yönelik olarak ülke genelinde daha kapsamlı araştırmaların yapılması ve BCoV için sekans analiz çalışmalarının artırılması önem arz etmektedir. Özellikle BCoV için hücrel immunitiyi uyarabilecek nazal aşı çalışmaları ile birlikte hem enterit hem de respiratorik sistem hastalıklarına yönelik, yerel olarak geliştirilebilecek miks aşı çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Nitekim Ülkemizde birçok enfeksiyona karşı ithal aşuların kullanılıyor olması saha da bu aşuların yerel suşlara karşı koruyuculuk seviyelerinde bazı şüphelere ve problemlere yol açtığı çoğu kez gözlenen bir durumdur.



6. KAYNAKLAR

- Abraham S, Kienzle TE, Lapps W, Brian DA, 1990. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* 176, 296–301.
- Addie DD, Schaap IAT, Nicolson L, Jarrett O, 2003. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J Gen Virol.* 84,2735–44.
- Ahn M, Cui J, Irving AT, Wang LF, 2016. Unique loss of the PYHIN gene family in bats amongst mammals: implications for inflammasome sensing. *Sci Rep*, 6, 21722.
- Alenius S, Niskanen R, Juntti N, Larsson B, 1991. Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: serological evidence. *Acta Vet Scand.* 32(2), 163-70.
- Alexander S, Elder JH, 1984. Carbohydrate dramatically influences immune reactivity of antisera to viral glycoprotein antigens. *Science.* 226(4680),1328-30.
- Alkan F., 1998. Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 45, 29-37.
- Alkan F, 2002. Sığırlarda coronavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisi, A.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara
- Alkan F., Ozkul A., Bilge-Dagalp S., Karaoglu T., Oguzoglu TC., 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, 179-185
- 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.* Apr. 19-25, 308,5961,751-2.
- Ballesteros ML, Sanchez CM, Enjuanes L, 1997. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* 227, 378–388.
- Baudoux P, Carrat C, Besnardeau L, Charley B, Laude H, 1998. Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes. *J Virol* 72,11,8636-43.
- Beaudette FR, Hudson CB, 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc.* 90,51-60.
- Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR, 2012. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4 (6), 1011–1033.
- Benfield DA, Saif LJ, 1990. Cell-Culture Propagation of a Coronavirus Isolated from Cows with Winter Dysentery. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1454-1457.
- Beuttemuller EA, Alferi AF, Headley SA, Alferi AA, 2017. Brazilian strain of bovine respiratory coronavirus is derived from dual enteric and respiratory tropism. *Genetics and Molecular Research* 16, 2, gmr16029580,1-8.
- Bidokhti MRM, 2013. Epidemiology and Molecular Tracing of Bovine Coronavirus and Bovine Respiratory Syncytial Virus Infections in Cattle Herds. Doktora Tezi. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Bidokhti MRM, Tra`ve`n M, Krishna NK, Munir M, Bela`k S, Aleniu 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, 2036–2049.
- Boileau MJ, Kapil s, 2010. Bovine Coronavirus Associated Syndromes. *Vet Clin Food Anim* 26, 123-146.
- Bok M, Miño S, Rodriguez D, Badaracco A , Nuñes I, Souza SP, Bilbao G, Uriarte EL, Galarza R, Vega C , Odeon A , Saif LJ , Parreño V, 2015. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Veterinary Microbiology* 7122,9.
- Bos EC, Luytjes W, van der Meulen HV, Koerten HK, Spaan WJ 1996. The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology.* 218,1,52-60.
- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol.*77(16),8801-11.

- Brandao PE, Gregori F, Richtzenhain LJ, Rosales CA, Villarreal LY, Jerez JA, 2006. Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. *Arch Virol.* 151, 9, 1735-48.
- Carman PS, Hazlett MJ 1992. Bovine coronavirus infection in Ontario, 1990-1991. *Can Vet J* ,33(12),812-4.
- Castells M, Victoria M, Colina R, Musto H, Cristina J 2017. Genome-wide analysis of codon usage bias in Bovine Coronavirus. *Castells et al. Virology Journal.* 14,115.
- Chang RY, Krishnan R, Brian DA, 1996. The UCUAAAC promoter motif is not required for high-frequency leader recombination in bovine coronavirus defective interfering RNA. *J Virol* 70(5), 2720-9.
- Cheever FS, Daniels JB, Pappenheimer AM, Bailey OT 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J Exp Med.* 90, 181-194.
- Cho KO, Hoet AE, Loerch SC, Loech SC, Wittum TE, Saif LJ 2001a. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *Am J Vet Res.* 62,1436-41.b
- Cho KO, Hasoksuz M, Nielsen PR, Chang KO, Lathrop S, Saif LJ 2001b. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch Virol.* 146, 2401-2419.
- Clark, M.A. 1993. Bovine Coronavirus. *British Veterinary Journal* 149, 51-70.
- Clark KJ, Sarr AB, Grant PG 1998. In vitro studies on the use of clay, clay minerals and charcoal to adsorb bovine rotavirus and bovine coronavirus. *Vet Microbiol.* 63(2-4),137-46.
- Cornelissen LA, Wierda CM, van der Meer FJ, Herrewegh AA, Horzinek MC, Egberink HF, de Groot RJ, 1997. Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus. *Journal of virology.* 71(7),5277-5286.
- Cong Y, Verlhac P, Reggiori F 2017. The Interaction between Nidovirales and Autophagy Components. *Viruses* 2017, 9, 182, 1-14.
- Dar AM, Kapil S, Goyal SM 1998. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest.* 10(2),152-7.
- Decaro N, Campolo M, Desario C, Cirone F, D'Abramo M, Lorusso E, Greco G, Mari, Colaianni VML, Elia G, Martella V, Buonavoglia C 2008a. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *J Vet Diagn Invest* 20,28-32. a
- Decaro N, Mari V, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Greco G, Cirone F, Colaianni ML, Cordioli P, Buonavoglia C 2008b. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet Microbiol.* 2126,30-9.
- Decaro N, Campolo M, Mari V, Desario C, Colaianni ML, Trani LD, Cordioli P, Buonavoglia C, 2009. A candidate modified-live bovine coronavirus vaccine: safety and immunogenicity evaluation. *NEW MICROBIOLOGICA*, 32, 109-113.
- DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, et al 2007. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol.* 81(4),1701-13.
- Dong BQ, Liu W, Fan XH, Vijaykrishna D, Tang XC, Gao F, Li LF, Li GJ, Zhang JX, Yang LQ, Poon LL, Zhang SY, Peiris JS, Smith GJ, Chen H, Guan Y. 2007. Detection of a novel and highly divergent coronavirus from Asian leopard cats and Chinese ferret badgers in southern China. *J Virol* 81,6920-6926. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00299-07>.
- Doyle LP, Hutchings LM, 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc.* 108, 257-259.
- Donker NC, Kirkwood CD, 2012. Selection and evolutionary analysis in the nonstructural protein NSP2 of rotavirus A. *Infection Genetics and Evolution* 12(7), 1355-1361.
- Drake JW, Holland JJ, 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24), 13910-13913.
- Emanuelson U, Andersson L, Alenius S, 1989. Milk components as routine indicators of sub-clinical diseases and use in epidemiological research. In: *Proceedings of Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, Exeter, England, April 12-14 . pp. 117-127.

- Erles K, Shiu KB, Brownlie J, 2007. Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus. *Virus Res* 124(1-2), 78-87.
- Escors D, Ortego J, Enjuanes L, 2001. The membrane M protein of the transmissible gastroenteritis coronavirus binds to the internal core through the carboxy-terminus. *Adv Exp Med Biol*, 494, 589-93.
- Espinasse J, Viso M, Laval A, Savey M, Le Layec C, Blot JP, L'Haridon R, Cohen J, 1982. Winter dysentery: a coronavirus-like agent in the faeces of beef and dairy cattle with diarrhoea. *Vet Rec* 110(16), 385.
- Euler M, Wang Y, Nentwich O, Piepenburg O, Hufert FT, Weidmann M, 2012a. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus. *J. Clin. Virol.* 54, 308–312
- Euler M, Wang Y, Otto P, Tomaso H, Escudero R, Anda P, Hufert FT, Weidmann M, 2012b. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2234–2238.
- Fehr R, Perlman S, 2015. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 1282, 1–23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
- Finlay BB, Hancock RE, 2004. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?. *Nat Rev Microbiol*, 2, 497–504.
- Fulton RW, Step DL, Wahrmund J, Burge LJ, Payton ME, Cook BJ, Burken D, Richards CJ, Confer AW, 2011. Bovine coronavirus (BCV) infections in transported commingled beef cattle and sole-source ranch calves. *Can J Vet Res*, 75, 191–9.
- Fulton RW, Ridpathb JF, Burge LJ, 2013. Bovine coronaviruses from the respiratory tract: Antigenic and genetic diversity. *Vaccine*, 31, 886–892.
- Fulton RW, Offay JM, Landis C, Miles DG, Smith RA, Saliki JT, Ridpath JF, Confer AW, Neill JD, Eberle R, Cllement TJ, Chase CCL, Burge LJ, Payton ME 2016. Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. Article in *vaccine* April 2016. DOI: 10.1016/j.vaccine. 2016.04.020.
- Fung S, Huang M, Liu DX, 2014. Coronavirus-induced ER stress response and its involvement in regulation of coronavirus–host interactions. *Virus Research*, 96411, 1-14.
- Gonza'lez JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes L, 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Archives of Virology* 148: 2207–2235.
- Graham RL, Baric RS, 2010. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* 84, 3134– 3146.
- Guard CL, Fecteau G, 2009. Winter dysentery in cattle. In: Smith BP, editor. *Large animal internal medicine*. 4th edition. St. Louis (MO): Mosby Elsevier; p. 876–7.
- Haan CA, Kuo L, Masters PS, Vennema H, Rottier PJ 1998. Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. *J Virol.* 72(8),6838-50.
- Hansa A, Rai RB, Dhama K, Wani MY, Samithan M, Ranganath GJ, 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.
- Hasircioğlu S, 2005. Buzağlara enterik bovine coronavirus enfeksiyonlarının araştırılması ve epidemiyolojide klinik olarak sağlıklı sığırların rolü, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya
- Hasoksuz M, Sreevatsan S, Cho KO, Hoet AE, Saif LJ, 2002. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Res* 84, 1-2, 101-9.
- Hasoksuz M, Kayar A, Dodurka T, Ilgaz A, 2005. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Vet Hung*, 53,1, 137-46.
- Hasoksuz M, Alekseev K, Vlasova A, Zhang X, Spiro D, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Saif LJ, 2007. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *J Virol*, 81, 10, 4981-90.
- Heckert RA, Saif LJ, Hoblet KH, et al., 1990. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Vet Microbiol*, 22,187–201.

- Heckert RA, Saif LJ, Mengel JP, Myers GW, 1991. Isotype-specific antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in serum, feces, and mucosal secretions from experimentally challenge-exposed colostrum-deprived calves. *Am J Vet Res*, 52, 5, 692-9.
- Hedström H, Isaksson A, 1951. Epizootic enteritis in cattle in Sweden. *Cornell Vet* 41, 3, 251-3.
- Hick PM, Read AJ, Lugton I, Busfield F, Dawood KE, Gabor L, Hornitzky M, Kirkland PD, 2012. Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease. *Aust Vet J*, 90, 10, 381-6.
- Holmes KV 2001. Coronaviruses. In Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1187-1204.
- Holmes KV, Lai MMC 1996. Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al, editors. *Fundamental Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. pp. 541-559.
- Hu B, Ge X, Wang LF, Shi L 2015. Bat origin of human coronaviruses. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0422-1>
- Hussain KA, Storz J, Kousoulas KG, 1991. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains. *Virology*, 183, 442-445.
- Institut National de Veille Sanitaire (INVS), 2015. Bulletin hebdomadaire international N°517, du 12 au 18 août.
- Jee J, Hoet AE, Azevedo MP, Vlasova AN, Loerch SC, Pickworth CL, Hanson J, Saif LJ, 2013. Effects of dietary vitamin A content on antibody responses of feedlot calves inoculated intramuscularly with an inactivated bovine coronavirus vaccine. *AJVR*, 74,10.
- Jerez, J.A., Gregori, F., Brandao, P.E., Rodriguez, C.A.R., Ito, F.H., Buzinaro, M.D.G. & Sakai, T. 2005. Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in monolayers of HmLu-1 cells. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 207-210.
- Jeong JH, Kim GY, Yoon SS, Park SJ, Kim YJ, Sung CM, Jang OJ, Shin SS, Koh HB, Lee BJ, Lee CY, Kang MI, Kim HJ, Park NY, Cho KO, 2005. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. *J Vet Med Sci*, 67, 2, 187-9.
- Jonassen CM, Kofstad T, Larsen IL, Lovland A, Handeland K, Follestad A, Lillehaug A, 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Gen Virol*, 86,1597-1607. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80927-0>.
- Jones F, Little, R.B. 1931. The etiology of infectious diarrhea (winder scours) in cattle. *J Exp Med* 53, 835-43.
- Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I, 2013. Antigenic variation among recent Japanese isolates of bovine coronaviruses belonging to phylogenetically distinct genetic groups. *Arch. Virol.* 158, 1047-1053.a
- Kanno T, Hatama S, Ishihara R, Uchida I, 2007. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J Gen Virol.* 88,1218-24.b
- Kapil S, Pomeroy KA, Goyal SM, 1991. Experimental infection with a virulent pneumoenteric isolate of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest*, 3, 1, 88-9.
- Kapil S, Lamm CG, McVey DS 2008. Detection of bovine respiratory coronavirus in beef cattle. In: *Proceedings of the 27th annual meeting of the American Society of Virologists*. Cornell University, Ithaca, NY, July 15, . p. 9-1.
- Keck JG, Makino S, Soe LH, Fleming J.O., Stohlman, S.A. & Lai, M.M. 1987. RNA recombination of coronavirus. *Adv Exp Med Biol* 218, 99-107.
- Khalili M, Morshedi A, Keyvanfar H, Hemmatzadeh F 2006. Detection of bovine coronavirus by RT-PCR in a field study. *Veterinarski Arhiv*, 76, 4, 291-296
- Khalili M, Morshedi A, 2006. The first detection of bovine coronavirus in calves diarrhea in west of Iran. *Journal of Clinical Virology* 36, S24-S25. B
- King B, Potts BJ, Brian DA, 1985. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res.* 2, 53-59.

- Kin N, Miszczak F, Diancourt L, Caro V, Moutou F, Vabret A, Gouilh MA, 2016. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. *Infection, Genetics and Evolution* 40, 186–191
- Klauegger 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.
- Kubo H, Yamada YK, Taguchi F, 1994. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the aminoterminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 68, 5403–5410.
- Kuo L, Masters PS, 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol.* 77, 8, 4597-608.
- Lai MM, Cavanagh D, 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*, 48, 1-100.
- Lai MMC, Perlman S, Anderson LJ 2007. Coronaviridae. In Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.. pp. 1305-1335.
- Lau SKP, Woo PCY, Li KSM, Tsang AKL, Fan RYY, Luk HKH, Cai JP, Chan KH, Zheng BJ, Wang M, Yuen KY, 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.
- Lee G, Song J, Cho I, Yoon S, 2010. Cross-reactivity of vaccine and field strains of bovine coronaviruses in Korea. *J. Bacterian. Virol.* 40, 49-58.
- Li F, 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins, *Annu Rev Virol*, 29, 3, 1, 237–261.
- Liechester University Department of Microbiology and Immunology. Coronaviruses. Erişim: 20.10.2017, <http://www.microbiologybytes.com/virology/Coronaviruses.html>.
- Lin XQ, O'Reilly KL, Storz J, Purdy CW, Loan RW, 2000. Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. *Arch Virol* 145, 11, 2335-49.
- Lin XQ, O'Reilly KL, Burrell ML, Storz J. 2001. Infectivity-Neutralizing and Hemagglutinin-Inhibiting Antibody Responses to Respiratory Coronavirus Infections of Cattle in Pathogenesis of Shipping Fever Pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol*, 28, 357–362.
- Liu L, Hägglund S, Hakhverdyan M, Alenius S, Larsen LE, Belák S, 2006. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J Clin Microbiol*, 44, 3, 957-60.
- Lorusso A, Desario C, Mari V, 2009. Molecular characterization of a canine respiratory coronavirus strain detected in Italy. *Virus Res.* 141, 1, 96–100.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DE, Winton JR, 2017. *Fenner's Veterinary Virology*, Fifth edition, Elsevier/AP, pp 581.
- MacPherson LW, 1957. Bovine virus enteritis (winter dysentery). *Can J Comp Med Vet Sci* .21(6),184–92.
- Mahony JB. Coronaviruses. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Landry ML 2007. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press. pp. 1414-1423.
- Martinez N, Brandao PE, de Souza SP, Barrera M, Santana N, de Arce, HD, Perez LJ, 2012. Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. *Infect Genet Evol*, 12, 1870–1878.
- McIntosh, K., Dees, J.H., Becker, W.B., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M., 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 57, 933.
- McIntosh K, 2005. Coronaviruses in the limelight. *J Infect Dis* . 191, 4, 489-491.
- McIntosh K, Anderson LJ 2005. Coronaviruses, Including Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-associated Coronavirus. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. pp. 1990-2003.

- McNulty MS, Bryson DG, Allan GM, Logan EF, 1984. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Veterinary microbiology*, 9, 425-434.
- Mee JF, Geraghty T, O'Neill R, More SJ, 2012. Bioexclusion of diseases from dairy and beef farms: risks of introducing infectious agents and risk reduction strategies. *Vet J*.194,143–50.
- Menachery VD, Graham RL, Baric RS, 2017. Jumping species—a mechanism for coronavirus persistence and survival. *Current Opinion in Virology*, 23, 1–7.
- Mihindukulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D, 2008. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol* 82,5084–5088. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02722-07>.
- Millet JK, Whittaker GR, 2014. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research G Model*, 96461, 1–15,
- Millet JK, Whittaker GR, 2015. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research* 202, 120–134.
- Moya A, Holmes EC, Gonzalez CF, 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 4, 279-288.
- Murray GM, O'Neill RG, More SJ, McElroy MC, Earley B, Cassidy JP, 2016. Evolving views on bovine respiratory disease: An appraisal of selected key pathogens Part 1. *The Veterinary Journal*.1-32. <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.tvjl.2016.09.012>.
- Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, Kam J, Staropoli I, Crescenzo-Chaigne B, Escriou N, van der Werf S, Yuen KY, Altmeyer R 2005. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol*, 86, Pt 5,1423-34.
- Nash TC, Buchmeier MJ, 1997. Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and onendosomal pathways. *Virology*, 233, 1, 1–8.
- Näslund K, Tråvén 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. *Vet Microbiol*, 72, 3-4, 183-206.
- Niemann H, Geyer R, Klenk HD, Linder D, Stirm S, Wirth M 1984. The carbohydrates of mouse hepatitis virus (MHV) A59: structures of the O-glycosidically linked oligosaccharides of glycoprotein E1. *EMBO J*. 3(3),665-70.
- Ohlson, A., Alenius, S., Tråvén, M. & Emanuelson, U, 2013. A longitudinal study of the dynamics of bovine corona virus and respiratory syncytial virus infections in dairy herds. *Vet J*.
- Oma VS, Tråvén M, Alenius S, Myrmel M, Stokstad M 2016. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Oma et al. Virology Journal*, 13,100
- Park SJ, Jeong C, Yoon SS, Choy HE, 2006. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *J. Clin. Microbiol*, 44, 3178-3188.
- Park SJ, Kim GY, Choy HE, Hong YJ 2007. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch Virol*, 152, 1885-1900.
- Pasternak AO, Spaan WJ, Snijder EJ 2006. Nidovirus transcription:how to make sense? *J Gen Virol*. 87, Pt 6,1403-21.
- Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY, 2004. Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med*, 10, S88–S97
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA, 2006. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*, 4, e204.
- Plummer PJ, Rohrbach BW, Daugherty RA, Daugherty RA, Thomas KV, Wilkes RP, 2004. Effect of intranasal vaccination against bovine enteric coronavirus on the occurrence of respiratory tract disease in a commercial backgrounding feedlot. *J Am Vet Med Assoc*. 225,726–31
- Poissy J, Goffard A, Parmentier-Decrucq E, Favory R, Kauh M, Kipnis E, Mathieu D, van der Werf S, Guery B, 2014. Kinetics and pattern of viral excretion in biological specimens of two MERS-CoV cases. *J Clin Virol*. 61,275–8.

- Popova R, Zhang X, 2002. The Spike but Not the Hemagglutinin/Esterase Protein of Bovine Coronavirus Is Necessary and Sufficient for Viral Infection. *Virology* 294, 222–236.
- Pyrck K, Berkhout B, van der Hoek L, 2007. Antiviral strategies against human Coronaviruses. *Infectious disorders- drug targets*. 7, 59-66.
- Raamsman MJ, Locker JK, de Hooge A, de Vries AA, Griffiths G, Vennema H, 2000. Characterization of the coronavirus Mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *J Virol* 74, 5, 2333-42.
- Reshi ML, Su YC, Hong JR, 2014. RNA viruses ROS-mediated cell death. *Int J Cell Biol*, 467452 .
- Reynolds DJ, Debney TG, Hall GA, 1985. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts in calves. *Arch Virol*, 85, 1–2, 71–83.
- Ruch TR, Machamer CE, 2012. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses*, 4, 363-382
- Saif LJ, 1993. Coronavirus immunogens. *Veterinary Microbiology*, 37, 285-297.
- Saif LJ, 2010. Bovine Respiratory Coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 26, 2, 349–364.
- Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD, Theil KW, 1986. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res*, 47,1426–32.
- Saif LJ, Brock KV, Redman DR, Kohler EM, 1991. Winter dysentery in dairy herds, electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet Rec*, 128, 447-449.
- Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol*. 81(1),20-9.
- Scott P, 2018. Respiratory disease in dairy and beef rearer units, https://healthdocbox.com/Cold_and_Flu/76582902-Respiratory-disease-in-dairy-and-beef-rearer-nits.html
- Siddell S, Wege H, Ter Meulen V 1983. The Biology of Coronaviruses, *J Gen Virol*. 64,761–76.
- Smith, E.C. & Denison, M.R. 2012. Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses. *Curr Opin Virol*, 2, 5, 519-24.
- Stair, E.L., Rhodes, M.B., White, R.G. & Mebus, C.A. 1972. Neonatal calf diarrhea: purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res*, 33, 6, 1147-56.
- Statista, The Statistic Portal. 2018. Erişim tarihi: 13 Kasım 2018, Erişim adresi: <https://www.statista.com/statistics/263979/global-cattle-population-since-1990/>
- Storz J. Respiratory disease of cattle associated with coronavirus infections. In:Howard JL, Smith RA, 1998. *Current veterinary therapy: food animal practice 4*. Philadelphia: WB Saunders. 291–3.
- Takahashi, E., Inaba, Y., Sato, K., Ito, Y., Kurogi, H., Akashi, H., Satoda, K. & Omori, T. 1980. Epizootic Diarrhea of Adult Cattle Associated with a Coronavirus-Like Agent. *Vet Microbiol* 5, 2, 151-154.
- Takiuchi E, Alfieri AF, Alfieri AA, 2008. Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. *Braz J Med Biol Res*, 41, 277–282
- Thomas CJ, Hoet AE, Sreevatsan S, Wittum TE, Briggs RE, Duff VRC, Saif LJ, 2006. Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. *Am J Vet Res*. 67,1412–20.
- Timurkan MÖ, Aydın H, Belen S 2015. Erzurum Bölgesinde Sığırlarda Respiratorik Coronavirus Enfeksiyonunun RT-PCR ile Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 10, 3, 186-192.
- Trávén M, Näslund K, Linde N, Linde B, Silván A, Fossum C, Hedlund KO, Larsson B, 2001. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV -- comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet Microbiol*, 81, 2, 127-51.
- Tsunemitsu M, Yonemichi H, Hirai T, Kudo T, Oneo S, Mort K, Shimizu M, 1991. Isolation of bovine coronavirus from feces and swabs of calves with diarrhea. *J Vet Med Sci*, 53, 3,433-437.
- Tsunemitsu H, Saif LJ, 1995. Antigenic and Biological Comparisons of Bovine Coronaviruses Derived from Neonatal Calf Diarrhea and Winter Dysentery of Adult Cattle - Brief Report. *Archives of Virology* 140, 1303-1311.
- Ulaşlı M, Bayraktar R, Bozgeyik İ 2013. Coronavirüslerin replikasyonları. *Gaziantep Tıp Derg.* 19(3), 141-148.

- Valle, M.B., Batista, E.R., Martell, A.B., Lepuroux, M.T.F. & Brandao, P. 2006. Short communication. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4(3), 221-224.
- Wernery U, Lau SKP, Woo PCY, 2017. Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus and dromedaries. *The Veterinary Journal* 220, 75–79.
- Veterinary Virology, Third Edition. Frederic A. Murphy, E. Paul J. Gibbs, Marian C. Horzinek, Michael J. Studdert. Vijgen, L., Keyaerts, E., Moes, E., Thoelen, I., Wollants, E., Lemey, P., Vandamme, M.A., Van Ranst, M., 2005. Complete genomic sequence of humancoronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.* 79, 1595–1604.
- Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, 2006. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. *J Virol.* 80, 7270–4.
- White DO, Fenner FJ, 1994. *Medical Virology*. 4th ed. California: Academic Press Inc.
- Wissink EH, Kroese MV, Maneschijn-Bonsing JG, Meulenberg JJ, van Rijn PA, Rijsewijk FA. 2004. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *J Gen Virol.* 85(Pt 12), 3715-23.
- Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY, 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(10), 1117-27.
- Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. 2012. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol* 86:3995–4008. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06540-11>.
- Yavru S, Yapici O, Kale M, Sahinduran S, Pehlivanoglu F, Albay MK, Avcı O, 2016. Bovine coronavirus (BoCV) infection in calves with diarrhoea and their dams. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44, 01-07.
- Yildirm Y, Dagalp SB, Tan MT, Kalaycioglu AT, 2008. Seroprevalance of the Rotavirus and Corona Virus Infections in Cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7 (10):1320-1323.
- Yoo, D., and D. Deregt, 2001. A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 297–302.
- Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 367, 1814–1820.
- Zhang, X. M., Herbst, W., Kousoulas, K. G. & Storz, J. 1994. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *J Med Virol* 44, 152–161.
- Zhang, X.W., Yap, Y.L. & Danchin, A. 2005. Testing the hypothesis of a recombinant origin of the SARS-associated coronavirus. *Arch Virol* 150(1), 1-20.
- Zhang X, Hasöksüz M, Spiro D, Halpin R, Wang S, Stollar S, Janies D, Hadya N, Tang Y, Ghedin E, Saif L 2007a. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated Coronaviruses, Transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Respiratory Coronavirus. *Virology.* 358 (2), 424-435.a
- Zhang X, Hasoksuz M, Spiro D, Halpin R, Wang S, Vlasova A, Janies D, Jones LR, Ghedin E, Saif LJ 2007b. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology* 363, 1 –10.b
- Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, Wynne JW, Xiong Z, Baker ML, Zhao W, 2013. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science*, 339, 456-460.
- Zhou P, Tachedjian M, Wynne JW, Boyd V, Cui J, Smith I, Cowled C, Ng JH, Mok L, Michalski WP, 2016. Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN α in bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 2696-2701.

7.EKLER

EK A: Etik Kurul Belgeleri



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI



Toplantı Tarihi	26.08.2016	Toplantı Sayısı	2016/08	Karar Sayısı	2016/76
<p>S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK tarafından sunulan "Solunum yolu enfeksiyonu klinik belirtileri gösteren sığırlarda Bovine Coronavirus (BCoV) enfeksiyonlarının PCR tekniği ile araştırılması" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.</p> <p>Bu çalışmada, alınan örneklerde Bovine Coronavirus (BCoV) antijen varlığının PCR tekniği ile inceleneceği, coronavirus prevalansının değerlendirilmesinin yapılacağı, ayrıca solunum yolu örnekleme yapılan hayvanlardan, kan örnekleme de yapılarak hayvanların BCoV yönünden serolojik durumlarının da ortaya konulmasının amaçlandığı ifade edilmektedir.</p> <p>Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "Uygun olduğuna" oy birliği ile karar verilmiştir.</p>					
 Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan		 Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı			
 Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye		 Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye			
Doç. Dr. Mustafa GARİP Üye (Kabilmadı)		 Ayşegül KURTBEYOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi		 Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye	

8. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Aksaray’da doğdu. 2003 yılında Lise öğrenimini Isparta Gazi Lisesi’nde tamamladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2009 tarihinde mezun oldu. Şubat 2012 tarihinde doktora eğitimine Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’nda başladı. Ceren Hayvan Sağlığı Laboratuvarı’nda Sorumlu Yönetici olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.

