



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BUZAĞILARDA ENTERİK CALİCİVİRUS (BEC) ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

İlke KARAYEL

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feray ALKAN**

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BUZAĞILARDA ENTERİK CALİCİVİRUS (BEC)
ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ**

İlke KARAYEL

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feray ALKAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
13L3338011 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2016**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Buzağılarda Enterik Calicivirus (BEC) Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İlke KARAYEL

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalında
İlke KARAYEL tarafından hazırlanan
“Buzağılarda Enterik Calicivirus (BEC) Enfeksiyonlarının Moleküler
Epidemiyolojisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ
olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkan

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır

İmza

Prof. Dr. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.1.1. Calicivirusların Yapısı	4
1.1.1.1. BoNoV'ların Yapısı	5
1.1.1.2. BoNoV'un Sınıflandırılması	8
1.1.1.3. Nebovirusların Yapısı	9
1.1.1.4. Nebovirusların Sınıflandırılması	11
1.2. Zoonotik Potansiyel ve Rekombinasyon	12
1.3. Epidemiyoloji	16
1.4. Bulaşma	19
1.5. Klinik Bulgular ve Patogenez	20
1.6. İmmunoloji	23
1.7. Tanı	26
1.8. Korunma	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Gereç	30
2.1.1. Gaita örnekleri	30
2.2. Yöntem	31
2.2.1. Gaita Örneklerinin Hazırlanması	31
2.2.2. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	32
2.2.3. BEC Tanısı için PCR Tekniği	33
2.2.4. Gaita Örneklerinin Diğer Enteropatojenler Yönünden Test Edilmesi	34
2.2.5. BEC Kapsit Gen bölgesinin RT-PCR Tekniği ile Tespit Edilmesi	35
2.2.5.1. BoNoV Kapsit Gen bölgesinin RT-PCR Tekniği ile Tespit Edilmesi	35
2.2.5.1.1. Viral RNA'nın Revers Transkripsiyonu	35
2.2.5.1.2. BoNoV Kapsit Bölgesi için PCR Tekniği	36
2.2.5.2. Nebovirus Kapsit Gen bölgesinin RT-PCR Tekniği ile Tespit Edilmesi	37
2.2.5.2.1. Viral RNA'NIN Revers Transkripsiyonu	37
2.2.5.2.2. Nebovirus Kapsit Bölgesi için PCR Tekniği	38
2.2.6. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforezi	39
2.2.7. Dizin Analizi	39
2.2.8. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
2.2.9. Filogenetik Analiz ve Rekombinasyon Analizi	40
2.2.10. İstatiksel Analiz	40
3. BULGULAR	41
3.1. BEC tanısı için PCR sonuçları	41
3.2. Gaita Örneklerinin Diğer Enteropatojenler Yönünden Test Sonuçları	44

3.3.	BEC’lerin Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Sonuçları	45
3.4.	Dizin Analizi Sonuçları	45
3.4.1.	RdRp Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçları	47
3.4.2.	Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçları	53
3.4.2.1.	BoNoV Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçları	53
3.4.2.2.	Nebovirus Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçları	59
4.	TARTIŞMA	67
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	79
	ÖZET	83
	SUMMARY	84
	KAYNAKLAR	85
	EKLER	95
	EK-1 Etik Kurul Kararı	95
	ÖZGEÇMİŞ	97



ÖNSÖZ

Yeni doğan buzağı ishalleri, birçok enfeksiyöz etken yanı sıra, çevresel koşullar, bakım ve beslenme, vb. nedenlerle değişen şiddette görülebilen ve önemli ölçüde ölümlle sonuçlanabilen bir hastalıktır. Grup A Rotaviruslar (RVA) ve Bovine Coronaviruslar (BCoV) yanı sıra son zamanlarda, Caliciviridae familyasında yer alan Bovine Enterik Caliciviruslar da (BEC) (Bovine Noroviruslar ve Neboviruslar) yeni doğan buzağı ishallerinden sorumlu viruslar olarak sıklıkla saptanmaktadır. Bu bağlamda, farklı ülkelerde sığır popülasyonunda BEC'lerin varlığı ve yaygınlığının araştırılması, biyolojik ve genetik özelliklerinin incelenmesi, enfeksiyonun tanısı ve korunma amaçlı biyolojik ürünlerin geliştirilmesi gibi konular birçok araştırmanın konusu olmaktadır.

Bu çalışmada da, Türkiye'nin farklı illerinde yerleşik işletmelerde bulunan buzağılarda gözlenen ishal olgularında BEC'lerin olası etiyolojik ajan olarak sorgulanması, saha suşlarının moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi ve enfeksiyonun epidemiyolojisiyle ilgili bazı bilgilerin kazanımı hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, her konuda yardım ve desteğini aldığım, bilgisi deneyimleri ve görüşleriyle bana yol gösteren, özveri ve sabrını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Feray Alkan'a, lisansüstü eğitimim süresinde emeği geçen, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz Akça ve Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Aykut Özkul, Prof. Dr. Seval Bilge-Dağalp, Prof. Dr. M. Taner Karaoğlu ve Prof. Dr. T. Çiğdem Oğuzoğlu ile tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan Yardımcı'ya; tez çalışmam süresince bana yardımlarını esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Serpil Nalbantoğlu'na ve istatistik analizlerini büyük bir özveriyle yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Ufuk Kaya'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmam öncesi ve süresince bu çalışmaya büyük katkıda bulunan, Bari Üniversitesi Veteriner Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı

öğretim üyesi Prof. Dr. Vito Martella ve Budapeşte Veteriner Araştırma Enstitüsü ‘Yeni Patojen Keşfi’ bölüm başkanı Dr. Krisztian Banyai’ye çok teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam boyunca birlikte görev yaptığım ve tez çalışmam sırasında laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm ve bana yardımlarını esirgemeyen tüm araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Hem laboratuvar ortamında hiç bir yardımı esirgemeyen hem de bu süreçte bana gösterdiği sonsuz sabrı, anlayışı, desteği ve koşulsuz sevgisi için Sabri Hacıoğlu’na ve hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmam sırasında beni bütün kalpleriyle destekleyen aileme minnet ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı ve 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında burs desteği sağlayan TÜBİTAK-BİDEB’e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Müdürlüğü’nün 13L3338011 proje numarası ile desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BCoV	Bovine Coronavirus
BEC	Bovine Enterik Calicivirus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BoNoV	Bovine Norovirus
bp	Baz çift, Base Pair
BRV	Bovine Rotavirus
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Phosphate
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EM	Elektron Mikroskop
g	Gram
G	Genogrup
HBGA	Histo-blood Group Antigen (Doku-kan grup antijen)
IEM	İmmonelektron mikroskopi
IgA	İmmunoglobulin A
IgG	İmmunoglobulin G
kb	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
ml	Mililitre
mLT	Mutant <i>E. coli</i> Heat-Labile Toxin
MuNoV	Murine Noroviruslar
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation
NCBI	National Center Biotechnology Information
nm	Nanometre
NoV	Norovirus
NS	Non-Structural

nt	Nükleotit
�C	Santigrad
ORF	Open Reading Frame (A�ık Okuma �er�evesi)
P	Protruding
PBS	Phosphate Buffer Saline
polyA	Poliadenil
qRT-PCR	Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RVA	Rotavirus A
S	Sedimentasyon katsayısı
S	Kabuk
s	Saniye
SPIEM	Solid Faz İmmunoelektron Mikroskopi
SRSV	Small Round-Structured Virus
ssRNA	Tek iplik�ikli RNA
T	Triangulation Sayısı
TAE	Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
UTR	Untranslated Region (�evrilmeyen Bölge)
VLP	Virus-like Particles
VP	Viral Protein
VPg	Viral protein g
xg	G-force
�g	Mikrogram
�l	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Caliciviridae</i> ailesi	2
Şekil 1.2. Norovirus ve Nebovirusların genom yapısı	6
Şekil 3.1. BoNoV onestep-RT-PCR ve nested-PCR sonucu jel görüntüleri	41
Şekil 3.2. Nebovirus onestep-RT-PCR ve nested-PCR sonucu jel görüntüleri	41
Şekil 3.3. BoNoV ve Nebovirus tam kapsit gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüleri	45
Şekil 3.4. BoNoV RdRp gen bölgesi filogenetik analizi	48
Şekil 3.5. Yerel suşların RdRp gen bölgesi yönünden kendi aralarında ve prototip viruslar Bo/Jena/80/DE ile Bo/Newbury2/76/UK ile olan nükleotit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu	49
Şekil 3.6. Nebovirus RdRp gen bölgesi yönünden filogenetik analizi	51
Şekil 3.7. Nebovirus RdRp gen bölgesi yönünden pozitif bulunan örneklerin kendi aralarında ve diğer Nebovirusların RdRp gen bölgeleri yönünden nükleotit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu	52
Şekil 3.8. BoNoV tam kapsit gen bölgesi yönünden pozitif bulunan örneklerin kendi aralarında ve diğer BoNoV'ların kapsit gen bölgesi yönünden nükleotit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu	54
Şekil 3.9. BoNoV tam kapsit gen bölgesi yönünden pozitif bulunan örneklerin kendi aralarında ve diğer BoNoV'ların kapsit gen bölgesi yönünden aminoasit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu	55
Şekil 3.10. BoNoV tam kapsit gen bölgesi yönünden filogenetik analizi	56
Şekil 3.11. BoNoV kısmi kapsit gen bölgesi yönünden filogenetik analizi	57
Şekil 3.12. GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K056 için Simplot analizi	58
Şekil 3.13. GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K060 için Simplot analizi	58
Şekil 3.14. Bo/AnkaraA4/14/TUR ve Bo/AksarayK056/08/TUR'un kendi aralarında ve diğer Nebovirusların kapsit gen bölgesi yönünden nükleotit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu	60
Şekil 3.15. Bo/AnkaraA4/14/TUR ve Bo/AksarayK056/08/TUR'un kendi aralarında ve diğer Nebovirusların kapsit gen bölgesi yönünden aminoasit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu	61

Şekil 3.16. Nebovirus kapsit gen bölgesi yönünden filogenetik analiz	63
Şekil 3.17. Kapsit gen bölgesinin en değişken bölgesi olarak kabul edilen 288-420 aminoasitlerin bulunduğu bölgeye tekabül eden P2 domaini dikkate alınarak yapılan aminoasit dizini karşılaştırması	64
Şekil 3.18. Bo/AksarayK056/08/TUR için SimPlot analizi	65
Şekil 3.19. Bo/AnkaraA4/14/TUR için SimPlot analizi	66



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Entansif işletmeler ve örneklenen buzağılara ilişkin bilgiler	30
Çizelge 2.2.	Küçük aile işletmeleri ve örneklenen buzağılara ilişkin bilgiler	31
Çizelge 2.3.	RdRp gen bölgesi tespitinde kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri	33
Çizelge 2.4.	OneStep-RT-PCR birinci tur miks bileşenleri ve programı	33
Çizelge 2.5.	Nested-PCR miks bileşenleri ve programı	34
Çizelge 2.6.	cDNA sentezi için kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüler	35
Çizelge 2.7.	BoNoV kapsit gen bölgesi tespitinde kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri	36
Çizelge 2.8.	RT-PCR miks bileşenleri ve programı	36
Çizelge 2.9.	RT-PCR miks bileşenleri ve programı	37
Çizelge 2.10.	cDNA sentezi için kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüler	38
Çizelge 2.11.	Nebovirus kapsit gen bölgesi tespitinde kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri	38
Çizelge 2.12.	RT-PCR miks bileşenleri ve programı	38
Çizelge 3.1.	Entansif işletmelerde yetiştirilen buzağılara ilişkin test sonuçları	42
Çizelge 3.2.	Küçük aile işletmelerinde yetiştirilen buzağılara ilişkin test sonuçları	43
Çizelge 3.3.	BEC, BoNoV ve Nebovirus pozitif bulunan örneklerin yaş dağılımı	43
Çizelge 3.4.	BEC, BoNoV ve Nebovirus pozitif bulunan örneklerin mevsimsel dağılımı	44
Çizelge 3.5.	Örneklenen buzağılarda BEC ve diğer enteropatojenlere ilişkin sonuçlar	44
Çizelge 3.6.	BoNoV ve Nebovirus suşlarının Gen Bankası “accession” numaraları	46

1. GİRİŞ

Yeni doğan buzağı ishalleri tüm dünyada gözlenen en önemli hastalıklardan olup, yeni doğan buzağının gelişim gerilikleri ve ölümlerinde önemli rol oynamaktadır (Bartels ve ark., 2010 ve Cho ve ark., 2013). Bu gibi durumlar doğrudan ya da dolaylı olarak ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Cho ve Yoon, 2014). Önemli ekonomik kayıplara neden olan bu hastalık virus, bakteri, protozoon gibi birçok enfeksiyöz ajandan kaynaklanabildiği gibi, çevresel koşullar, bakım ve beslenme de bu hastalığa neden olabilmektedir. Enfeksiyöz ajanlar tek başlarına bu hastalığa sebep olabildikleri gibi birden fazla enfeksiyöz ajanın tespit edilebildiği miks enfeksiyonlara da sıklıkla rastlanılmaktadır (Crouch ve ark., 2001). Her bir patojen ile oluşan enfeksiyonun prevalansı ve hastalığın insidensi bölgeden bölgeye, çiftliklerin yönetim sistemine ve sürü büyüklüğüne göre farklılık göstermektedir (Cho ve Yoon, 2014).

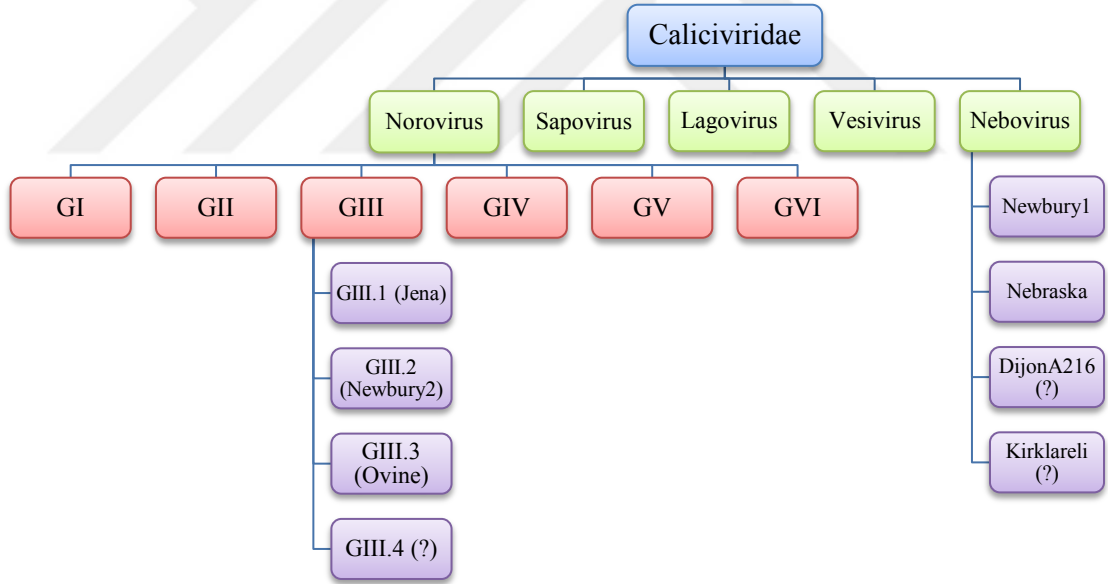
Besi ve süt sığırcılığı günümüzde sürü yönetimi, hayvanların bakım ve beslenmesi, uygun korunma ve sağaltım yöntemlerinin kullanımı gibi konularda oldukça ileri düzeyde olmasına rağmen buzağı ishalleri genel bir problem olmaya devam etmektedir. Bunun en önemli sebebi ise, buzağı ishallerinin birçok değişkene bağlı olarak ortaya çıkması, yani multifaktoriyel olmasıdır. Buzağı ishallerini önleyebilmek için, hastalığın ortaya çıkışının, birçok enfeksiyöz etken tarafından oluşturulması, miks enfeksiyonların varlığı, çevresel faktörler, sürü yönetimi ve beslenme gibi çok değişkenli bir denkleme sahip olduğunun iyi anlaşılması gereklidir (Cho ve Yoon, 2014).

Yeni doğan buzağı ishallerine sebep olan enfeksiyöz etkenlerin en başında Bovine Rotavirus Grup A (BRV) gelmektedir. Bunu *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*), Bovine Coronaviruslar (BCoV) ve *E. coli* takip etmektedir (Crouch ve ark., 2001). Ancak günümüzde halen birçok klinik vakanın etiyolojisi tespit edilememektedir (Milnes ve ark., 2007). Tüm bu etkenlere ek olarak son zamanlarda, *Caliciviridae* familyasında yer alan genogrup III (GIII) Noroviruslar (NoV) ve

Neboviruslar da yeni doğan buzağı ishallerinden sorumlu ajanlar olarak ele alınmaktadır (Cho ve Yoon, 2014).

1.1. Etiyoloji

Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi'nin 2012'de yayımlanan dokuzuncu raporuna (9th Report of International Committee on Taxonomy of Viruses) göre, *Caliciviridae* ailesi, "Norovirus, Sapovirus, Lagovirus, Vesivirus ve Nebovirus" genuslarından oluşmaktadır (Clarke ve ark. 2012 s: 977-986 ve Kroneman ve ark., 2013). Bu cinslerden yalnızca genogrup III NoV'lar ve Neboviruslar buzağı ishallerinden sorumludurlar ve "Bovine Enterik Caliciviruslar (BEC)" olarak tanımlanmaktadır (Di Martino ve ark., 2011 ve Oliver ve ark., 2003).



Şekil 1.1. *Caliciviridae* ailesi

NoV'lar ilk olarak 1968 yılında, Norwalk, Ohio'da insanlardaki bir gastroenterit salgınında keşfedilmiştir. Bu salgının etiyolojik ajanı olarak saptanan NoV, "Norwalk virus" olarak adlandırılmış ve insan NoV'ların prototip suşu olarak tanımlanmıştır (Kapikian, 2000). Norwalk virus 1972 yılında, elektron mikroskopi (EM) ile görüntülenmiştir (Kapikian ve ark., 1972). Aynı zamanlarda *Caliciviridae*

ailesi de oluşturulmuştur (Matthews, 1979). Hem Norwalk virusun hem de Rotavirusun enterik viruslar olarak keşfedilmesi ve bunların EM'deki görüntüleri birçok enterik virusun “Small Round-Structured Virus (SRSV)” adı altında tanımlanmalarına neden olmuştur (Kapikian ve ark., 1972; Bishop ve ark., 1974). 1990'lı yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesiyle SRSV adlandırması yerine, “Norwalk-like viruslar” (günümüzdeki NoV) ve “Sapporo-like viruslar” (günümüzdeki sapovirus ve astrovirus) adlandırmalarının kullanımı benimsenmiştir (Scipioni ve ark., 2008).

EM kullanılarak domuz ve sığırlara ait dışkı örneklerinden tipik calicivirus morfolojisine sahip birçok virus keşfedilmiştir. Bovine Norovirus (BoNoV) genotiplerinden biri olan ve Oliver ve ark. (2007a) tarafından moleküler karakterizasyonu yapılan “Newbury Agent 2 (Newbury2)” ilk olarak 1978 yılında İngiltere'de ishalleri bir buzağıda saptanmıştır (Woode ve Bridger, 1978). Bir diğer genotip olan ve 1980 yılında Almanya'da izole edilen (Günther ve Otto, 1987) “Jena”nın ise 1999 yılında moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (Liu ve ark., 1999). Ando ve ark. (2000) kısmi kapsit gen bölgesi analizine göre bu iki virusun iki ayrı genetik kümede (cluster) yer aldığı yönündeki görüşünü bildirmiş, daha sonra bu görüş Oliver ve ark. (2003) tarafından kapsit gen bölgesinin tam genom analiziyle ilgili bilgiler ile kanıtlanmıştır. Bu iki virus Norovirus genusunda Genogrup III içerisinde yer almaktadır (Dastjerdi ve ark., 1999; Liu ve ark., 1999 ve Oliver ve ark., 2003).

Tanımlanan diğer iki Bovine Enterik Calicivirus ise “Newbury Agent 1 (Newbury1)” ve “Nebraska” suşlarıdır. Newbury1, Newbury2 ile birlikte 1978 yılında İngiltere'de ishalleri bir buzağıdan saptanmıştır (Woode ve Bridger, 1978). EM, çapraz koruma çalışmaları ve solid faz immuno-elektron mikroskopisi (SPIEM) sonrasında elde edilen bulgular Newbury1'in Newbury2'den farklı bir virus olduğunu ortaya koymuş olup, virus 1984 yılında karakterize edilmiştir (Bridger ve ark., 1984; Dastjerdi ve ark., 1999 ve Woode ve Bridger, 1978). Nebraska suşu ise 1980 yılında Amerika'da tespit edilmiş ve moleküler karakterizasyonu Smiley ve ark. (2002) tarafından yapılmıştır. Bu iki virus Neboviruslar içerisinde filogenetik

olarak iki ayrı “*clade*” oluşturmaktadır (Oliver ve ark., 2006a ve Smiley ve ark., 2002).

1.1.1. Calicivirusların Yapısı

Caliciviruslar isimlerini elektron mikroskopi altındaki karakteristik “fincan-şekilli” görüntülerinden almışlardır (Clarke ve Lambden, 1997). *Caliciviridae* ailesi içerisindeki viruslar, ikozahedral simetriye sahip zarfsız viruslardır (Green ve ark., 2000). Negatif boyalı EM’de yaklaşık 27-40 nm ve cryo-EM’de ise, yaklaşık 35-40 nm çapında gözlenmektedirler. Kapsit, T=3 ikozahedral kafes üzerinde yerleşmiş ana yapısal protein olan VP1’in 90 dimerinden oluşmuştur (Chen ve ark., 2004). Calicivirus kapsit yapısının karakteristik bir özelliği, her beşli ve üçlü eksenindeki 32 fincan-şekilli çöküntülerdir (Clarke ve Lambden, 1997). Negatif boyamalı preparatlarda, bazı fincan-şekilli çöküntüler tek tek ve iyi bir şekilde görülebilirken, diğer boyamalarda bu çöküntüler daha az belirgindir (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986). Bu özellikler *Caliciviridae* ailesi içerisinde yer alan farklı genuslar arasında bazı yapısal varyasyonlar göstermektedir (Chen ve ark., 2004).

Virionun moleküler kütlesi yaklaşık 15×10^6 ’dır. Yüzme dansitesi, CsCl içinde 1,33-1,41 g/cm⁻³, gliserol-potasyum tartarat gradientleri içerisinde ise 1,29 g/cm⁻³ arasındadır. Virionun sedimentasyon katsayısı ise 170-187 S’dir. Genel olarak, caliciviruslar doğada oldukça stabildirler ve birçok suş eter, kloroform gibi kimyasal maddeler ve ısı inaktivasyonuna karşı dirençlidirler (Clarke ve ark. 2012 s: 977-986).

Genom yaklaşık 7.4-8.3 kb büyüklüğünde, pozitif polariteli, lineer tek iplikçilikli ssRNA’dan oluşur (Green, 2013, s:583–609). VPg (10-15 kDa) proteini, genomik RNA’nın 5' ucuna kovalent bağlarla bağlanmış ve 3' ucu ise poliadenile (polyA) haldedir (Clarke ve Lambden, 1997; Clarke ve ark., 2012 s: 977-986 ve Oliver ve ark., 2006a). Caliciviruslar 5' ucunda ve yapısal/yapısal olmayan proteinleri kodlayan dizinlerin birleşim yerlerinde korunaklı nükleotit motiflerine sahiptirler (Clarke ve Lambden, 2000). Subgenomik RNA (2.2-2.4 kb) hücre

içerisinde sentezlenir ve bu da VPg ile bağlıdır. Birçok calicivirus için gen düzeni, ekspresyon ve in vitro transkripsiyon çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986).

Calicivirüslerde genom en az iki ya da üç ORF (Açık Okuma Çerçevesi, Open Reading Frame) içerecek şekilde organize olmuştur. Lagovirüsler, Sapovirüsler ve Nebovirüsler iki ORF içerirken, Vesivirüsler ve Norovirüsler üç ORF içermektedirler (Clarke ve Lambden, 2000).

Tüm yapısal olmayan proteinler, büyük bir poliprotein olarak kodlanır ve her bir genus için aynı sırayla eksprese edilir. Poliproteinin parçalanması, genuslar içinde değişiklik gösteren viral sistein proteaz tarafından düzenlenir ancak, yapısal olmayan proteinlerin gen düzeni genuslar için aynıdır (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986; Karst ve ark., 2015). Lago-, Sapo- ve Nebovirüslerde ise, ORF1 yapısal olmayan proteinleri ve temel kapsit proteinini (VP1) kodlarken; ORF2 minör yapısal proteini (VP2) kodlamaktadır. Vesi- ve Norovirüslerde ise, VP1 ayrı bir ORF olan ORF2 tarafından kodlanırken, VP2 ORF3 tarafından kodlanır (Clarke ve Lambden, 2000). Tüm genuslarda, yapısal proteinler olan VP1 ve VP2, replikasyon boyunca, genomun 3' ucuyla sonlanan, çok sayıda subgenomik RNA'dan üretilir (Karst ve ark., 2015). Virionlar, yoğun olarak major kapsit proteini olan VP1'den oluşurlar (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986).

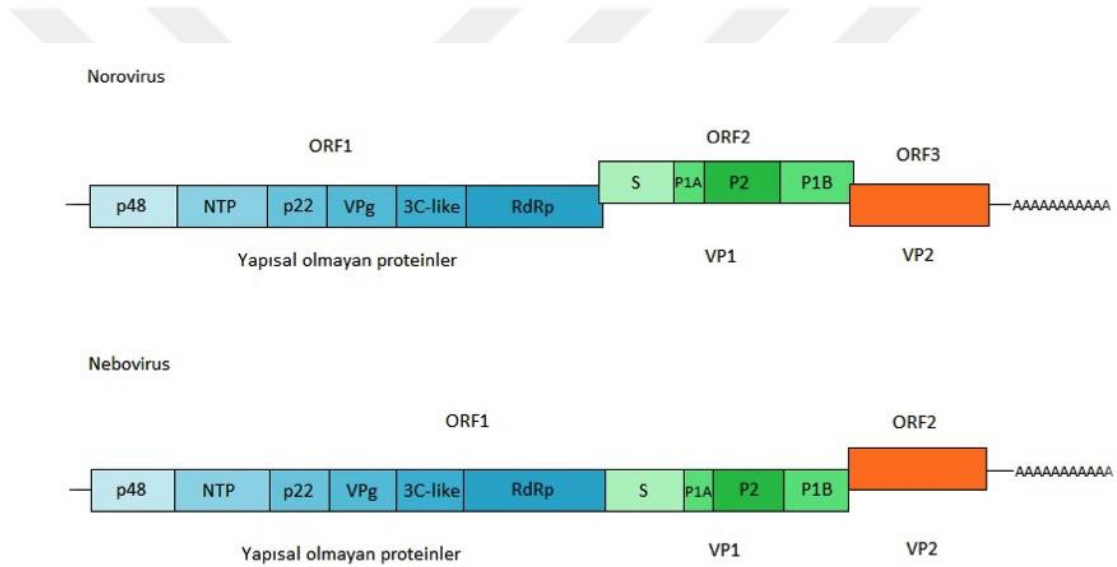
1.1.1.1. BoNoV'ların Yapısı

NoV genomu yaklaşık 7.5 kb büyüklüğündedir ve murine norovirüsler (MuNoV) hariç üç adet ORF içermektedir (Şekil 1.2). MuNoV'da ise dördüncü alternatif bir ORF bulunmaktadır (Thorne ve Goodfellow, 2014).

BoNoV genomu ise 7.3-7.5 kb büyüklüğündedir (Liu ve ark., 1999 ve Oliver ve ark., 2007a). 5' ucunda, genoma kovalent olarak bağlı, VPg olarak adlandırılan virus tarafından kodlanan bir viral protein bulunmaktadır (Scipioni ve ark., 2008 ve

Thorne ve Goodfellow, 2014). 5' uçta bulunan UTR (evrilmeyen Bölge, Untranslated Region) ise tüm NoV genomlarında yaklaşık 5-78 nükleotit uzunluğundadır (Di Felice ve ark., 2016). 3' ucu ise poliadenile (PolyA) halledir (Thorne ve Goodfellow, 2014).

NoV'lar, ribozomal giriş bölgesine ve "Cap" yapısına sahip değildirler ancak, genomlarının N-terminal ucunda, VPg bulunmaktadır. Yapılan in vitro alışmalar VPg'nin protein-protein etkileşmeleri yoluyla translasyon komponentleriyle ilişki içerisinde olduğunu ve NoV RNA'sının translasyonunu başlatmada önemli rol oynadığına işaret etmektedir (Scipioni ve ark., 2008).



Şekil 1.2. Norovirus ve Nebovirusların genom yapısı

Genomik RNA'nın 5' ucundaki ORF1 yaklaşık 195 kDa büyüklüğünde poliprotein kodlamakta ve bu poliprotein, "3C-like" viral proteinaz ile en az 6 yapısal olmayan proteine ayrılmaktadır (Thorne ve Goodfellow, 2014 ve Zheng ve ark., 2006). Bu proteinler; N-terminal yapısal olmayan protein NS1-2 (p48 ya da N-term) (intraseküler protein transferinde rol oynar), NS3 nükleosit trifosforaz (NTPase ya da 2C-like)/RNA helikaz, NS4 protein (p22 ya da 3A-like) (seküler membran trafiğinde ve replikasyon komplekslerinde yer alır), NS5 protein (VPg), NS6 proteinaz (3C-like) ve NS7 RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp ya da 3D-pol) 'dir (Liu ve ark., 1999; Scipioni ve ark., 2008 ve Thorne ve Goodfellow, 2014).

ORF 2 ise yaklaşık 55-60 kDa boyutunda VP1 major kapsit proteinini kodlar (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986 ve Liu ve ark., 1999). Bunun dışında, kendini oluşturma (self-assembly) ve kapsit formasyonu reseptörlerin tanınması, konakçı spesifitesi, suşların tayini ve immunojenisite gibi fonksiyonları vardır (Chen ve ark., 2004). X-ray kristallografi çalışmaları kapsit proteininin (VP1) Kabuk (S) ve çıkıntılı Protruding (P) olmak üzere iki temel *domain*'den oluştuğunu göstermektedir (Prasad ve ark. 1999). S domaini RNA'yı sararak kapsitin iç kısmını oluştururken P domaini kabuk bölgesinden çıkan yay benzeri çıkıntılardan meydana gelmektedir (Green, 2013, s:583–609). P domaini, P1A, P1B ve P2 olarak adlandırılan alt domainlere ayrılır (Rohayem ve ark., 2005). S *domain*'i oldukça korunaklı olmasına rağmen, P1 orta düzeyde korunaklı, P2 ise oldukça değişkendir (Chen ve ark., 2004 ve Tan ve ark., 2004). Önemli yapısal varyasyonlar özellikle, P1 ve P2 alt ünitelerinden oluşan P domaininde bulunmaktadır (Di Felice ve ark., 2016). P2 NoV kapsitinin en değişken domainidir ve kapsitin dış kısmında lokalize olduğundan, bağırsak hücrelerinin yüzeyinde bulunan hücre reseptörüne bağlanmasında görev almakta ve immünolojik özellikleri taşımaktadır (Tan ve ark., 2004 ve Zheng ve ark., 2006). ORF3 ise genomun 3' ucunda yer alır ve küçük minor yapısal proteini (VP2) kodlar. VP2 yaklaşık 20 kDa büyüklüğünde olup, VP1 kapsit proteininin yapımında ve stabilitesinin sağlanmasında görev almaktadır (Bertolotti-Ciarlet ve ark., 2003).

Hayvanlarda enfeksiyon oluşturan NoV'ların reseptörleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak insan NoV için karbonhidrat ilişkili doku-kan grup antijenlerinin (HBGA) reseptör ya da ko-reseptör olabileceği belirlenmiştir (Tan ve Jiang, 2014). Bunun yanı sıra sialik asitin de Newbury2 için alternatif bir reseptör olabileceği düşünülmektedir (Mauroy ve ark., 2011).

NoV'ların bir diğer özelliği de, enfekte veya cDNA ile transfekte hücrelerde subgenomik RNA'nın eksprese edilmesidir. ORF2 ve ORF3, subgenomik RNA'nın oluşmasında görev alırlar. Subgenomik RNA, genomun son 2.4 kb kısmıyla aynıdır ve 5' ucunda VPg, 3' ucunda da polyA bulunmaktadır (Thorne ve Goodfellow, 2014).

1.1.1.2. BoNoV'un Sınıflandırılması

VP1 kapsit proteininin detaylı filogenetik analizlerine göre NoV'lar altı "genogrup"tan oluşmaktadır (Zheng ve ark., 2006). Bu genogruplar, GI, GII, GIII, GIV, GV ve GVI olarak ifade edilmektedir. İnsan NoV GI, GII ve GIV içerisinde, Bovine ve Ovine NoV GIII içerisinde, MuNoV GV içerisinde, domuz NoV GII içerisinde, aslan, kedi ve köpek NoV ise GIV içerisinde yer almaktadır (Liu ve ark., 1999; Martella ve ark., 2007, Martella ve ark., 2008; Pinto ve ark., 2012; Scipioni ve ark., 2008 ve Woode ve Bridger, 1978). İshalli evcil köpeklerde tanımlanan yeni bir NoV ise GVI'da yer almaktadır (Mesquita ve ark., 2010). Yakın zamanda Hong Kong'da bir köpekte identifiye edilen NoV'un ise GVII olabileceği önerilmiştir (Vinjé, 2015).

Genogruplar içerisindeki NoV suşlarının sınıflandırılmasında önceleri görüş birliğine varılamamıştır. Ancak, daha sonra önerilen NoV'un bilimsel adlandırılmasında major kapsit proteinlerinin aminoasit dizinlerine dayalı bir sınıflandırılmaya gidilmesi görüşü benimsenmiştir. Son sınıflandırmaya göre; NoV'lar 6 genogruba ayrılır (Di Felice ve ark., 2016 ve Green, 2013, s:583–609). GI içerisinde 9, GII de 22, GIII'te 3, GIV, GV ve GVI'da 2'şer genotip bulunur (Vinjé, 2015). Yapılan moleküler analizler, BoNoV'ların insan NoV'dan oldukça uzak olduğunu ortaya koymuştur ve bugüne kadar insan ishallerinde BoNoV tespiti yapılmamıştır (Smiley ve ark., 2003). BoNoV, kronolojik olarak bakıldığında bu genogruplar içerisinde ilk keşfedilen genogrup olan GIII'te yer almaktadır (Liu ve ark., 1999; Ando ve ark., 2000; Oliver ve ark., 2003). NoV GIII içerisinde birbirlerinden antijenik olarak farklı üç genotip (GIII.1, GIII.2 ve GIII.3) bulunmaktadır (Green, 2013, s:583–609). GIII.1'in prototip suşu Bo/Jena/80/DE, GIII.2'nin prototip suşu ise Bo/Newbury2/76/UK suşlarıdır (Oliver ve ark., 2007a). Ayrıca Yeni Zelanda'da koyunlardan ve domuzlardan alınan dışkı örneklerinde tespit edilen, BoNoV GIII ile yakın ilişkili NoV (Ov/NZL/2007/GIII.3/Norsewood30) üçüncü genotip (GIII.3) olarak tespit edilmiştir (Wolf ve ark., 2009). Arjantin'de yapılan bir çalışmada RdRp gen bölgesi GIII.2 ile oldukça yakın ancak ORF2/3 gen bölgesi mevcut genotiplerden oldukça farklı olan muhtemel bir suşun

(Bo/AR/2012/B4881) ise muhtemel 4. genotipi (GIII.4) temsil ettiği bildirilmiştir (Ferragut ve ark., 2016).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda az sayıda BoNoV suşunun tüm dizini ya da tüm kapsit dizini (ORF2) bildirildiğinden, BoNoV'lar arasında sağlam bir filogenetik ilişki kurmanın ya da evrimsel süreçleriyle ilgili bir sonuca varmanın oldukça güç olduğu bildirilmektedir (Di Felice ve ark., 2016). Oysa farklı NoV'ların farklı epidemilere neden olması, konak spektrumları, insidensleri, virulensleri ve çevresel koşullarda stabilitelerinin farklı olması bu virusların doğru olarak sınıflandırılmasını önemli kılmaktadır (Kroneman ve ark., 2013).

NoV'lar arasında rekombinasyon varlığının, genotip tayininin doğru şekilde yapılmasını zorlaştırması ve rekombinasyon bölgesinin çoğunlukla ORF1/ORF2 birleşim bölgesi olması sebebiyle, RdRp ve kapsit gen bölgelerinin dizinleri dikkate alınarak; hem RdRp hem de kapsit proteinlerini kodlayan gen bölgelerine ait tiplendirmenin içerildiği ikili adlandırma sistemi önerilmiştir (Kroneman ve ark., 2013). Buna göre, örneğin GIII.1 genotipi prototip virusu olan Bo/Jena/80/DE suşu GIII/Bo/DE/1980/GIII.P1_GIII.1/Jena ve GIII.2 genotipi prototip virusu olan Bo/Newbury2/76/UK suşu GIII/Bo/UK/1976/GIII.P2_GIII.2/Newbury2 olarak adlandırılmaktadır.

1.1.1.3. Nebovirusların Yapısı

Bugüne kadar sadece buzağılarda tespit edilen Neboviruslar, aslında 1980'lerden beri bilinmelerine karşın, Calicivirus ailesinde bir genus olarak nitelendirilmeleri oldukça yenidir (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986 ve Smiley ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar NoV'lar ile Nebovirusların antijenik yönden farklı olduklarını ortaya koymuştur (Dastjerdi ve ark., 2000; Oliver ve ark., 2006a ve Smiley ve ark., 2002). Bu güne kadar az sayıda Nebovirus suşu karakterize edilmiş olduğundan, NoV'lara kıyasla, Neboviruslara ilişkin bilgiler sınırlıdır (D'Mello ve ark., 2009; Han ve ark., 2004; Park ve ark., 2008 ve Smiley ve ark., 2002).

Neboviruslar, RdRp gen bölgelerine göre “Newbury1” ve “Nebraska” benzeri olmak üzere iki farklı genotipten oluşur (Oliver ve ark., 2006a ve Smiley ve ark., 2002). Bu viruslar birbirlerine genom organizasyonları, ORF1 proteaz ayrılma bölgeleri açısından benzemelerinin yanı sıra, tam kapsit proteini oluşturan aminoasitleri bakımından da %98 oranında benzemektedir (Oliver ve ark., 2006a).

Nebovirusların yaklaşık 7.4 kb büyüklüğündeki viral genomu, ORF1 ve ORF2 olmak üzere 2 ORF (Şekil 1.2) ve 5’ ucunda diğer caliciviruslardan yaklaşık üç kat daha uzun bir UTR (74-75 nükleotit (nt)) içermektedir (Oliver ve ark., 2006a ve Smiley ve ark., 2002). 3’ ucunda ise yaklaşık 67 nt’den oluşan PolyA kuyruğu bulunmaktadır (Smiley ve ark., 2002). ORF1, yapısal olmayan proteinleri ve 49-57 kDa boyutundaki major kapsit proteinini kodlamaktadır (Dastjerdi ve ark., 2000 ve Smiley ve ark., 2002). ORF2 ise, minör yapısal proteini kodlamaktadır (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986). Diğer Caliciviruslarda olduğu gibi, ORF1’in kodladığı yapısal olmayan proteinler sırasıyla; protein p48 (N-term), nükleosit trifosforaz (NTPase) (2C-like), protein p22 (3A-like), VPg (3B), proteinaz (3C-like) ve RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) (3D-pol)’dır (Oliver ve ark., 2006a ve Smiley ve ark., 2002).

VP1 kapsit proteini NoV’larda olduğu gibi, 2 hidrofobik ve bir hidrofilik bölgeye ayrılmakta olup, bu bölgeler sırasıyla S, P1 ve P2 olarak adlandırılmaktadır (Prasad ve ark., 1999). D’Mello ve ark. (2009) tarafından bildirilen homoloji modeline göre S domain 1-216, P1 domaini 217-273 ve 452-549, P2 domaini ise 274-451 aminoasitleri arasına denk gelmektedir. S domaini oldukça korunaklı olmasına rağmen, P1 orta düzeyde korunaklı, P2 ise oldukça değişkendir (Chen ve ark., 2004). Özellikle P2 bölgesinin en değişken kısmı olan 288-420 aminoasitleri arasındaki bölge homoloji modeline göre yüzeyde yer almaktadır. P2, NoV’da olduğu gibi kapsitin dış kısmında yer alır ve virusun bağırsak hücrelerinin yüzeyinde bulunan hücre reseptörüne bağlanmasında ve immünolojik özellikleri taşımasında görev almaktadır (D’Mello ve ark., 2009).

1.1.1.4. Nebovirusların Sınıflandırılması

Filogenetik olarak, Neboviruslarda iki polimeraz tipi tanımlanmış olup, saptanan saha suşları prototip viruslar (Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US) dikkate alınarak Newbury1-benzeri ve Nebraska-benzeri olarak sınıflandırılmaktadırlar. Ayrıca Neboviruslar arasındaki genetik farklılıklar nedeniyle yeni genotiplerin varlığına dair bildirimler de bulunmaktadır. Bu iki prototip virus (Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US) dışında Kaplon ve ark. (2011) muhtemel üçüncü bir genotipi temsil eden suşu (Bo/DijonA216/06/FR) bildirmişlerdir.

Her bir RdRp tipinin referans virusları tek tip kapsite sahiptir yani VP1 kapsit dizini prototip viruslar olan, Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US arasında korunaklıdır (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986 ve Oliver ve ark., 2006a). Başlangıçta diğer caliciviruslardan farklı olarak, Nebovirusların, birbirleriyle yakın ilişkili tek bir antijenik gruplandırmaya sahip olduğu bildirilmiştir (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986). Ancak, son olarak yapılan moleküler analizler sonucunda Nebovirusların aslında 4 kapsit tipine sahip oldukları, her bir kapsit tipinin birbirine yüksek oranda benzediği ve gruplar arasındaki nükleotit benzerliklerinin en az %88,7; aminoasit benzerliklerinin ise en az %96,5 oranında olduğu bildirilmiştir (Di Martino ve ark., 2011 ve D'Mello ve ark., 2009). Bu tiplendirmeye göre, *Lineage 1*, Amerika, İtalya ve İngiltere'deki suşlardan oluşmaktadır (D'Mello ve ark., 2009). Her iki RdRp tipinin (Bo/Newbury1/76/UK-benzeri ve Bo/Nebraska/80/US benzeri) referans virusu da bu tip kapsite sahiptir. *Lineage 2*'de Japonya ve Amerika'da saptanan suşlar; *Lineage 3*'te Kore suşları; *Lineage 4*'de İngiltere ve İtalya'da tespit edilen suşlar bulunmaktadır (Di Martino ve ark., 2011).

Neboviruslara ilgili tespitler ve moleküler karakterizasyon çalışmaları BoNoV'lara göre çok daha sınırlıdır. Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalar BoNoV'larda olduğu gibi Nebovirusların sınıflandırılmasına ilgili yeni veri ve yaklaşımları da ortaya koyacaktır. Bu bağlamda 3. bir genotip olarak önerilen Bo/DijonA216/06/FR suşu, ülkemizde Alkan ve ark. (2015) tarafından şiddetli ishali

buzağılardan saptanan bir Calicivirus olan ve tam genom nükleotit benzerliği bakımından en yakın olarak Neboviruslara benzeyen (%48) “Kırklarelivirus” suşu ile gelecekte saptanması olası birçok farklı suşun yer aldığı yeni sınıflandırma kriterlerinin oluşturulması da mümkün olabilecektir.

1.2. Zoonotik Potansiyel ve Rekombinasyon

Bazı hayvan calicivirusları tür bariyerini geçebilmekte ve potansiyel olarak, insanları alternatif konak olarak kullanması mümkün olabilmektedir. Örneğin, Snow Mountain deniz aslanı virusunun insanları enfekte ettiğine dair veriler bulunmaktadır (Smith ve ark., 1998). Bu güne kadar, zoonotik BoNoV enfeksiyonları bildirilmemiştir ancak muhtemel bir geçişe dair kanıtlar bulunmaktadır (Thorne ve Goodfellow, 2014). Örneğin, insan NoV gnotobiyotik domuzları enfekte edebilmektedir ve buna dair serolojik bulgular mevcuttur (Farkas ve ark., 2005). Aynı zamanda insan NoV’ları domuzlarda ve sığırlarda virolojik olarak tespit edilmiştir (Mattison ve ark., 2007).

İnsan NoV ile yakın ilişkili NoV’lar diğer memeli türlerinden de identifiye edilmiştir ancak bunların doğal konakçı mı yoksa doğal olarak enfekte olan geçici konaklar mı oldukları netlik kazanamamıştır (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986). NoV’ların klinik belirtilere sahip ve sahip olmayan gastroenteritisli domuzlarda ve sığırlarda tespiti oldukça yaygındır. Yapılan moleküler analizler, özellikle domuz NoV’ların insan suşlarıyla yakın ilişkili olduğunu göstermiştir ki zaten, bazı domuz NoV’ları ve insan NoV’ları aynı genogrubu (GII) paylaşmaktadır (Oliver ve ark., 2003; Wang ve ark., 2005). Ayrıca, insan NoV GII’nin replikasyon çalışmaları gnotobiyotik domuzlarda kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Scipioni ve ark., 2008). Venezuela’daki domuzlarda insan NoV karşı bulunan antikorlar, hayvanların insan NoV için bir rezervuar rolü oynayabileceğini düşündürmüştür (Farkas ve ark., 2005). Bu sonuçların, domuzların GI insan NoV ile enfekte olmasıyla ya da henüz keşfedilmemiş domuz NoV’un muhtemel bir sirkülasyonu ile açıklanabileceği bildirilmiştir (Scipioni ve ark., 2008).

Olası rezervuarlar ve zoonotik geçişe dair bulgular olmasına rağmen, reseptörler arasındaki farklılıklar bu hipotezi desteklememektedir. Ayrıca, insan ve sığırlarda farklı genotiplerin sirküle olması nedeniyle, Oliver ve ark. (2003) BoNoV'ların insanlar için bir risk oluşturmadığını öne sürmüşlerdir. Ancak, Kanada'da, domuz ve sığırlarda tespit edilen NoV dizininin, insan GII.4 NoV dizini ile yakın olmasına dayanılarak, BoNoV'ların zoonotik potansiyeline ilişkin bilginin ilerleyen zamanlarda değişebileceği bildirilmiştir (Mattison ve ark., 2007). Hayvan NoV'ları, henüz insanlardan izole edilmemiştir ancak, Hollanda'da bazı veteriner hekimlerde, Hindistan'da ise örneklenen yetişkinlerin %10,7'sinde BoNoV GIII.2'ye karşı antikorların tespit edilmesi, bazı BoNoV'ların zoonotik potansiyelinin olabileceği yönünde bir değerlendirmeye neden olmuştur (Menon ve ark., 2013 ve Widdowson ve ark., 2005). Bununla birlikte bu durumun insan ve bovine suşları arasındaki çapraz-reaktif epitopların varlığından kaynaklandığı düşünölmüştür (Oliver ve ark., 2006b ve Scipioni ve ark., 2008). Araştırmacılar (van Der Poel ve ark., 2000 ve Thorne ve Goodfellow, 2014) NoV'ların zoonotik potansiyelini açığa kavuşturmak ve hayvanların yeni suşların ortaya çıkmasını sağlayan rezervuarlar olup olmadığının belirlenmesi için, bu virusların hem sağlıklı hem de hasta hayvanlarda prevalansının tespit edilmesini, türler arası geçişi erken tespit edecek yeni metotlar geliştirilmesini ve bu çalışmaların hem veteriner hekimlik hem de halk sağlığı yönünden işbirliği ile gerçekleştirilmesini önermişlerdir.

Bilindiği kadarıyla Nebovirusların zoonotik potansiyeli olduğuna dair bir bildirim bulunmamaktadır.

Virusların zoonotik potansiyeli, farklı türlere ait ya da aynı türde enfeksiyon oluşturan değişik suşların oluşturduğu mix enfeksiyonların, rekombinasyon ile sonuçlanması olasılığından dolayı da önem arz etmektedir.

Rekombinasyon, Caliciviruslarda, aynı genogrup veya genotip içerisinde ya da genogruplar arasında oldukça sık meydana gelmektedir (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986 ve Di Martino ve ark., 2011). Caliciviruslarda rekombinasyon ilk olarak insan caliciviruslarında 1997 yılında tanımlanmıştır (Hardy ve ark., 1997). O zamandan bu

yana tüm Calicivirus genuslarında rekombinant virusların varlığı tespit edilmekte olup, farklı patogeneze ve virülense sahip yeni suşların ya da varyantların ortaya çıkması açısından rekombinasyon önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Bull ve White, 2010, s:45-65).

NoV'lar, çoğunlukla ORF1-ORF2 (polimeraz gen bölgesinin sonu-kapsit gen bölgesinin başlangıcı) birleşim bölgesinde rekombine olmasına rağmen başka rekombinasyon bölgeleri de belirlenmiştir (Bull ve ark., 2007; Jiang ve ark., 1999 ve Rohayem ve ark., 2005). Kapsit bölgesinin konak hücreye bağlanma reseptörlerine sahip olması ve antijenik tanınmadan sorumlu olması sebebiyle, rekombinasyonun önemli evrimsel etkileri bulunmaktadır. Sonuçta, kapsit bölgesi konakçıdan kaynaklanan bir takım fonksiyonel ve yapısal zorlamalar nedeniyle seleksiyona uğramaktadır. Alternatif olarak, konakçının immun savunma mekanizmalarından kaçabilmek için de kapsit bölgesi yapısal olarak değişmeye zorlanmaktadır (Bull ve White, 2010, s:45-65).

Rekombine olma yeteneği, virusun RdRp gen bölgesini korumasını ancak viral kılıfını değiştirmesini ve dolayısıyla farklı bir antijenik profile bürünmesini sağlar. Bu durum, sürü immünitesi ya da konakçıya bağlanan epitoplarda oluşan mustasyonlar nedeniyle konak sayısı azalan virusa avantaj oluşturmaktadır (Bull ve White, 2010, s:45-65). İdentifiye edilen birçok NoV rekombinantları, aynı hayvan (domuz ve sığır) türü ve insan içerisinde ve aynı genogrupta olmasına rağmen Nayak ve ark. (2008) insanlarda genogruplar arası NoV rekombinantı tespitinde de bulunmuşlardır. Nitekim insanlarda GI ve GII'nin doğal koenfeksiyonunun ortaya konulmuş olması; su kabuklularında aynı anda hem insan hem de hayvan NoV varlığının tespiti, NoV'ların rekombinasyon temelli evrimi olasılığı konusunda önemli bildirimlerdir (Costantini ve ark., 2006). Bu nedenledir ki, rekombinasyon meydana geldiği bölge nedeniyle, NoV'ların güncel sınıflandırma sistemi rekombinant suşların hem RdRp hem de kapsit gen bölgesinin filogenetik özelliklerini ifade edecek şekilde oluşturulmuştur.

Bugüne kadar yapılan BoNoV'a ilişkin yapılan çalışmalar sonucunda, hem

GIII.P1 (Jena) benzeri RdRp gen bölgesi yanı sıra GIII.2 (Newbury2) benzeri kapsit gen bölgesine sahip (GIII.P1/GIII.2) hem de GIII.P2 (Newbury2) benzeri RdRp gen bölgesi yanı sıra GIII.1 (Jena) benzeri kapsit gen bölgesine sahip (GIII.P2/GIII.1) rekombinant suşlar tanımlanmıştır. İlk rekombinant BoNoV suşu olan Bo/Thirsk10/00/UK İngiltere’de Oliver ve ark. (2004) tarafından tespit edilmiştir ve bu suş GIII.1 ilişkili RdRp; GIII.2 ilişkili kapsit bölgesine sahiptir. Farklı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda tespit edilen BoNoV rekombinant suşlar bu suşa benzer genetik kombinasyona (GIII.P1/GIII.2) sahiptirler (Di Martino ve ark., 2014; Han ve ark., 2004; Jor ve ark., 2010 ve Mauroy ve ark., 2009b). Bugüne kadar yalnızca bir GIII.2 ilişkili RdRp; GIII.1 ilişkili kapsit gen bölgesine sahip rekombinant suş (B-1SVD/03/US) tanımlanmıştır (Bull ve ark., 2007).

In vitro olarak yapılan bir çalışmada da, farklı iki MuNoV suşuyla enfekte edilen leukemik fare monosit-makrofaj hücrelerinde rekombinant suş gelişimi gösterilmiştir (Mathijs ve ark., 2010).

Nebovirus prototip virusların (Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US) genom yapıları dikkate alındığında -yani iki farklı RdRP bölgesine sahip olmalarına karşın kapsit bölgesi yönünden oldukça yakın olmaları- diğer Calicivirus genuslarında olduğu gibi Neboviruslarda da rekombinasyon olasılığının öngörülmesine neden olmuştur. Nitekim Di Martino ve ark. (2011) İtalya’da yaptıkları çalışmada rekombinant Nebovirus suşu (Bo/16TE/2010/ITA) tespit etmişlerdir.

Caliciviruslarda rekombinasyonun rolünün iyi anlaşılması özellikle aşı geliştirilme çalışmaları için önemlidir. Çünkü, rekombinasyonun yeni patojenik suşlar oluşturma potansiyeli, eğer virustan korunmak için canlı-attenüe aşı kullanılması planlanıyorsa, dikkatli olunması gereken bir durumdur (Bull ve White, 2010, s:45-65).

Tüm bu bilgiler, uygun koşullarda rekombinant calicivirusların oluşabileceğini ve/veya genetik olarak uygun NoV’lar için türler arası geçişin (hayvan-hayvan ve

insan-hayvan) ve ko-enfeksiyonun mümkün olabileceğini göstermektedir (Mauroy ve ark., 2009a ve Scipioni ve ark., 2008).

1.3. Epidemiyoloji

NoV'ların insanların yanı sıra sığırlarda, domuzlarda, köpeklerde ve vizonlarda gastroenterik hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Bu viruslar insanlarda tüm yaş gruplarında, özellikle bakım evleri, hastaneler ve restoranlar gibi toplu yerlerin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan gastroenterit salgınlarına neden olan en yaygın nedenlerin başında gelmektedirler (Deng ve ark., 2003; Puustinen ve ark., 2012 ve van der Poel ve ark., 2000). Genellikle her kış sezonunda ortaya çıkan gastroenterit vakalarında, salgınlarda ve hatta bazen epidemilerde, farklı genetik özelliklere sahip NoV'lar tespit edilmektedir (van der Poel ve ark., 2003).

İnsanlarda NoV'lar her yaş grubunda enfeksiyona neden olmasına karşın, BoNoV genellikle genç hayvanlarda (ilk bir yılda daha yüksek oranlarda olmakla birlikte) tespit edilmektedir (Deng ve ark., 2003 ve Mauroy ve ark., 2009a). Yetişkin sığırlarda NoV'ların az saptanmasının muhtemel nedenleri arasında, tekrarlayan enfeksiyonları önleyen suş spesifik antikor yanıtı ya da erişkin sığırlardaki virus saçılımının çok az olması sayılmaktadır (van der Poel ve ark., 2003).

NoV'larla ilgili epidemiyolojik çalışmalar, örneklenen popülasyon, ülke, örneklemenin yapıldığı mevsim, vb. kriterler yanı sıra BoNoV genotiplerinin (GIII.1 ve GIII.2) varlığı/yaygınlığına yönelik verileri de ortaya koymuştur. Hollanda'da materyal sağlanan işletmelerin %44'ünde NoV varlığı (van der Poel ve ark., 2000); besi buzağılarından sağlanan örneklerin %31,6 ve süt sığırcılığı işletmesinde bulunan buzağılardan sağlanan materyallerin %4,2'sinde GIII.2 NoV varlığı (van der Poel ve ark., 2003) bildirilmiştir. İtalya (Di Bartolo ve ark., 2011; Di Martino ve ark., 2014), İngiltere (Milnes ve ark., 2007 ve Oliver ve ark., 2003) ve Fransa' da (Kaplun ve ark., 2011) yapılan çalışmalarda ishalleri buzağılarda %8-24,7 arasında değişen oranlarda GIII.2 genotip BoNoV tespiti bildirilmiştir. Jor ve ark. (2010) Norveç'te

ishalli ve ishalli olmayan buzağılarda %49,6 oranında hem GIII.1 hem de GIII.2 tespiti yapmışlardır. Yapılan çalışmalarda GIII.1 prevalansı, Macaristan'da %2,1 (Reuter ve ark., 2009), Belçika'da %0,3 (Mauroy ve ark., 2009a), İtalya'da %0,9-2,9 (Di Bartolo ve ark., 2011 ve Di Martino ve ark., 2014), Almanya'da %9 (Deng ve ark., 2003) ve Fransa'da %5 (Kaplon ve ark., 2011) olarak bildirilmiştir. Amerika'da yapılan çalışmalarda ise farklı eyaletlere ilişkin örneklemeler yapılmış ve bu çalışmalarda %21,6-80 arasında değişen pozitiflik oranları saptanmıştır (Cho ve ark., 2013; Smiley ve ark., 2003 ve Wise ve ark., 2004).

BoNoV birçok Avrupa ülkesi ve Kuzey Amerika yanı sıra Asya, Afrika ve Güney Amerika'da yer alan bazı ülkelerde de bildirilmiştir. Bu çalışmalarda Güney Kore'de %9,3 (Park ve ark., 2007), Tunus'da %16,6 (Hassine-Zaafrane ve ark., 2012), Venezuela'da %1 (Alcala ve ark., 2003), Arjantin'de ise %3,3 (Ferragut ve ark., 2016) oranında pozitiflik saptanmıştır.

BoNoV üzerine yapılan serolojik çalışma verileri ise GIII.2 için oldukça yüksek seroprevalans değerlerini ortaya koymuştur. Almanya'da ve İngiltere'deki sığırlarda GIII.1 ya da GIII.2'ye karşı %93-98 (Oliver ve ark., 2007b); Amerika'da GIII.2'ye karşı %94-95 (Thomas ve ark., 2014), Belçika'daki GIII.2'ye karşı seroprevalans oranı %93 (Mauroy ve ark., 2009a) olarak saptanmıştır.

Bu iki genotipin yanı sıra BoNoV rekombinant suşlara ilgili çalışmalar, ilk rekombinant BoNoV suşun (Bo/Thirsk10/00/UK) İngiltere'de tanımlanmasını takiben benzer rekombinant suşların (GIII.P1/GIII.2) Amerika, Belçika, Norveç ve İtalya'da tespit edildiğini ortaya koymaktadır (Di Martino ve ark., 2014; Han ve ark., 2004; Jor ve ark., 2010; Mauroy ve ark., 2009b ve Oliver ve ark., 2004). GIII.2 ilişkili RdRp ve GIII.1 ilişkili kapsit gen bölgesine sahip tek rekombinant suş (B-1SDV/03/US) ise Yeni Zelanda'da tespit edilmiştir (Bull ve ark. 2007).

Günümüzde, Caliciviruslar içerisinde yeni tanımlanan bir genus olan Nebovirusların yaygınlığına dair çok sayıda bildirim olmamasına rağmen, yapılan çalışmalarda bu virus İngiltere'de %8,4 (Oliver ve ark., 2006a), Fransa'da %7

(Kaplon ve ark., 2011), İtalya'da %5 (Di Martino ve ark., 2011), Tunus 'da %3 (Hassine-Zaafraane ve ark., 2012), Güney Kore'de %9,2 (Park ve ark., 2008), Brezilya'da %4.8 (Candido ve ark., 2016) oranında tespit edilmiştir. Smiley ve ark. (2003) ile Cho ve ark. (2013) tarafından Amerika'da yapılan çalışmalarda ise ishalleri buzağılardan sağlanan örneklerde sırasıyla %29 ve %21,6 oranında pozitiflik saptanmıştır. Sağlıklı buzağılarda Nebovirus tespiti (%1,6) üzerine bilindiği kadarıyla tek bildirim Cho ve ark. (2013) tarafından Amerika'da gerçekleştirilen bir çalışmaya ilişkindir. Buzağılarda Nebovirus enfeksiyonu seroprevalansı ise Amerika'da yapılan bir çalışmada %40 olarak bildirilmiştir (Thomas ve ark., 2014).

Bu epidemiyolojik verilere göre; BoNoV GIII.2'nin Avrupa ve Amerika'da endemik olduğu (Deng ve ark., 2003; Mauroy ve ark., 2009a ve Thomas ve ark., 2014) ve genel olarak bakıldığında BoNoV GIII.2'nin GIII.1'den çok daha fazla yaygın olduğu görülmektedir (Kaplon ve ark., 2013; Milnes ve ark., 2007; Park ve ark., 2007; van der Poel ve ark., 2003 ve Smiley ve ark., 2003). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda saptanan Neboviruslar ise çoğunlukla Nebraska-benzeri genotip içinde sınıflandırılmış olup, Newbury1-benzeri genotip virus İngiltere dışında sadece Brezilya'da tespit edilmiştir (Candido ve ark., 2016).

Türkiye'de BEC enfeksiyonlarına ilgili bilgiler çok sınırlı düzeydedir. BoNoV ile ilgili iki araştırma bulunmakta olup, bu çalışmalarda ishalleri buzağılarda kapsit gen bölgesi kısmi analizi (Yılmaz ve ark., 2011) ve RdRp gen bölgesi kısmi analizi verilerine göre (Gülaçtı ve ark. 2016) GIII.2 genotipli BoNoV sırasıyla %8,5 ve %1,7 oranlarında tespit edilmiştir. Nebovirus tespitine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte Alkan ve ark. (2015) tarafından, Kırklareli ilinde, yerleşik bir işletmede buzağılarda görülen ishal salgını sırasında saptanan bir calicivirusun (Kırklareli virus) tam genom analizi sonucunda, en yakın olarak Nebovirus ile benzerlik gösterdiği (%48) ve virusun ayrıca Ankara'daki bir işletmede de saptandığı bildirilmiştir.

Buzağı ishalleri multifaktoriyel bir hastalıktır. Bu faktörlerin etkili olma durumları, doğum öncesi annelerin bakımı, buzağının immünite durumları ve

çevresel faktörler ile doğrudan ilişkilidir. Hastalığa neden olan patojenlerin bilinmesi, etkilenen çiftliklerin durumlarının belirlenmesi ve daha sonraki müdahalelerin geliştirilmesi için önemlidir (Cho ve Yoon, 2014 ve Crouch ve ark., 2001). İngiltere’de ishal vakalarında genellikle bilinen etkenler olan BRV, BCoV, Cryptosporidium, Coccidia, *Salmonella spp.* ve *E. coli* aranmasına rağmen, bu vakaların yaklaşık %30’unda herhangi bir enteropatojen tespit edilememiştir (Dastjerdi ve ark., 2000 ve Oliver ve ark., 2006a). Bu ishal vakalarının %17’sinin bovine enterik caliciviruslar ile ilgili olduğu saptanmış, %13 oranındaki vakanın sebebi ise tespit edilememiştir (Oliver ve ark., 2006a).

Sığır popülasyonunda BEC’ler farklı ülkelerde oldukça dikkate değer oranlarda bildirilmiş olmasına karşın, buzağı ishallerinin rutin teşhisinde halen birçok ülkede yer almaması ve bu virusların sığır yetiştiriciliği üzerinde etkilerinin tam olarak bilinmemesi; RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) kullanılarak tespit edilen sonuçların kıtaya, örnekleme stratejisine ve özellikle test koşullarına göre değişiklik göstermesi olasılığı, rutin tanı laboratuvarlarının organizasyon ihtiyacı, vb. nedenlere dayanmaktadır. Ancak her geçen gün elde edilen yeni epidemiyolojik veriler, rutin tanı kapsamına alınması ihtiyacını ortaya koymaktadır. (Mauroy ve ark., 2009a ve Thomas ve ark., 2014).

1.4. Bulaşma

Enterik Calicivirusların temel bulaş yolu fekal-oral bulaşmadır (Green, 2013, s:583–609). Bulaşması, enfekte konakla direkt temas ya da dışkı, kontamine yiyecekler, su, vb. kontamine materyallerle indirekt temas şeklinde olmaktadır (Clarke ve ark., 2012 s: 977-986; Di Felice ve ark., 2016 ve Zheng ve ark., 2006). Calicivirusların doğada oldukça stabil ve belli ölçüde inaktivasyona dirençli oldukları bilinmektedir. Yapılan çalışmalar insan NoV’ların çevrede stabil olduğunu ve enfeksiyöz dozun 10-100 virus partikülü olabilecek kadar düşük olduğunu ortaya koymuştur (<http://www.cdc.gov/norovirus/downloads/keyfacts.pdf>, 22.04.16). Enfeksiyöz dozlarının düşük olması ve farklı suşların varlığı enfeksiyon riskini

arttırmaktadır (Scipioni ve ark., 2008). Bu nedenle BoNoV'un yüksek seroprevalans oranları beklenir bir sonuçtur. Bu yüksek prevalans değerleri aynı zamanda, GIII.2 ile enfekte edilen buzağılarda daha önce saptandığı gibi dışkıda uzun süren virus saçılımının bir yansıması olarak da düşünülmektedir (Jung ve ark., 2014).

1.5. Klinik Bulgular ve Patogenez

BEC ile yapılan çalışmalar Murine NoV dışında başka bir NoV'un hücre kültüründe üretilmemesi sebebiyle sınırlıdır (Duizer ve ark., 2004). Özellikle diyagnostik prosedürlerin belirlenmesi açısından genom dizin analizinin sistematik olarak uygulanması, bu viruslarla ilgili yapılan çalışmalara katkıda bulunmuştur. Ancak, enfeksiyonun biyolojisiyle ilgili çalışmalarda yeterli ilerleme kaydedilememiştir. Bunun nedenleri arasında, inokulumun kolay hazırlanamaması, uygun hayvan modellerinin sınırlı ve pahalı olması sayılabilir (Otto ve ark., 2011). BEC'lerin patogeneziyle ilgili çok az sayıda çalışma bulunduğundan bu virusların patogeneziyle ilgili olarak genellikle insanlarla yapılan çalışmalardan çıkarım yapılmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle saha ortamında BEC'lerin patogenezi anlamak için yoğun klinik ve virolojik taramaların yapılması gerekmektedir.

BoNoV, diğer enteropatojenler ile miks enfeksiyon olmaksızın da enfekte buzağılarda ishale neden olmaktadır (Woode ve Bridger, 1978). Yapılan deneysel çalışmalar BoNoV GIII.1 ve GIII.2 prototip suşları arasında antijenik ve serolojik açıdan olduğu gibi enteropatojenik karakterleri açısından da farklılıkların bulunduğunu ortaya koymuştur (Jung ve ark., 2014 ve Otto ve ark., 2011). Bu çalışmalarda düzenli olarak BoNoV GIII.2 inokule edilen, 1-8 gün yaşlarındaki buzağılarda şiddetli ishalin gelişmediği (Woode ve Bridger, 1978), Newbury2 ile enfekte gnotobiyotik buzağılarda çoğunlukla hafif seyirli ishale neden olan non-hemorajik enterit, geçici anoreksi ve ksiloz malabsorbsiyonunun saptandığı, ishalin yeni doğan buzağılardan ziyade 3 hafta - 2 ay yaşa sahip buzağılarda gözlemlendiği bildirilmiştir (Bridger ve ark., 1984 ve Hall ve ark., 1984). Jena suşu ile yapılan çalışmalarda ise, inokulasyondan 14-16 saat sonra buzağılarda ishalin başladığı ve

kolostrum almamış buzağılarda sadece 2-3 gün süren kısa süreli yoğun ishalin görüldüğü bildirilmiş olup, bu durumun saha koşullarında 1-2 günlük buzağılarda ishalin gözlenebileceğine işaret ettiği tespit edilmiştir (Otto ve ark., 2011). GIII.2 BoNoV suşunun 4-7 günlük gnotibiyotik buzağılarda aralıklı ancak devam eden bir ishale sebep olduğu gözlenmiştir (Jung ve ark., 2014).

Jena ya da Newbury2 suşları ile enfekte olan buzağılardaki histopatolojik bulgular, villuslarda atrofi ve ince bağırsağın proksimalinde kript hiperplazileriyle karakterizedir (Bridger ve ark., 1984 ve Gunther ve Otto, 1987). Ancak, Jung ve ark. (2014) GIII.2 suşu ile yapılan çalışmada devam eden ishal ve uzun bir virus saçılımı gözlenmesine rağmen Jena suşunun aksine bağırsak epitellerinde nekroz, villus atrofi ve yangı lezyonları gibi belirgin akut bağırsak lezyonlarına rastlamamışlardır. Jena ile yapılan çalışmada ise, inokulasyondan 12 saat sonraki nekropside, bu suşun antijeni yönünden pozitif epitel hücrelerine sahip uzun villuslar saptanmıştır (Otto ve ark., 2011). Bu Jena suşunun tüm enteroabsorbtif hücreleri enfekte ettiğini, yani Rotavirüslerde olduğu gibi sadece villusların uç kısmındaki hücelere ya da Bovine Torovirüslerdeki gibi villusların alt kısmına karşı özel bir tropizm göstermediğini kanıtlamaktadır (Moon, 1997, s: 1-19). Enfeksiyonun erken seviyelerinde epitel hücre morfolojisinde bir değişiklik gözlenmezken, Jena suşunun replikasyonunun devam etmesi sonucu enfekte hücrelerin hasarı ve ayrılmasıyla gelişen yoğun villus atrofi ve olgun enterositlerin kaybının enfeksiyonun sınırlandırılmasına neden olduğu düşünülmektedir (Han ve ark., 2006 ve Otto ve ark., 2011). Lezyonların jejunumda oldukça yoğun, ileumda ise hafif karakterde olduğu, buna karşın duodenumda ise herhangi bir bulgu gözlenmediği bildirilmiştir (Hall ve ark., 1984 ve Otto ve ark., 2011).

Nebovirus enfeksiyonlarında genel olarak tüm buzağılarda, anoreksi, ileri derecede ishal, villuslarda kısalma, enzim aktivitesinde belirgin bir azalma ve ksiloz malabsorbsiyonu gözlenmektedir (Bridger ve ark., 1984; Hall ve ark., 1984 ve Smiley ve ark., 2002). Jena ve Newbury2 ile yapılan çalışmalarda lezyonların yoğun olduğu kısımlar ince bağırsakların orta ve alt kısımları; Nebovirüslerde ise yoğun olarak ince bağırsağın üst kısımlarıdır (Hall ve ark., 1984 ve Otto ve ark., 2011).

BEC'lerin sistemik enfeksiyona neden olduğuna dair bilindiği kadarıyla bir kanıt bulunmamaktadır.

BEC enfeksiyonlarında virus saçılımı başlangıçta EM'de gözlenebilir, ancak daha sonraki saçılımlarda miktar azaldığı için RT-PCR yöntemi ile virus saçılımını tespit etmek mümkündür (Scipioni ve ark., 2008). Nebraska ile yapılan çalışmada virus saçılımı 1. günde; Newbury1 ile yapılan çalışmada ise 2. günde başlamış ve en az 4. güne kadar devam etmiş, ishal ise 3. günden sonra başlamıştır (Dastjerdi ve ark., 2000 ve Smiley ve ark., 2002).

Dastjerdi ve ark. (1999) SPIEM kullanarak yaptıkları çalışmada GIII.2'nin kısa süreli saçılım süresine sahip olduğunu göstermelerine karşın, Jung ve ark. (2014) qRT-PCR kullanarak yaptıkları çalışmada, GIII.2 nin inokulasyon sonrası 20-30 güne kadar devam eden virus saçılımına neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Hollanda'da yapılan çalışmada, %0.15 oranındaki buzağıda NoV RNA'sı ilk tespitten iki ay sonra bile tespit edilmiş ve bu çalışmada NoV saçılımının buzağılarda yaklaşık 1-4 hafta sürdüğü gözlenmiştir (van der Poel ve ark., 2003). Jor ve ark. (2010) GIII.2 BoNoV ile yaptıkları çalışmada bu virus ile enfekte edilen buzağılarda 1. günden 23. güne kadar virus saçılımı olduğunu, 23. günde aynı virusla eprüvasyon sonrasında virus saçılımının 32. güne kadar devam ettiğini gözlemlemişlerdir. GIII.1 (Jena) ise inokulasyon sonrası 0,5-4 gün süren kısa virus saçılımına neden olmaktadır (Otto ve ark., 2011). GIII.2'nin uzun süreli saçılımı ve sebep olduğu sürekli ishalin bu virusun çiftliklerde endemik karakterde olmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Jung ve ark., 2014 ve Otto ve ark., 2011). Sonuç olarak, GIII.2 enfeksiyonu belirgin bağırsak bulguları olmaksızın sürekli bir ishale ve uzun süreli viral saçılıma neden olduğu halde GIII.1 (Jena) kısa süreli ishal ve virus saçılımına neden olmakla birlikte, bağırsaklarda GIII.2'den çok daha yoğun olarak atrofik jejenitise sebep olmaktadır (Jung ve ark., 2014).

Neboviruslara ilişkin bilgiler, Newbury1 ile gelişen enfeksiyonun BoNoV Newbury2'den daha ağır klinik semptomlara neden olduğunu (Bridger ve ark.,

1984), buzağuların Nebraska virus ile enfeksiyonunun 3-4 günlük bir inkübasyondan sonra uzun süren bir ishale sonuçlandığını göstermektedir (Otto ve ark., 2011).

NoV'ların klinik olarak sağlıklı olan buzağularda da tespit edildiğine dair bildirimler (Jor ve ark., 2010; Mijovski ve ark., 2010 ve Reuter ve ark., 2009) bulunmasına rağmen, Cho ve ark., (2013) bildirim hariç Neboviruslar buzağular için patojeniktir (Hall ve ark., 1984).

1.6. İmmunoloji

Sığırlarda plasentanın yavruya maternal antikor geçişine izin vermemesi nedeniyle, yeni doğan buzağular patojenlere karşı savunmasız bir şekilde doğmaktadırlar. Bu nedenle buzağuların enterik etkenlere karşı dirençli olması, yüksek kalitede, antikor içeren kolostrumun zamanında ve yeterli miktarda alınmasıyla yakından ilişkilidir. Genelde çiftlikler, birçok inekten alınan kolostrumu karıştırarak buzağulara vermesine rağmen, ideal olan her buzağının kendi annesinden kolostrumu almasıdır (Cho ve Yoon, 2014).

Murine NoV dışındaki NoV'ların hücre kültürlerinde üretilmemesi canlı attenüe aşılar gibi kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde ve viral replikasyon çalışmaları için problem yaratmaktadır. Günümüzde BoNoV ve insan NoV VLP (virus benzeri partikülleri, virus-like particles) serolojik testler geliştirmek ve NoV antijenitesini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Deng ve ark., 2003; Han ve ark., 2005 ve Mauroy ve ark., 2009a). Ayrıca NoV için herhangi bir hücre kültürü ya da hayvan modeli olmadığı için VLP'ler aynı zamanda aşı geliştirme ve NoV'a karşı immun yanıt çalışmaları için bir alternatif oluşturmaktadır.

Hayvan türlerine göre immun mekanizma değişmesine karşın insanlarda NoV'a karşı oluşan immun yanıtın benzerinin hayvanlarda da olduğu varsayılmaktadır (Scipioni ve ark., 2008). NoV ile enfekte edilen insanlarda homolog suşa karşı uzun süreli bir immun yanıtın oluşmadığı (Johnson ve ark.,

1990), oluşan kısa süreli immun yanıtın da heterolog NoV suşlarına karşı yeterli koruma sağlamadığı (Soediono, 2008) ortaya konmuştur. Buzağılarda deneysel enfeksiyondan sonra oluşan antikor yanıtı, insanlarda gözlenen serolojik yanıtla benzerlik göstermektedir. Serum IgG'leri enfeksiyon sonrası 5. günde saptanmış ve maksimum titreye BoNoV GIII.2 ile inokulasyonundan 3 hafta sonra ulaşılmıştır (Han ve ark., 2005). Newbury2 suşuyla epruvasyona tabi tutulan buzağılarda, virusa maruz kaldıktan 3 hafta sonra homolog immun yanıtın geliştiği tespit edilmiştir (Bridger ve ark., 1984). Ancak, gelişen bu immun yanıtın süresiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır (Scipioni ve ark., 2008). Han ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada ise, intranasal olarak VLP (mutant E. coli heat-labile toxin (mLT) adjuvantı ile) inokule ettikleri gnotobiyotik buzağılarda fekal IgA'ların oluştuğunu ve bunların homolog NoV'a karşı epruvasyonda ishal şiddetini ve süresini azaltan kısmi koruma sağladığını ortaya koymuşlardır. BoNoV ile ilgili immunolojik çalışmaların çok az olması sebebiyle, bu enfeksiyona karşı korumada diğer immun yanıtların ne derecede katkısının bulunduğu yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde halen serum ya da bağırsak antikor yanıtının NoV'a karşı korumayla ilişkili olup olmadığına ve doğal ve hücrel immun yanıtın koruma sağlayıp sağlamadığına dair bilgiler net değildir (Han ve ark., 2006). BoNoV'un her iki genotipinin antijenik farklılığı nedeniyle heterolog antijene karşı çapraz reaksiyonun çok az ya da tespit edilemeyen düzeyde olduğu (Oliver ve ark., 2006b), NoV ve Nebovirus prototip virusları (Newbury1 ve Newbury2) ile yapılan çalışmalarda çapraz koruma olmadığının saptandığı bildirilmiştir (Bridger ve ark., 1984 ve Dastjerdi ve ark., 2000).

BoNoV'un patojenik etkisi yapılan deneysel çalışmalarla ortaya konmuş olmasına rağmen birçok çalışmada NoV'ların asemptomatik enfeksiyonuyla ilgili bildirimler yapılmaktadır (Jor ve ark., 2010; Mijovski ve ark., 2010; van der Poel ve ark., 2003). İnsanlarda NoV enfeksiyonları ishal olmayan hastalarda sıklıkla tespit edilmekte ve bunun ya genetik direnç mekanizmasıyla ya da sonradan kazanılan immüniteyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, BoNoV'un asemptomatik buzağılardaki varlığı, sürü ortamındaki duyarlı hayvanların bu virusa sürekli maruz kalmalarını sağlamaktadır (Di Martino ve ark., 2014).

BEC'lerin immun mekanizmasıyla ilgili yeterli bilgiler olmamasına karşın az sayıda BoNoV seroprevalans çalışması ve bir Nebovirus seroprevalans çalışması mevcuttur. Bu çalışmalar hem buzağların hem de erişkinlerin GIII.1 ya da GIII.2 nedenli enfeksiyona bağlı olarak yüksek oranda pozitif bulunduğunu göstermiştir. Oliver ve ark. (2007b) GIII.1'e karşı İngiltere'de buzağlarda %77, erişkinlerde %98; Almanya'da ise buzağlarda %66, erişkinlerde %71; GIII.2'ye karşı İngiltere'de buzağlarda %87, erişkinlerde %66; Almanya'da ise buzağlarda %87, erişkinlerde %94 seroprevalans tespit etmişlerdir. Deng ve ark. (2003) ise Almanya'da test edilen örneklerin %99,1'inde Jena'ya karşı antikor tespiti yapmış ancak kolostrom almayan buzağların neredeyse hiç birinde BoNoV'a karşı antikor saptayamamıştır. Amerika'da yapılan çalışmada, 7-14 günlük buzağlarda BoNoV seroprevalans oranı %94 olarak saptanmış; bu oranın kolostromla yavrulara geçen pasif antikorların bir sonucu olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada 35 gün sonra bazı buzağlarda antikor titresinin azaldığı; buna karşın buzağların %49'unda virusa maruz kalınması sonrası aktif immun yanıt oluşumunu gösteren GIII.2 spesifik antikor titresinde 4 katlı artışın saptandığı bildirilmiştir (Thomas ve ark., 2014).

BoNoV antikorlarının yeni doğan buzağlarda saptanması, kolostrom alımı ya da doğal enfeksiyonla ilgili olabilmektedir. Buna karşın 6 ay-1 yaş arasındaki buzağlarda saptanan antikorlar erişkinlerdeki gibi doğal enfeksiyon sonucu oluşan aktif bağışıklık ile açıklanabilir. Belçika'da BoNoV'a karşı VLP ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile test edilen buzağı ve erişkin sığırların %93,2 sinin seropozitif olarak bulunduğu ve 1 yaşından büyük sığırlarda buzağlara göre pozitiflik oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Seropozitiflik oranlarının tersine yaş (1 yaş altında ve üzeri) dikkate alınarak belirlenen gruplarda saptanan antikor seviyeleri karşılaştırıldığında ise, bazı yetişkin sığırların antikor seviyelerinin daha düşük olduğu gözlenmiş, bu durum bazı sığırlarda kısa süreli bir immünitinin gelişmiş olabileceği ve sığırların yaşamları boyunca tekrarlayan enfeksiyonlara maruz kaldıkları görüşü ile açıklanmıştır (Mauroy ve ark., 2009a). BoNoV'un doğadaki stabil yapısı, fekal oral bulaşma gibi faktörler reenfeksiyonların oluşumuna olumlu katkı sunmaktadır.

Neboviruslara ilişkin bildirimde, Thomas ve ark. (2014) 7-14 günlük buzağılarda Nebovirusa karşı seropozitifliği %40; 6-7 aylık buzağılarda ise %78-100 olarak saptamışlardır. Çalışmada Nebovirusa karşı seroprevalans oranı GIII.2 BoNoV'a kıyasla oldukça düşük bulunmuştur.

Yapılan çalışmalardan elde edilen yüksek seroprevalans değerleri BEC enfeksiyonunun birçok ülkede endemik olduğunu ve virusa sürekli maruz kalındığına işaret etmektedir. Nitekim, bir kısım serum örneğinde antikorların affinitesinin ölçülmesi sonucunda Jena suşuna uzun süreli maruziyeti işaret eden yüksek aviditeli antikorların tespit edilmesi (Deng ve ark., 2003) bu görüşü destekleyen bir örnektir. Ayrıca, BoNoV genotipleri arasında çapraz reaksiyonun olmaması nedeniyle, pozitif sonuçların genotip spesifik olduğu da unutulmamalıdır (Deng ve ark., 2003).

BEC enfeksiyonu için, insan NoV aşılarında olduğu gibi, VLP'ler kullanılarak aşı geliştirilmesi yönünde görüş ve bilimsel çalışmalar olmakla birlikte, halen ticari bir aşı bulunmamaktadır.

1.7. Tanı

İshal, yeni doğan buzağılar için ölümcül olabilen bir hastalıktır. Birçok patojenin ve çeşitli faktörlerin bu hastalığa sebep olması; klinik bulgulara dayanılarak enfeksiyon etkenlerinin tespit edilmesinin imkansız olması nedeniyle, uygun laboratuvar testlerinin kullanımı sonucunda doğru tanının elde edilmesi büyük önem arz etmektedir.

BEC'lere dair diyagnostik metotların geliştirilmesini zorlaştıran sebeplerin başında, sözkonusu etkenlerin (Murine NoV hariç) hücre kültürlerinde üretilmemesi gelmektedir (Duizer ve ark., 2004). Günümüzde, kompleks 3D (Three-Dimensional-Üç Boyutlu) hücre kültürü sistemlerinin GI ve GII insan NoV üretilmesinde kullanılmaya başlanmış olmasının sonraki yıllarda BEC tespitinde yeni bir bakış açısı sunacağı düşünülmektedir (Scipioni ve ark., 2008).

NoV ve Nebovirusların tespit edilmesinde EM, immunoassay yöntemler ve RT-PCR yöntemleri kullanılmaktadır (Di Felice ve ark., 2016 ve Scipioni ve ark., 2008). EM araştırmacıların virus tespitinde kullandığı temel araçlardan birisidir. BoNoV ve Nebovirusların ilk tespiti de bu yöntemle yapılmıştır (Woode ve Bridger, 1978). Ancak, bu yöntemin yüksek miktarda virus yoğunluğuna ihtiyaç duyması (gram başına $>10^6$ virus partikülü) duyarlılığı azaltan önemli bir faktördür (Atmar ve Estes, 2001). Ayrıca, bu konuda oldukça tecrübeli araştırmacılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemin immuno-elektron mikroskopi (IEM) ya da SPIEM gibi antikor antijen ilişkisine dayanan bir kaç çeşidi de bulunmaktadır (Cho ve Yoon, 2014 ve Scipioni ve ark., 2008).

NoV'ların kapsit proteininin baculovirus sistemlerinde eksprese edilmesi ile yüksek miktarlarda VLP elde edilmekte ve bunlar immunoassaylerde antijen olarak kullanılmaktadır (Jiang ve ark., 1992 ve Mauroy ve ark., 2009a). ELISA, bu testler içinde en yaygın olarak kullanılan testtir. Bu testler EM'ye kıyasla oldukça duyarlıdır. Ancak, çabuk sonuç vermesi ve çok sayıda örneğin kolay işlenmesine olanak sağlaması nedeniyle oldukça kullanışlı olan ELISA sistemlerinin diyagnostik laboratuvarlarda kullanımları, düşük spesifiteleri, bu virusların antijenik farklılıkları nedeniyle duyarlılıkta farklılıkların oluşması gibi faktörlerden etkilenmeleri olasıdır (Di Felice ve ark., 2016). BoNoV ve Nebovirus çalışmalarında kullanılan antikor ve antijen ELISA geliştirildiğine dair bildirimler (Deng ve ark., 2003; Mauroy ve ark., 2009a; Oliver ve ark., 2007b ve Thomas ve ark., 2014) bulunmakla birlikte, günümüzde BoNoV ve Nebovirus için ticari bir kit bulunmamaktadır.

Calicivirüslerle yönelik ilk moleküler çalışmalar insan NoV'a ilişkin olup, birçok epidemiyolojik çalışmanın yapılmasına kolaylık sağlamıştır. Çünkü o zamana kadar, calicivirüslerin tanısı için "gold standart", partiküllerin direkt olarak örneklerden EM kullanılarak tespit edilmesi (Koopmans ve ark., 2003, s:530) olmasına karşın, günümüzde gaita örneklerinde BoNoV ve Nebovirus varlığı daha yüksek duyarlılığa sahip RT-PCR kullanılarak araştırılabilmektedir (Atmar ve Estes, 2001 ve Scipioni ve ark., 2008).

Genetik farklılıklar tüm NoV'ların tek bir primer çifti kullanılarak tespit edilmesini imkansız kılmaktadır. Bu nedenle, bir hayvan türünde NoV varlığını tespit etmek için buna yönelik spesifik primerlerin kullanılması gerekmektedir (Scipioni ve ark., 2008).

RdRp gen bölgesi NoV ve Nebovirus arasında oldukça korunaklı bir bölgedir ve bu bölgeye yönelik dizayn edilmiş birçok primer bulunmaktadır (Park ve ark., 2007 ve Smiley ve ark., 2003). Bu nedenle RdRp gen bölgesine yönelik RT-PCR metodu BoNoV'u tespit etmek için kullanılan temel tanı yöntemidir (Oliver ve ark., 2006b). Ancak, rekombinant suşları tespit etmek için birden fazla bölgenin analiz edilmesi gerekmektedir. Amplikonlardan elde edilen dizin bilgisinin filogenetik analiziyle bu rekombinant virusların tespit edilmesi mümkündür (Scipioni ve ark., 2008).

RT-PCR'ın yerini gitgide daha hızlı ve duyarlı olan qRT-PCR almaktadır. BoNoV ve Nebovirus tespiti için kullanılabilecek qRT-PCR yöntemine ilişkin bildirimler bulunmaktadır (Cho ve ark., 2013; Jor ve ark., 2010; Park ve ark., 2009; Yılmaz ve ark., 2011). Taqman problemlerinin kullanıldığı qRT-PCR, hem virus tespitinin yapılmasını hem de, standart kullanıldıysa, örneklerdeki virus miktarının belirlenmesini sağlamaktadır (Scipioni ve ark., 2008).

1.8. Korunma

Buzağı ishalleri multifaktoriyel bir hastalıktır. Bu faktörlerin etkili olma durumları, doğum öncesi annelerin bakımı, buzağının immünite durumları ve çevresel faktörler ile doğrudan ilişkilidir (Kaplon ve ark., 2013). Hastalığa neden olan patojenlerin bilinmesi, etkilenen çiftliklerin durumlarının belirlenmesi ve daha sonraki müdahalelerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Günümüzde, hastalıkların kontrolü ve önlenmesi; hem hayvan refahı hem de üretici açısından verimin artırılmasını içermektedir (Cho ve Yoon, 2014).

Hastalıklardan korunmada hijyen kurallarının sağlanması, aşı uygulaması, vb. yöntemlere başvurulmaktadır. Günümüzde yeni doğan buzağlarda ishale neden enfeksiyon etkenlerinden olan BRV, BCoV, *C. perfringens* ve *E. Coli* vb. patojenleri içeren aşilar bulunmaktadır ancak BEC içeren bir aşı bulunmamaktadır. Oysa BEC enfeksiyonlarının buzağı ishalleriyle ilgili oldukları kanıtlanmış olup, buzağı ishallerinde ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulması ve buzağların ishale karşı etkin biçimde korunması için, bu virusların aşılar eklenmesi konusunda birçok araştırmacı hemfikirdir (Kaplön ve ark., 2013; Di Felice ve ark., 2016). Bu noktada yapılan bilimsel çalışmalar sonrası geliştirilmesi olası VLP aşıları ya da farklı biyoteknolojik aşı geliştirme çalışmaları, BEC enfeksiyonlarından korunmada önemli katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma ile sığır yetiştiriciliği işletmelerinde önemli ekonomik kayıpların nedeni olan yenidoğan buzağı ishallerinin olası etiyolojik ajanlarından birisi olarak kabul edilen BEC'lerin, işletmelerdeki varlığının/yaygınlığının ortaya konulması ve tespit edilen virusların moleküler karakterizasyonlarının belirlenerek, elde edilen verilerin örnekleme sırasında yetiştirici/işletme sahiplerinden sağlanan, örneklenen buzağlara ve işletmeye ait bilgiler ışığında değerlendirilmesi, bunun sonucunda BEC enfeksiyonlarının Türkiye'deki epidemiyolojisine dair bilgilerin edinilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Gaita örnekleri

Bu çalışmada Aksaray, Amasya, Ankara, Bursa, Çankırı, Denizli, Eskişehir, İzmir, Kırklareli ve Şanlıurfa illerindeki entansif işletmeler (11 adet) ile küçük aile işletmelerinde (48 adet) yetiştirilen klinik olarak ishal tablosu sergileyen 0-6 ay yaş arasındaki buzağılara ve 7 aylık bir sığra ait toplam 167 adet ishalleri gaita örneği kullanıldı. Bu çalışma kapsamında test edilen örneklerin 104 tanesi entansif işletmelerden, 63 tanesi ise küçük aile işletmelerinden, ilgili işletme hekimlerinin de katkılarıyla, temin edildi (Ek-1, Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Entansif işletmeler ve örneklenen buzağılara ilişkin bilgiler

İşletme Kodu	Şehir	Geliş Tarihi	Toplam Hayvan Sayısı	Test Edilen Örnek Sayısı	Yaş (Gün)
I	Ankara	Eylül 2002	570	5	3-15
II	Aksaray	Nisan 2006	1100	4	9-18
		Şubat 2008	1445	7	4-23
		Şubat 2016	3909	6	15-39
III	Kırklareli	Kasım 2011	434	4	1-70
		Ocak 2012	2219	15	10-124
IV	İzmir	Nisan 2013	230	3	0-7
		Kasım 2013	230	2	10-14
		Temmuz 2014	230	2	20-150
		Ocak 2015	240	4	20-25
		Ocak 2016	250	3	15
V	Eskişehir	Temmuz 2013	2714	13	7-10
VI	İzmir	Eylül 2014	3000	14	8-45
VII	Amasya	Ocak 2015	1289	5	3-4
VIII	Şanlıurfa	Ocak 2015	8138	3	8-9
IX	İzmir	Şubat 2015	450	9	10-15
X	İzmir	Mart 2015	400	1	15
XI	Ankara	Kasım 2015	182	4	30-150

Çizelge 2.2. Küçük aile işletmeleri ve örneklenen buzağılara ilişkin bilgiler

İşletme Kodu	Şehir	Geliş Tarihi	Test Edilen İşletme Sayısı	Test Edilen Örnek Sayısı	Yaş (Gün)
I-XVI*	Bursa	Mart 2009	16	21	11-210
XVII	Ankara	Nisan 2009	1	1	10
XVIII-XXIV		Mart 2014	7	9	2-15
XXV-XXVII		Mayıs 2014	3	4	7-25
XXVIII		Temmuz 2014	1	1	7
XXIV-XXX		Aralık 2014	2	2	10-15
XXXI-XXXII		Mart 2015	2	3	7-20
XXXIII		Nisan 2015	1	2	4
XXXIV	Denizli	Mart 2013	1	3	7-10
XXXV	İzmir	Nisan 2013	1	2	0-7
XXXVI-XXXIX		Temmuz 2014	4	4	9-15
XL	Şanlıurfa	Mart 2014	1	3	7-10
XLI-XLVI	Çankırı	Mart 2015	6	6	1-30
XLVII-XLVIII		Mart 2016	2	2	5-10

* Bu işletmeden temin edilen iki örneğin yaş bilgisi elde edilememiştir.

Sağlanan dışkı örneklerinde BEC (BoNoV ve Nebovirus) tanısı için PCR temelli testler kullanıldı. Ayrıca -her ne kadar bu çalışma da temel amaç olarak belirlenmemiş ise de- elde edilen verilerin daha sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi için dışkı örnekleri olası diğer enteropatojenler (BRV, BCoV, *E. coli* ve *C. parvum*) yönünden de test edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Gaita Örneklerinin Hazırlanması

Gaita örnekleri, PBS (Phosphate Buffer Saline) ile %10-%20 oranında dilüe edilerek, +4 °C’de, 1200 xg’de, 20 dakika (dk) santrifüj edildikten sonra süpernatant steril bir stok tüpüne alındı. Santrifüj sonunda üst sıvıdan 250 µl alınarak RNAase free steril 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı. Geriye kalan miktar ise, steril tüpler içerisinde -80 °C’ de saklandı.

2.2.2. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

BEC'lerin RNA'sını elde etmek amacıyla, RNA ekstraksiyonu TRIzol® LS Reagent (Thermo Fisher Scientific, 10296-028) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla;

1. Gaita örneklerinin santrifüjü sonrası üst sıvıdan 250 µl alınarak steril 1,5 ml'lik tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 750 µl TRIzol® LS Reagent solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk beklendi.
2. Ardından üzerine 200 µl kloroform eklendi ve elle şiddetli bir şekilde yaklaşık 10 saniye (s) çalkalandı ve oda sıcaklığında 2-15 dk beklemeye bırakıldı.
3. Daha sonra örnekler 12000 xg'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası üstte oluşan sulu fazdan yaklaşık 525 µl yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarıldıktan sonra üzerine %100'lük isopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk beklemeye bırakıldı.
5. Daha sonra örnekler 12000 xg'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası eppendorf tüpün içerisindeki isopropanol, tüpün içerisinde sadece pellet kalacak şekilde, tamamen uzaklaştırıldı.
7. Daha sonra eppendorf tüpün içerisine -20 °C'de %75'lik ethanol eklendi ve vortekslendi.
8. Daha sonra örnekler 7500 xg'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
9. Tüplerin içerisindeki ethanol tamamen uzaklaştırıldı ve tüplerin içinde kalan pellet kurumaya bırakıldı.
10. Kuruyan pellet 20-50 µl nükleaz free su ile sulandırıldıktan sonra ısı bloğunda 55 °C'de 10-15 dk inkübe edildi.
11. Son olarak tüpler PCR uygulamalarında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.3. BEC Tanısı için PCR Tekniği

BEC tanısı amacıyla, Çizelge 2.3’de bildirilen BoNoV ve Nebovirusun RdRp gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak Onestep-RT-PCR’ı takiben nested-PCR tekniği kullanıldı.

PCR’ın birinci turu Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Reddy Miks (#AB-1454/LD/B); ikinci turu ise Thermo Scientific Taq DNA Polimeraz (#EP0402) kullanılarak yapıldı. Onestep-RT-PCR’ın ve nested-PCR’ın miks bileşenleri ve döngülerine ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.4’de ve Çizelge 2.5’de gösterildi.

Çizelge 2.3. RdRp gen bölgesi tespitinde kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri

Primer Adı	Primer Dizini (5’→3’)	Lokasyon*	Ürün (bp)	Referans
CBECU-F	AGT TAY TTT TCC TTY TAY GGB GA	4555-4577	532	Smiley ve ark. (2003)
CBECU-R	AGT GTC TCT GTC AGT CAT CTT CAT	5087-5063		
nCBECU-F	GTC GAC GGY CTK GTS TTC CT	4702-4722	326	Park ve ark. (2006)
nCBECU-R	CAC AGC GAC AAA TCA TGA AA	5028-5008		
NBU-F	TTT CTA ACY TAT GGG GAY GAY G	4518-4539	549	Smiley ve ark. (2003)
NBU-R	GTC ACT CAT GTT TCC TTC TCT AAT	5066-5043		
nNBU-F	CGC TCC GTG TGG GAT CAC GA	4788-4808	194	Park ve ark. (2006)
nNBU-R	GCA CGG GCT TCT TCT AGA GA	4981-4962		

*Primer lokasyonları Bo/Newbury2/1976/UK (GenBank AF097917) göre belirlenmiştir.

Çizelge 2.4. OneStep-RT-PCR birinci tur miks bileşenleri ve programı

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	
Verso Enzim Mix	0,5	42 °C’de 60 dk 95 °C’de 5 dk 95 °C’de 1 dk (*) °C’de 1 dk 72 °C’de 1 dk 72 °C’de 7 dk 35 siklus
2X 1-Step ReddyMiks	12,5	
RT Enhancer	1,25	
Primer F(10 pmol/µl)	0,5	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5	
Nükleaz Free Su	6,75	
RNA	3	
Toplam	25	

* Farklı PCR uygulamalarında kullanılan annealing dereceleri metinde bildirilmiştir.

Çizelge 2.5. Nested-PCR miks bileşenleri ve programı

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	
Taq DNA polymerase (5u/µl)	0.25	
10 X Taq buffer	3	
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	94 °C'de 5 dk
10 mM dNTP mix	0,5	94 °C'de 1 dk
Primer F (10 pmol/µl)	0,5	50 °C'de 1 dk
Primer R (10 pmol/µl)	0,5	72 °C'de 1 dk
Nükleaz Free Su	19,85	72 °C'de 7 dk
RNA	3	
Toplam	30	

BoNoV ve Nebovirus RdRp gen bölgeleri için uygulanan oneStep-RT-PCR için kullanılan primerlerle ilgili olarak annealing derecelerinde farklılıklar olmakla birlikte, cDNA sentez aşaması 42 °C'de 60 dk, başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 5 dk, denatürasyon aşaması 95 °C'de 1 dk, uzama aşaması 72 °C'de 1 dk ve son uzama aşaması 72 °C'de 7 dk olarak, toplam her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu (Çizelge 2.4). Bu uygulamalarda annealing derecesi olarak BoNoV için 54°C ve Nebovirus için ise 50 °C uygulandı. Nested-PCR için kullanılan primerlerle ilgili olarak annealing dereceleri aynı olmakla birlikte, başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 5 dk, denatürasyon aşaması 94 °C'de 1 dk, annealing aşaması 50 °C'de 1 dk, uzama aşaması 72 °C'de 30 s ve son uzama aşaması 72 °C'de 7 dk olarak, toplam her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu (Çizelge 2.5).

2.2.4. Gaita Örneklerinin Diğer Enteropatojenler Yönünden Test Edilmesi

Tanı materyallerin BRV, BCoV, *E. coli* ve *C. parvum* yönünden test edilmesi amacıyla;

- BRV için RT-PCR ve/veya ELISA (BioX Digestive Kit (Bio K 348/5))
- BCoV için RT-PCR ve/veya ELISA (BioX Digestive Kit (Bio K 348/5))
- *E. coli* için ELISA (BioX Digestive Kit (Bio K 348/5))
- *C. parvum* için ELISA (BioX Digestive Kit (Bio K 348/5)) ve/veya karbol fuksin boyama yöntemleri kullanıldı.

Ticari ELISA kitlerinin kullanımı, firma tarafından bildirilen yöntem göre yapıldı. Karbol Fuksin kullanılarak yapılan *C. parvum* tanı çalışması ise Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Serpil Nalbantoğlu tarafından gerçekleştirildi.

2.2.5. BEC Kapsit Gen bölgesinin RT-PCR Tekniği İle Tespit Edilmesi

2.2.5.1. BoNoV Kapsit Gen bölgesinin RT-PCR Tekniği İle Tespit Edilmesi

2.2.5.1.1. Viral RNA'nın Revers Transkripsiyonu

Ekstraksiyon sonrasında elde edilen viral RNA'nın revers transkripsiyonu amacıyla Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Lot: #K1622) kullanıldı. İki aşamada yapılan cDNA sentezi, iki farklı karışımdan oluşan ve birbirini takip eden iki reaksiyon sonucu gerçekleştirildi (Çizelge 2.6). Bu amaçla;

1. İlk olarak, 3 µl nuclease free su ve 0,5 µl Random Hexamer Primer (100 µM, 0,2 µg/µl) den oluşan 3,5 µl'lik karışıma 3 µl viral RNA eklenip ısı döngüsü cihazında (termal cycler) (Biorad, Amerika) RNA ikincil yapılarının açılması için 70 °C'de 5 dk tutuldu.
2. Ardından buz üzerine alınıp soğutulan örneklerin üzerine kit içinde bulunan 2 µl → 5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl → 10mM dNTP Mix, 0,5 µl → RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) karışımdan eklendi. Ardından Çizelge 2.6'deki ısı döngüsüne tabi tutuldu.

Çizelge 2.6. cDNA sentezi için kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüler

Sıra	Isı Değeri (°C)	Zaman (dk)	Döngü Sayısı
1	25	10	1
2	37	60	1
3	70	5	1

2.2.5.1.2. BoNoV Kapsit Bölgesi için PCR Tekniği

BoNoV'un kapsit gen bölgesine ilişkin ürünlerin elde edilmesi amacıyla, Çizelge 2.7'de bildirilen primerler ve optimizasyonu takiben PCR uygulandı. Çalışmada kullanılan PCR miks bileşenleri ve PCR döngülerine ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.8 ve Çizelge 2.9'de gösterildi.

Çizelge 2.7. BoNoV kapsit gen bölgesi tespitinde kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri

Primer Adı	Primer Dizini (5'→3')	Lokasyon	Ürün (bp)	Referans
NAcap-F	TCC TTC CCG ATT TTG TAA	5045-5062	1615	Han ve ark. (2004)
NAcap-R	AACCCCGCCGAGAAGAGAGGAGAA	6659-6636		
nCBECU-F	GTC GAC GGY CTK GTS TTC CT	4702-4722	781*-793	Park ve ark. (2006) Di Martino ve ark. (2014)
BoNoVcap-A	CACATGGGGGAACTGAGTGG	5463-5482* 5475-5494		

* Primer lokasyonu Bo/Jena/80/DE (GenBank AJ011099) göre diğer lokasyonlar Bo/Newbury2/1976/UK (GenBank AF097917) göre belirlenmiştir.

PCR tekniği Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA-Polimeraz (#F-530S); kullanılarak gerçekleştirildi. PCR'ın miks bileşenleri ve döngülerine ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.8 ve Çizelge 2.9'da gösterildi.

Çizelge 2.8. RT-PCR miks bileşenleri ve programı

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	
Phusion DNA polymerase	0,2	98°C'de 30 s 98°C'de 10 s 58,6 °C'de 30 s 72 °C'de 40 s 72 °C'de 10 dk } 35 siklus
5X Phusion HF buffer	4	
10 mM dNTP mix	0,4	
Primer F (NAcap-F) (10 pmol/µl)	1	
Primer R (NAcap-R) (10 pmol/µl)	1	
Nükleaz Free Su	9,4	
cDNA	4	
Toplam	20	

Çizelge 2.9. RT-PCR miks bileşenleri ve programı

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	
Taq DNA polymerase (5u/ µl)	0,25	
10 X Taq buffer	3	
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	94 °C'de 2 dk
10 mM dNTP mix	0,5	94 °C'de 45 s
Primer F (nCBECU-F) (10 pmol/µl)	0,5	48 °C'de 45 s
Primer R (BoNoVcap-A) (10 pmol/µl)	0,5	72 °C'de 1 dk
Nükleaz Free Su	19,85	72 °C'de 10 dk
RNA	3	
Toplam	30	

2.2.5.2. Nebovirus Kapsit Gen bölgesinin RT-PCR Tekniği İle Tespit Edilmesi

2.2.5.2.1. Viral RNA'NIN Revers Transkripsiyonu

Ekstraksiyon sonrasında elde edilen viral RNA'nın revers transkripsiyonu amacıyla Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Lot: #K1622) kullanıldı. Nebovirus kapsit bölgesi için viral RNA'dan cDNA eldesi, iki farklı karışımdan oluşan ve birbirini takip eden iki reaksiyon sonucu gerçekleştirildi (Çizelge 2.10).

1. Bu amaçla 2.5 µl nuclease free su ve 1 µl NB-Cap R primerinden oluşan 3,5 µl'lik karışıma 3 µl viral RNA eklenip ısı döngüsü cihazında (termal cyclers) (Biorad, Amerika) RNA ikincil yapılarının açılması için 65 °C'de 5 dk inkube edildi.
2. Ardından buz üzerine alınıp soğutulan örneklerin üzerine kit içinde bulunan 2 µl → 5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl → 10mM dNTP Mix, 0,5 µl → RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) karışımdan eklenerek Çizelge 2.10'daki ısı döngüsüne tabi tutuldu. cDNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Çizelge 2.10. cDNA sentezi için kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüler

Sıra	Isı Değeri (°C)	Zaman (dk)	Döngü Sayısı
1	42	60 dk	1
2	70	10 dk	1

2.2.5.2.2. Nebovirus Kapsit Bölgesi için PCR Tekniği

Nebovirusun kapsit gen bölgesine ilişkin ürünlerin elde edilmesi amacıyla, Çizelge 2.11’de bildirilen primerler ve optimizasyonu takiben PCR uygulandı. Çalışmada kullanılan gen bölgeleri için PCR miks bileşenleri ve PCR döngüsüne ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.12’de gösterildi.

Çizelge 2.11. Nebovirus kapsit gen bölgesi tespitinde kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri

Primer Adı	Primer Dizini (5’→3’)	Lokasyon	Ürün (bp)	Referans
NBcap-F3	GTG ATT TAA TTA GAG AAG GAAAC	5034-5057	1692	Han ve ark. (2004)
NBcap-R	CGT AGC AGC ACT AGC CAT A	6726-6708		

PCR tekniği Sigma Jump Start DNA Taq Polimeraz (D9307) kullanılarak gerçekleştirildi. PCR’in bileşenleri ve döngülerine ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.12 ’de gösterildi.

Çizelge 2.12. RT-PCR miks bileşenleri ve programı

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	
Jump Start DNA Taq Polimeraz	0,3	94 °C’de 2 dk 94°C’de 30 s 55°C’de 30s 72°C’de 1 dk 30s 72°C’de 10 dk } 35 siklus
10X PCR buffer	3	
10 mM dNTP mix	0,8	
Primer F (10 pmol/µl)	0,8	
Primer R (10 pmol/µl)	0,8	
Nükleaz Free Su	21,3	
cDNA	3	
Toplam	30	

2.2.6. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerini görüntülemek için, ethidium bromid içeren (Sigma, ABD) %1'lik agaroz jel (Prona, EU) hazırlandı. Hem tank tamponu olarak, hem de agaroz jelinin hazırlanmasında TAE (Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) tampon solüsyonu kullanıldı. 0,5 x TAE solüsyonu içinde ısı yardımıyla (mikro dalga fırın) çözülen agaroz, bir miktar soğutulduktan sonra üzerine ethidium bromide (0,5 µg/ml, Sigma, ABD) solüsyonu eklendi. Soğutulan bu agaroz jel karışımı, jel tarakları yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısına döküldü. Donan agaroz jeldeki taraklar çıkarılarak, elektroforez tankına yerleştirildi. Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Reddy Miks kullanılan PCR örnekleri doğrudan, diğer PCR ürünleri ise yükleme boyası (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) ile 1 kısım boyaya 5 kısım PCR ürünü olmak üzere karıştırılarak tarakların çıkarılmasıyla oluşan kuyucuklara dikkatlice konuldu. Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için 100 bp'lik marker (Fermentas, Litvanya) solüsyonundan (1 kısım stok marker + 1 kısım yükleme boyası + 4 kısım su) her bir kuyucuğa 1 µl olarak yüklendi. Daha sonra ürünler elektrik akımına tabi tutularak (8 volt/cm) yaklaşık 30 dk sonra jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) kullanılarak PCR sonucu oluşan DNA bantları görüntülendi.

2.2.7. Dizin Analizi

PCR ürünlerinin bir kısmının dizin analizi ticari bir firmadan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilirken, bir kısmının dizin analizi ise Budapeşte “Institute for Veterinary Medical Research”de Dr. Krisztian Banyai eşliğinde “Random PCR” tekniği sonrasında “Yeni Nesil Sekanslama (Ion Torrent)” (New England Biolabs, Ipswich, Amerika) işlemi yapılarak elde edilmiştir.

2.2.8. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Analiz sonrası elde edilen ham veriler, National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) web sayfasında sağlanan (BankIt: GenBank Submissions) hizmetten yararlanılarak tanımlandı. Dizinler Aliview (Larsson, 2014) ve MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) yazılımı (Edgar, 2004) kullanılarak kendi aralarında karşılaştırıldı. Aynı programın çoklu hizalama (multiple alignment) özelliğinden yararlanılarak Gen Bankasından elde edilen diğer referans viruslarla ve referans olmayan diğer ülkelerden bildirilen yerel virusların kısmi ve tam genom dizileri ile hizalandı. Nükleotit ve aminoasit benzerlik tabloları CLC Main Workbench 7 (CLCbio-Qiagen, Aarhus, Denmark) kullanılarak hazırlandı.

2.2.9. Filogenetik Analiz ve Rekombinasyon Analizi

Diğer ülkelerden tespit edilen saha suşlarının dizinleri ile çalışmada elde edilen saha suşları arasındaki genetik yakınlığın ortaya konulması amacıyla nükleik asit dizinleri üzerinden gerçekleştirilen filogenetik analiz için MEGA versiyon 6.0 (Tamura ve ark., 2013) programı kullanıldı. Bu amaçla FASTA formatına çevrilen tüm verilere Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Analizde p-distance parametresi kullanıldı. Rekombinasyon analizi, Simplot Software Version 3.5.1 (Lole ve ark., 1999) ile yapıldı.

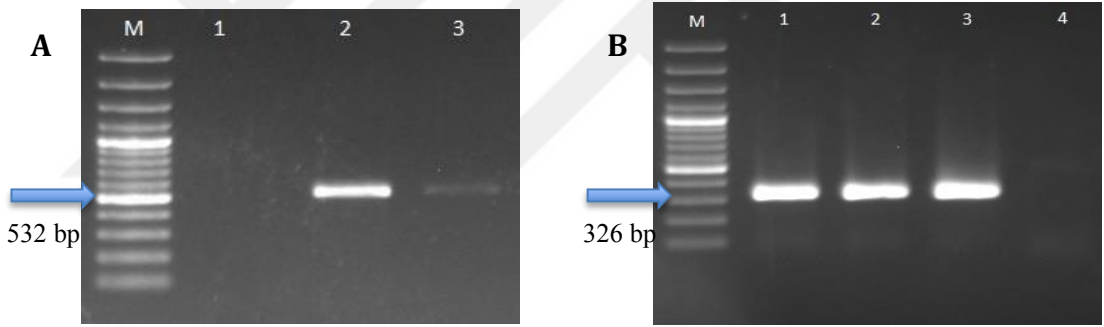
2.2.10. İstatiksel Analiz

Virus varlığının mevsimler ve yaş grupları arasında farklılığının belirlenmesinde ki-kare analizi kullanılmıştır. Farklılığın anlamlı bulunduğu durumlarda Bonferroni düzeltmeli posthoc analizler yapıldı. Tüm istatistiksel analizler %5 hata payı ile incelendi. SPSS 14.01 paket programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

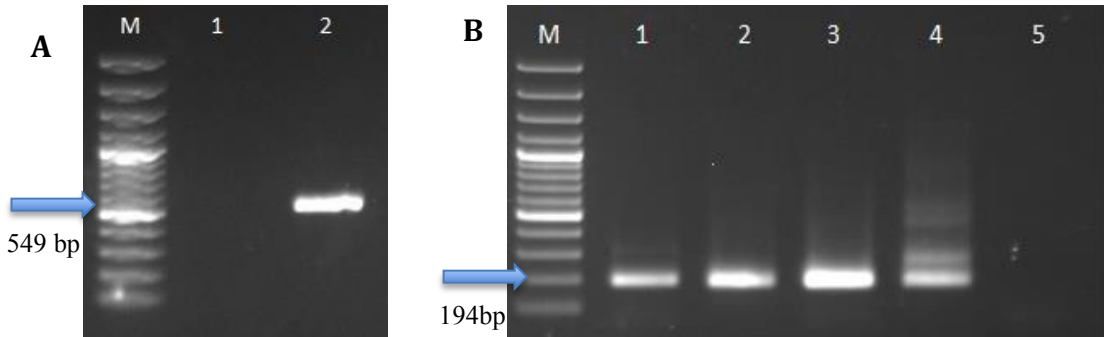
3.1. BEC tanısı için PCR sonuçları

BEC tanısı amacıyla, toplam 167 gaita örneği BoNoV ve Nebovirus'un RdRp gen bölgelerini hedef alan primerler kullanılarak uygulanan Onestep-RT-PCR'ı takiben nested-PCR ile test edildi. Beklenen büyüklüklerde ürün oluşumuna dayanılarak Onestep-RT-PCR sonucunda sekiz örnek BoNoV (532 bp) ve altı örnek Nebovirus (549 bp) yönünden pozitif bulundu. Nested PCR sonucunda ise 56 örnekte BoNoV (326 bp) ve 37 örnekte Nebovirus (194 bp) olmak üzere toplam 76 örnekte BEC varlığı saptandı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Bu örneklerden 17'si söz konusu her iki etken yönünden de pozitif olarak tespit edildi.



Şekil 3.1. BoNoV onestep-RT-PCR ve nested-PCR sonucu jel görüntüleri

A. onestep-RT-PCR M: DNA merdiveni (100 bp) 1: Negatif Kontrol, 2 ve 3: Pozitif örnekler. B. nested-PCR M: DNA merdiveni (100 bp), 1, 2 ve 3: Pozitif örnekler, 4: Negatif Kontrol.



Şekil 3.2. Nebovirus onestep-RT-PCR ve nested-PCR sonucu jel görüntüleri

A. onestep-RT-PCR M: DNA merdiveni (100 bp), 1: Negatif Kontrol, 2: Pozitif örnek. B. nested-PCR M: DNA merdiveni (100 bp), 1, 2, 3 ve 4: Pozitif örnekler, 5: Negatif Kontrol.

Bu çalışma kapsamında 11 entansif işletmeden temin edilen 104 gaita örneğinin 53'ünde (%50,9) (Çizelge 3.1), 48 küçük aile işletmesinden temin edilen 63 gaita örneğinin ise 23'ünde (%36,5) BEC tespiti yapıldı. Bu 48 küçük aile işletmesinin 20'sinde (%41,6) BEC tespit edilirken; 15'inde BoNoV, 11'inde Nebovirus varlığı saptandı (Çizelge 3.2).

RdRp gen bölgesi yönünden pozitif bulunan örneklerin BoNoV ve Nebovirus bakımından yaş dağılımına bakıldığında her iki virusun da en yaygın olarak 0-1 haftalık (%53,1; %34,3) yaş aralığında, bunu takiben 1-2 haftalık (%37,7; %22,6) ve 2-3 haftalık (%25; %21,4) yaş aralığında gözlemlendiği saptandı (Çizelge 3.3). Bu sonuç BoNoV açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0.038$); Nebovirus açısından anlamlı bulunmadı ($p=0.476$).

Çizelge 3.1. Entansif işletmelerde yetiştirilen buzağılara ilişkin test sonuçları

İşletme Kodu	Şehir	Geliş Tarihi	Test Edilen Örnek Sayısı	Test Sonuçları			İşletmede Tespit Edilen Diğer Enteropatojenler
				BEC	BoNoV	Nebovirus	
I	Ankara	Eylül 2002	5	(-)	(-)	(-)	BRV
II	Aksaray	Nisan 2006	4	4	4	(-)	BRV, BCoV
		Şubat 2008	7	7	7	4	BRV, BCoV, <i>C. parvum</i>
		Şubat 2016	6	3	3	(-)	BRV, <i>C. parvum</i>
III	Kırklareli	Kasım 2011	4	(-)	(-)	(-)	BRV, BCoV, <i>C. parvum</i>
		Ocak 2012	15	3	3	(-)	BRV, BCoV, <i>C. parvum</i>
IV	İzmir	Nisan 2013	3	2	2	(-)	BRV, BCoV
		Kasım 2013	2	1	1	(-)	BCoV, <i>C. parvum</i>
		Temmuz 2014	2	1	1	1	<i>C. parvum</i>
		Ocak 2015	4	(-)	(-)	(-)	<i>C. parvum</i>
		Ocak 2016	3	3	3	(-)	<i>C. parvum</i>
V	Eskişehir	Temmuz 2013	13	3	2	1	BRV
VI	İzmir	Eylül 2014	14	12	5	12	BRV, <i>C. parvum</i>
VII	Amasya	Ocak 2015	5	2	(-)	2	BRV, BCoV
VIII	Şanlıurfa	Ocak 2015	3	2	2	(-)	BRV, BCoV
IX	İzmir	Şubat 2015	9	7	4	5	BRV, BCoV, <i>C. parvum</i>
X	İzmir	Mart 2015	1	1	(-)	1	BRV, <i>C. parvum</i>
XI	Ankara	Kasım 2015	4	2	2	(-)	BCoV
Toplam			104	53	39	26	

Çizelge 3.2. Küçük aile işletmelerinde yetiştirilen buzağılara ilişkin test sonuçları

İşletme Kodu	Şehir	Geliş Tarihi	Test Edilen İşletme Sayısı	Test Edilen Örnek Sayısı	BEC pozitif işletme sayısı	BoNoV pozitif işletme sayısı	Nebovirus pozitif işletme sayısı
I-XVI	Bursa	Mart 2009	16	21	4	3	1
XVII	Ankara	Nisan 2009	1	1	(-)	(-)	(-)
XVIII-XXIV		Mart 2014	7	9	2	2	1
XXV-XXVII		Mayıs 2014	3	4	2	(-)	2
XXVIII		Temmuz 2014	1	1	1	1	(-)
XXIV-XXX		Aralık 2014	2	2	(-)	(-)	(-)
XXXI-XXXII		Mart 2015	2	3	1	1	(-)
XXXIII*		Nisan 2015	1	2	1	1	(-)
XXXIV	Denizli	Mart 2013	1	3	(-)	(-)	(-)
XXXV*	İzmir	Nisan 2013	1	2	1	1	1
XXXVI-XXXIX		Temmuz 2014	4	4	2	1	1
XL	Şanlıurfa	Mart 2014	1	3	1	1	1
XLI-XLVI	Çankırı	Mart 2015	6	6	3	2	2
XLVII-XLVIII		Mart 2016	2	2	2	2	2
Toplam			48	63	20	15	11

*Bu işletmelerde BoNoV yönünden ikişer buzağı pozitif bulunmuştur.

Çizelge 3.3. BEC, BoNoV ve Nebovirus pozitif bulunan örneklerin yaş dağılımı

Yaş	Materyal Sağlanan Hayvan Sayısı	BEC (%)	BoNoV (%)	Nebovirus (%)
0-1 hafta	32	21 (65,6)	17 (53,1)	11 (34,3)
1-2 hafta	61	30 (49,2)	23 (37,7)	14 (22,6)
2-3 hafta	28	12 (42,9)	7 (25)	6 (21,4)
3-4 hafta	14	6 (42,9)	5 (35,7)	3 (21,4)
1-2 ay	18	5 (27,8)	2 (11,1)	3 (16,7)
2-3 ay	2	(-)	(-)	(-)
3-4 ay	4	1	1 (25)	(-)
4-5 ay	5	(-)	(-)	(-)
6 ay üstü	1	1	1 (100)	(-)
yaşı bilinmeyen	2	(-)	(-)	(-)
Toplam	167	76 (45,5)	56 (33,5)	37 (22,1)

Elde edilen verilere göre BEC varlığının mevsimsel dağılımı değerlendirildiğinde, en fazla sonbahar (%51,7), bunu takiben kış (%50), ilkbahar (%42,2) ve yaz (%35) mevsimlerinde tespit edildiği gözlemlendi. En yaygın BoNoV

tespiti ise kış (%40,7) mevsimini takiben ilkbahar (%32,8), sonbahar (%27,6) ve yaz (%25) mevsiminde yapıldı. Nebovirus ise en fazla sonbahar (%41,4) mevsiminde olmakla birlikte, kış (%20,4), ilkbahar (%17,2) ve yaz (%15) mevsimlerinde tespit edildi (Çizelge 3.4). Bu sonuçlar Nebovirus için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,05$), BoNoV için istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,496$).

Çizelge 3.4. BEC, BoNoV ve Nebovirus pozitif bulunan örneklerin mevsimsel dağılımı

Mevsim	BEC	BoNoV	Nebovirus
Sonbahar	%51,7 (15/29)*	%27,6 (8/29)	%41,4 (12/29)
Kış	% 50 (27/54)	%40,7 (22/54)	%20,4 (11/54)
İlkbahar	%42,2 (27/64)	%32,8 (21/64)	%17,2 (11/64)
Yaz	%35 (7/20)	%25 (5/20)	%15 (3/20)

* Pozitif bulunan hayvan sayısı/Test edilen hayvan sayısı

3.2. Gaita Örneklerinin Diğer Enteropatojenler Yönünden Test Sonuçları

Çalışmada kullanılan gaita örnekleri miks enfeksiyonun varlığının ortaya konması amacıyla BRV, BCoV, *E.coli* ve *C. parvum* gibi enteropatojenler yönünden test edilmiştir. Bunun sonucunda BRV ve BCoV yönünden test edilen 160 adet örneğin sırasıyla 55 tanesi ve 27 tanesi, *C. parvum* yönünden ise test edilen 105 örneğin 56 tanesi pozitif olarak bulunmuştur (Çizelge 3.5). Test edilen örneklerin hiç birinde *E. Coli* tespiti yapılamamıştır.

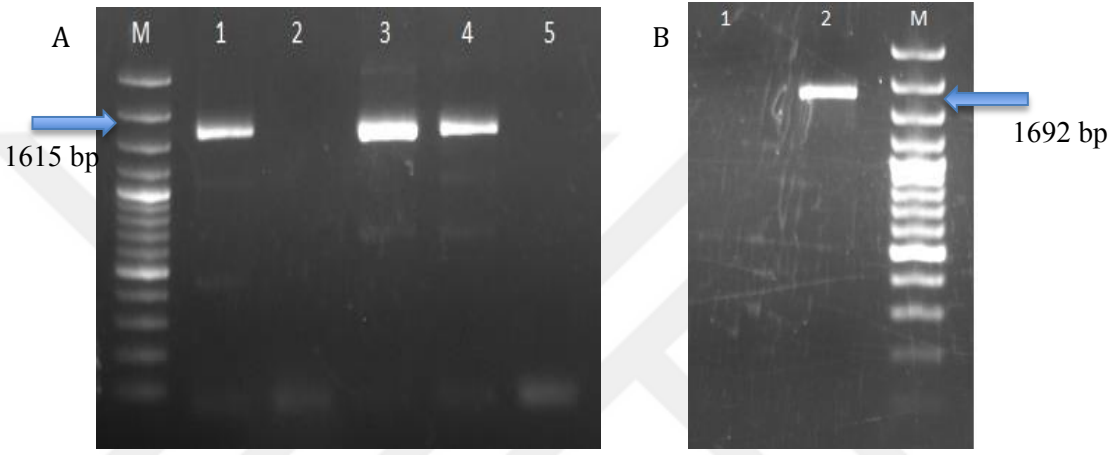
Çizelge 3.5. Örneklenen buzağılarda BEC ve diğer enteropatojenlere ilişkin sonuçlar

		BoNoV		Nebovirus		BRV			BCoV			<i>C. parvum</i>			Toplam
		+	-	+	-	+	-	TE	+	-	TE	+	-	TE	
BoNoV	+			17	39	20	34	2	14	40	2	20	21	15	56
	-			20	91	35	71	5	13	93	5	36	28	47	111
Nebovirus	+	17	20			11	23	3	3	31	3	16	15	6	37
	-	39	91			44	82	4	24	102	4	40	34	56	130
BEC	+					23	49	4	15	57	4	27	31	18	76
	-					32	56	3	12	76	3	29	18	44	91

TE: Test edilmedi.

3.3. BEC'lerin Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Sonuçları

BEC tanısı amacıyla uygulanan nested-PCR sonucunda BoNoV (n=56) ve Nebovirus (n=37) kapsit gen bölgelerinin çoğaltılması için yapılan RT-PCR uygulamalarında dört BoNoV'un tam, bir BoNoV'un kısmi kapsit gen bölgesi yönünden, iki Nebovirusun tam kapsit gen bölgesi yönünden beklenen büyüklükte ürün elde edilebildi.



Şekil 3.3. BoNoV ve Nebovirus tam kapsit gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüleri A. BoNoV M: DNA Merdiveni (100 bp), 1,3,4: Pozitif örnekler; 2:Negatif örnek; 5: Negatif Kontrol. B. Nebovirus M: DNA Merdiveni (100 bp), 1:Negatif Kontrol; 2:Pozitif örnek.

3.4. Dizin Analizi Sonuçları

PCR uygulamaları sonucunda RdRp gen bölgesi yönünden beklenen büyüklükte ürün saptanan 34 BoNoV ve 20 Nebovirus yerel suşu ile kapsit gen bölgesi yönünden beklenen büyüklükte ürün saptanan beş BoNoV ve iki Nebovirus'a ait toplam 61 PCR ürününün dizin analizi gerçekleştirildi. Bu dizinlerden, Nebovirus için uygulanan nested-PCR sonucunda elde edilen ürünler (194 bp) hariç, diğerlerinin Gen Bankasına kaydı yapılarak “*accession*” numaraları alındı (Çizelge 3.6). Dizin analizi sonucunda elde edilen bu ham veriler BLAST programı ile kontrol edildi ve bu verilerin gen bankasında yer alan diğer BoNoV ve Nebovirusların RdRp ve kapsit gen bölgeleriyle eşleştiği gözlemlendi.

Çizelge 3.6. BoNoV ve Nebovirus suşlarının Gen Bankası “accession” numaraları

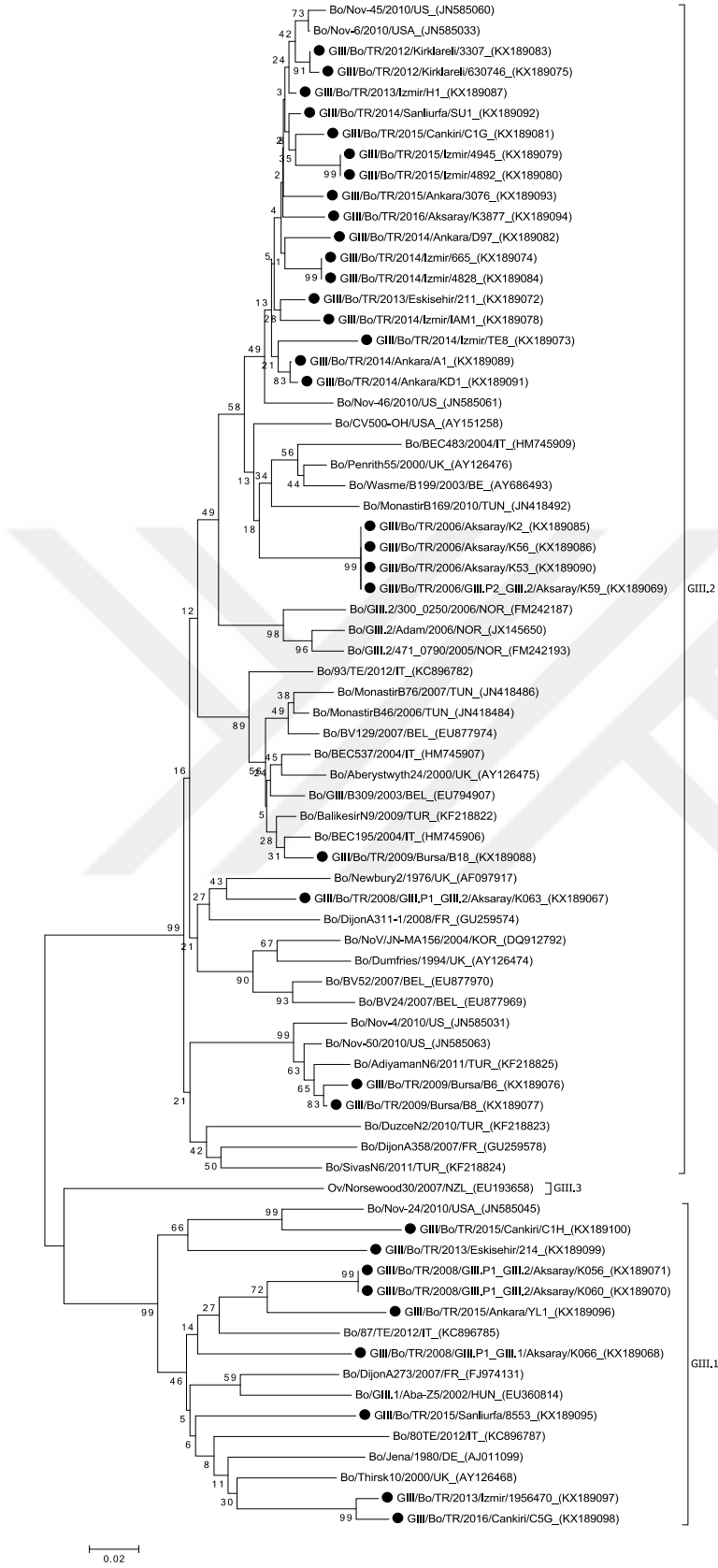
	İşletme	Suş Adı	Gen Bölgesi	Genotip	Accession No
N e b o v i r u s	XVIII**	Bo/AnkaraA4/14/TUR	RdRp-Kapsit	Nebraska	KX184721
	II*	Bo/AksarayK056/08/TUR	RdRp-Kapsit	Nebraska	KX184722
	XL**	Bo/Sanlıurfa2/14/TUR	RdRp	Nebraska	KX184723
	VI*	Bo/Izmir657/14/TUR	RdRp	Nebraska	KX184724
	II*	Bo/AksarayK063/08/TUR	RdRp	Nebraska	KX216596
	VII*	Bo/Amasya9276/15/TUR	RdRp	Nebraska	KX216597
N o r o v i r u s	II*	GIII/Bo/TR/2008/Aksaray/K063	RdRp-Kapsit	GIII.P2_GIII.2	KX189067
	II*	GIII/Bo/TR/2008/Aksaray/K066	RdRp-Kapsit	GIII.P1_GIII.1	KX189068
	II*	GIII/Bo/TR/2006/Aksaray/K59	RdRp-Kapsit	GIII.P2_GIII.2	KX189069
	II*	GIII/Bo/TR/2008/Aksaray/K060	RdRp-Kapsit	GIII.P1_GIII.2	KX189070
	II*	GIII/Bo/TR/2008/Aksaray/K056	RdRp-Kapsit	GIII.P1_GIII.2	KX189071
	V*	GIII/Bo/TR/2013/Eskisehir/211	RdRp	GIII.P2	KX189072
	XXXVI**	GIII/Bo/TR/2014/Izmir/TE8	RdRp	GIII.P2	KX189073
	VI*	GIII/Bo/TR/2014/Izmir/665	RdRp	GIII.P2	KX189074
	III*	GIII/Bo/TR/2012/Kirklareli/630746	RdRp	GIII.P2	KX189075
	VI**	GIII/Bo/TR/2009/Bursa/B6	RdRp	GIII.P2	KX189076
	VIII**	GIII/Bo/TR/2009/Bursa/B8	RdRp	GIII.P2	KX189077
	IV*	GIII/Bo/TR/2014/Izmir/IAM1	RdRp	GIII.P2	KX189078
	IX*	GIII/Bo/TR/2015/Izmir/4945	RdRp	GIII.P2	KX189079
	IX*	GIII/Bo/TR/2015/Izmir/4892	RdRp	GIII.P2	KX189080
	XLII**	GIII/Bo/TR/2015/Cankiri/C1G	RdRp	GIII.P2	KX189081
	XXVIII**	GIII/Bo/TR/2014/Ankara/D97	RdRp	GIII.P2	KX189082
	III*	GIII/Bo/TR/2012/Kirklareli/3307	RdRp	GIII.P2	KX189083
	VI*	GIII/Bo/TR/2014/Izmir/4828	RdRp	GIII.P2	KX189084
	II*	GIII/Bo/TR/2006/Aksaray/K2	RdRp	GIII.P2	KX189085
	II*	GIII/Bo/TR/2006/Aksaray/K56	RdRp	GIII.P2	KX189086
	IV*	GIII/Bo/TR/2013/Izmir/H1	RdRp	GIII.P2	KX189087
	XIII**	GIII/Bo/TR/2009/Bursa/B18	RdRp	GIII.P2	KX189088
	XVIII**	GIII/Bo/TR/2014/Ankara/A1	RdRp	GIII.P2	KX189089
	II*	GIII/Bo/TR/2006/Aksaray/K53	RdRp	GIII.P2	KX189090
	XXV**	GIII/Bo/TR/2014/Ankara/KD1	RdRp	GIII.P2	KX189091
	XL**	GIII/Bo/TR/2014/Sanlıurfa/SU1	RdRp	GIII.P2	KX189092
	XI*	GIII/Bo/TR/2015/Ankara/3076	RdRp	GIII.P2	KX189093
	II*	GIII/Bo/TR/2016/Aksaray/K3877	RdRp	GIII.P2	KX189094
	VIII*	GIII/Bo/TR/2015/Sanlıurfa/8553	RdRp	GIII.P1	KX189095
	XXXII**	GIII/Bo/TR/2015/Ankara/YL1	RdRp	GIII.P1	KX189096
	XXXV**	GIII/Bo/TR/2013/Izmir/1956470	RdRp	GIII.P1	KX189097
	XLIV**	GIII/Bo/TR/2016/Cankiri/C5G	RdRp	GIII.P1	KX189098
	V*	GIII/Bo/TR/2013/Eskisehir/214	RdRp	GIII.P1	KX189099
	XLVIII**	GIII/Bo/TR/2015/Cankiri/C1H	RdRp	GIII.P1	KX189100

* Entansif işletme; ** Küçük aile işletmesi

3.4.1. RdRp Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada kullanılan PCR tekniği ile BoNoV pozitif olarak değerlendirilen 56 örneğin 34'ünün BoNoV RdRp gen bölgesi yönünden dizin analizi gerçekleştirildi. RdRp gen bölgesinin kısmi dizinin filogenetik analizi sonucunda örneklerin iki ayrı ana dalda yer aldıkları; dokuz örneğin GIII.1 genotipinde; 25 örneğin ise GIII.2 genotipinde olduğu gözlemlendi (Şekil 3.4). Filogenetik ağaçta GIII.2'de yer alan suşlardan, Kırklareli/3307, Kırklareli/630746, İzmir/H1, Sanliurfa/SU1, Cankiri/C1G, İzmir/4892, İzmir/4945, Ankara/3076, Aksaray/K3877, Ankara/D97, İzmir/4828, İzmir/665, İzmir/IAM, Eskisehir/211, İzmir/TE8, Ankara/KD1 ve Ankara/A1 Amerika'da tespit edilen suşlar ile; Aksaray/K063 ise Newbury2 ile aynı dalda yer aldı. Aksaray/K53, Aksaray/K59, Aksaray/K56 ve Aksaray/K2 en yakın olarak Tunus, İngiltere, İtalya ve Belçika suşlarıyla ile yakın bulundu. Bursa/B18 ile Bursa/B6 ve Bursa/B8 sırası ile daha önce ülkemizde tespit edilen suşlardan BalıkesirN9 ve AdıyamanN6 suşlarıyla yakın olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada tespit edilen GIII.1'de yer alan suşlardan ise Cankiri/C1H ve Eskisehir/214 Amerika suşuyla aynı dalda gözlenirken, Aksaray/K060 Aksaray/K056 Ankara/YL1 ve Aksaray/K066 suşlarının ise İtalya suşuyla en yakın olduğu belirlendi. Sanliurfa/8553, Cankiri/C5G ve İzmir/1956470 ise GIII.1 referans suşu Jena ile yakın olarak tespit edildi.

Dizin analizi yapılan yerel suşların kendi aralarında ve GIII.1'in prototip virusu olan Bo/Jena/80/DE ile GIII.2'nin prototip virusu olan Bo/Newbury2/76/UK ile olan nükleotit benzerlik ve farklılık oranları Şekil 3.5'de sunuldu. Elde edilen suşların RdRp gen bölgesinin kısmi dizinleri bakımından kendi aralarındaki nükleotit benzerlik oranı %69,58-100, Bo/Jena/80/DE ile olan nükleotit benzerlik oranı %70,63-90,21; Bo/Newbury2/76/UK ile olan nükleotit benzerlik oranı %72,73-91,96 olarak belirlendi. GIII.1'de yer alan yerel suşların GIII.1'in prototip virusu olan Bo/Jena/80/DE ile olan nükleotit benzerlik oranı %81,47-90,21; GIII.2'de yer alan yerel suşların GIII.2'in prototip virusu olan Bo/Newbury2/76/UK ile olan nükleotit benzerlik oranı ise %84,27-91,96 olarak bulundu (Şekil 3.5).

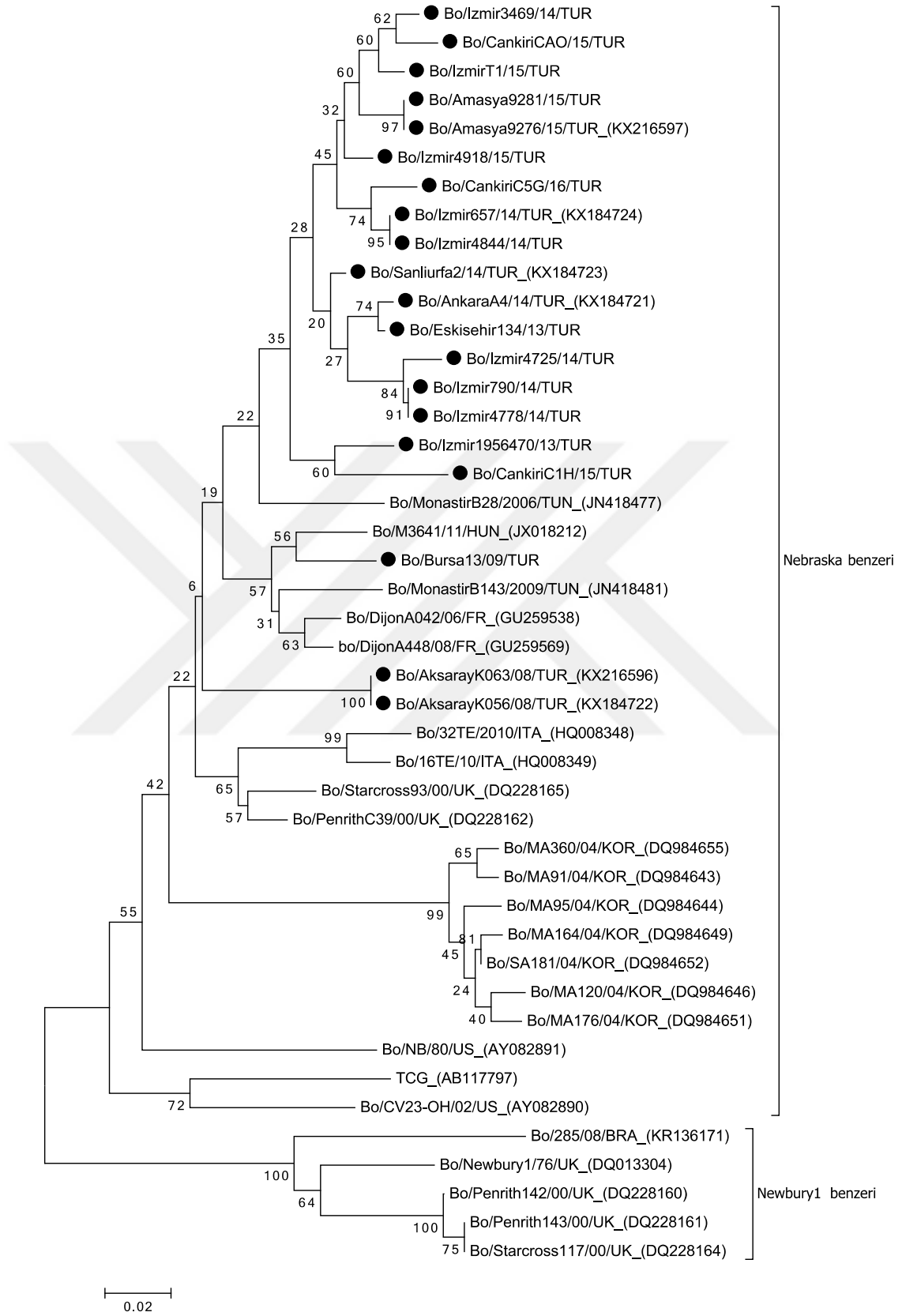


Şekil 3.4. BoNoV RdRp gen bölgesi filogenetik analizi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
Bo/Newbury2/1976/UK	1		0,31	0,34	0,31	0,31	0,33	0,34	0,34	0,32	0,33	0,13	0,09	0,11	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,11	0,11	0,13	0,13	0,14	0,11	0,13	0,15	0,13	0,13	0,14	0,13	0,14	0,12	0,14	0,14	0,14		
Bo/Jena/80/DE	2	74,83		0,21	0,10	0,14	0,10	0,19	0,13	0,13	0,16	0,13	0,30	0,29	0,32	0,30	0,31	0,32	0,32	0,32	0,30	0,31	0,30	0,30	0,31	0,31	0,32	0,33	0,33	0,33	0,30	0,28	0,28	0,31	0,31	0,33	0,31	
GIII/Bo/TR/2015/Cankiri/C1H	3	72,73	81,47		0,25	0,22	0,25	0,18	0,21	0,22	0,24	0,19	0,32	0,33	0,32	0,32	0,33	0,32	0,34	0,33	0,33	0,32	0,32	0,33	0,31	0,34	0,34	0,35	0,35	0,33	0,34	0,34	0,31	0,33	0,34	0,32		
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K060	4	74,48	90,21	79,02		0,13	0,00	0,20	0,12	0,12	0,09	0,16	0,33	0,29	0,29	0,32	0,29	0,29	0,30	0,30	0,32	0,28	0,33	0,33	0,29	0,29	0,30	0,31	0,32	0,32	0,27	0,29	0,30	0,29	0,28	0,29		
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.1/Aksaray/K066	5	74,48	87,41	81,12	88,11		0,13	0,18	0,15	0,16	0,15	0,30	0,29	0,28	0,29	0,29	0,28	0,27	0,27	0,31	0,28	0,30	0,30	0,28	0,28	0,30	0,29	0,30	0,30	0,29	0,30	0,32	0,28	0,28	0,26	0,27		
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K056	6	74,48	90,21	79,02	100,00	88,11		0,20	0,12	0,12	0,09	0,16	0,33	0,29	0,29	0,32	0,29	0,29	0,30	0,30	0,32	0,28	0,33	0,33	0,29	0,29	0,30	0,31	0,32	0,32	0,27	0,29	0,30	0,29	0,28	0,29		
GIII/Bo/TR/2013/Eskisehir/214	7	73,43	83,57	83,92	82,17	84,27	82,17		0,19	0,19	0,25	0,19	0,31	0,32	0,30	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,32	0,30	0,31	0,31	0,29	0,30	0,29	0,31	0,31	0,31	0,30	0,32	0,33	0,30	0,29	0,32	0,30	
GIII/Bo/TR/2016/Cankiri/CSG	8	72,73	87,76	81,47	89,16	86,36	89,16	83,22		0,02	0,15	0,13	0,33	0,33	0,32	0,33	0,31	0,32	0,32	0,32	0,34	0,32	0,33	0,33	0,31	0,31	0,32	0,32	0,33	0,33	0,30	0,31	0,32	0,31	0,31	0,35	0,32	
GIII/Bo/TR/2013/Izmir/1956470	9	72,73	87,76	81,12	89,16	85,66	89,16	83,57	97,90		0,15	0,14	0,31	0,32	0,31	0,31	0,30	0,31	0,30	0,31	0,31	0,33	0,31	0,31	0,32	0,30	0,31	0,32	0,32	0,32	0,29	0,29	0,30	0,30	0,32	0,34	0,31	
GIII/Bo/TR/2015/Sanliurfa/8553	10	73,78	85,31	79,72	91,61	86,71	91,61	79,02	86,36	86,36		0,21	0,34	0,33	0,29	0,33	0,30	0,30	0,30	0,30	0,33	0,29	0,34	0,34	0,30	0,29	0,29	0,30	0,33	0,33	0,29	0,34	0,34	0,29	0,30	0,30		
GIII/Bo/TR/2015/Sanliurfa/8553	11	73,08	88,11	83,22	85,31	86,71	85,31	82,87	87,76	87,06	81,82		0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,29	0,30	0,30	0,29	0,30	0,30	0,30	0,29	0,29	0,31	0,29	0,30	0,30	0,29	0,27	0,29	0,29	0,29	0,30	0,28	
GIII/Bo/TR/2006/GIII.P2_GIII.2/Aksaray/K59	12	87,76	75,17	73,78	73,43	75,52	73,43	74,48	73,43	74,48	72,73	75,17		0,11	0,09	0,00	0,09	0,08	0,09	0,08	0,12	0,09	0,00	0,00	0,10	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,12	0,13	0,08	0,10	0,09	0,08	
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K063	13	91,96	76,22	73,08	76,22	75,87	76,22	74,13	73,08	73,78	73,43	75,52	89,51		0,10	0,11	0,10	0,11	0,12	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,12	0,10	0,12	0,13	0,12	0,12	0,10	0,12	0,10	0,12	0,12	0,11		
GIII/Bo/TR/2016/Aksaray/K3877	14	89,86	74,13	73,78	76,22	76,92	76,22	75,17	73,78	74,48	75,87	75,52	91,26	90,21		0,09	0,04	0,03	0,04	0,04	0,10	0,02	0,09	0,09	0,04	0,02	0,04	0,04	0,04	0,05	0,14	0,16	0,03	0,04	0,06	0,04		
GIII/Bo/TR/2006/Aksaray/K53	15	87,76	75,17	73,78	73,43	75,52	73,43	74,48	73,08	74,13	72,73	74,83	99,65	89,51	91,26		0,09	0,08	0,09	0,08	0,12	0,08	0,00	0,00	0,10	0,07	0,11	0,09	0,10	0,10	0,09	0,12	0,13	0,08	0,10	0,08	0,08	
GIII/Bo/TR/2015/Ankara/3076	16	88,46	74,83	73,43	76,22	75,87	76,22	74,83	74,48	75,17	75,17	75,52	91,61	90,91	96,15	91,26		0,02	0,04	0,03	0,09	0,02	0,09	0,09	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,14	0,15	0,04	0,04	0,06	0,03		
GIII/Bo/TR/2014/Sanliurfa/SU1	17	87,76	73,78	73,78	75,87	76,92	75,87	74,48	74,13	74,83	75,52	75,87	92,31	89,51	96,85	91,96	97,90		0,02	0,02	0,11	0,02	0,08	0,08	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0,03	0,14	0,16	0,02	0,02	0,05	0,02	
GIII/Bo/TR/2014/Ankara/KD1	18	88,11	74,13	72,73	75,52	77,62	75,52	74,83	73,78	74,48	75,17	75,52	91,96	89,16	96,15	91,61	96,50	97,90		0,00	0,12	0,02	0,09	0,09	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	0,14	0,15	0,03	0,03	0,05	0,02	
GIII/Bo/TR/2014/Ankara/A4	19	88,46	74,13	73,08	75,52	77,62	75,52	74,83	73,78	74,48	75,17	75,52	92,31	89,51	96,50	91,96	96,85	98,25	99,65		0,12	0,02	0,08	0,08	0,02	0,02	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,13	0,15	0,03	0,02	0,04	0,03	
GIII/Bo/TR/2009/Bursa/B18	20	89,86	75,17	73,08	74,13	74,83	74,13	73,78	72,38	73,08	73,08	75,87	88,81	90,91	90,56	88,81	91,26	89,86	88,81	89,16		0,10	0,12	0,12	0,12	0,10	0,12	0,12	0,13	0,13	0,10	0,15	0,17	0,11	0,12	0,12	0,10	
GIII/Bo/TR/2013/Izmir/H1	21	89,51	74,48	74,13	76,57	76,57	76,57	75,17	74,13	74,83	76,22	75,17	91,96	90,56	97,90	91,96	97,55	98,25	97,55	97,90	90,21		0,09	0,09	0,03	0,01	0,03	0,03	0,04	0,04	0,13	0,15	0,01	0,03	0,05	0,03		
GIII/Bo/TR/2006/Aksaray/K56	22	87,76	75,17	73,78	73,43	75,52	73,43	74,48	73,43	74,48	72,73	75,17	100,00	89,51	91,26	99,65	91,61	92,31	91,96	92,31	88,81	91,96		0,00	0,10	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,12	0,13	0,08	0,10	0,09	0,08	
GIII/Bo/TR/2006/Aksaray/K2	23	87,76	75,17	73,78	73,43	75,52	73,43	74,48	73,43	74,48	72,73	75,17	100,00	89,51	91,26	99,65	91,61	92,31	91,96	92,31	88,81	91,96	100,00		0,10	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,12	0,13	0,08	0,10	0,09	0,08	
GIII/Bo/TR/2014/Izmir/4828	24	87,06	74,48	73,43	75,87	76,92	75,87	75,87	74,83	74,13	75,52	76,22	90,91	88,81	96,15	90,56	96,50	97,90	97,20	97,55	89,16	96,85	90,91	90,91		0,04	0,04	0,02	0,04	0,04	0,15	0,16	0,04	0,00	0,06	0,03		
GIII/Bo/TR/2012/Kirklareli/3307	25	89,51	74,83	74,48	76,22	76,92	76,22	75,52	74,48	75,17	75,87	76,22	92,66	90,56	97,55	92,66	96,50	97,90	97,20	97,55	90,21	98,95	92,66	92,66	96,50		0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	0,13	0,15	0,00	0,04	0,06	0,03	
GIII/Bo/TR/2014/Ankara/D97	26	88,11	74,13	72,73	75,52	75,52	75,52	76,22	74,13	74,83	75,87	74,83	90,21	89,16	95,80	89,86	96,15	96,15	96,15	96,50	88,81	97,20	90,21	90,21	96,15	96,15		0,04	0,05	0,05	0,04	0,14	0,16	0,04	0,04	0,08	0,05	
GIII/Bo/2015/Cankiri/C1G	27	86,36	73,08	72,38	74,48	75,87	74,48	74,13	73,78	73,78	74,83	75,52	90,91	88,11	95,45	90,56	96,50	97,90	96,50	96,85	88,81	96,85	90,91	90,91	97,20	96,50	95,80		0,03	0,03	0,04	0,16	0,17	0,04	0,02	0,06	0,03	
GIII/Bo/TR/2015/Izmir/4892	28	88,46	73,08	72,03	73,78	75,52	73,78	74,83	73,08	73,78	73,43	75,17	90,91	88,81	95,80	90,56	96,15	97,55	96,15	96,50	88,46	96,50	90,91	90,91	96,15	96,15	95,10	96,85		0,00	0,05	0,15	0,15	0,04	0,04	0,07	0,04	
GIII/Bo/TR/2015/Izmir/4945	29	88,46	73,08	72,03	73,78	75,52	73,78	74,83	73,08	73,78	73,43	75,17	90,91	88,81	95,80	90,56	96,15	97,55	96,15	96,50	88,46	96,50	90,91	90,91	96,15	96,15	95,10	96,85	100,00		0,05	0,15	0,15	0,04	0,04	0,07	0,04	
GIII/Bo/TR/2014/Izmir/IAM1	30	87,06	75,17	73,43	77,27	75,87	77,27	75,52	75,17	75,87	76,22	75,87	91,26	89,16	95,10	90,91	96,15	96,85	96,85	96,50	90,21	96,50	91,26	91,26	96,15	95,45	96,50	95,80	95,10	95,10		0,12	0,14	0,05	0,04	0,06	0,03	
GIII/Bo/TR/2009/Bursa/B8	31	87,76	76,57	72,73	75,87	75,52	75,87	74,13	74,83	75,87	72,38	77,27	88,81	90,21	87,06	88,81	87,41	87,06	87,41	87,76	86,36	88,11	88,81	88,81	86,71	88,11	87,06	85,66	86,71	86,71	88,81		0,01	0,13	0,15	0,12	0,15	
GIII/Bo/TR/2009/Bursa/B6	32	87,06	76,57	72,38	75,17	74,13	75,17	73,43	74,13	75,17	72,38	77,27	88,81	87,76	88,81	85,66	87,76	86,01	85,66	86,01	86,36	84,97	86,71	87,76	87,76	85,31	86,71	85,66	84,27	86,01	86,01	87,41	98,60		0,15	0,16	0,13	0,16
GIII/Bo/TR/2012/Kirklareli/630746	33	89,16	74,83	74,48	76,22	76,92	76,22	75,52	74,48	75,17	75,87	76,22	92,31	90,21	97,20	92,31	96,15	97,55	96,85	97,20	89,86	98,60	92,31	92,31	96,15	99,65	95,80	96,15	95,80	95,80	95,10	88,11	86,71		0,04	0,06</		

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinde yerleşik işletmelerdeki ishalleri buzağılardan toplanan gaita örneklerinde tespit edilen 37 Nebovirusdan 20'sinin dizin analizi gerçekleştirildi. RdRp gen bölgesinin kısmi dizininine dayalı yapılan filogenetik analiz sonucunda 20 suşun tümünün Nebraska-benzeri RdRp genotipine sahip olduğu saptandı (Şekil 3.6). Filogenetik ağaçta, elde edilen suşların tümünün, daha önce Tunus, Fransa, Macaristan ve İtalya'da tespit edilen Nebraska-benzeri suşlar ile birlikte yer aldığı gözlemlendi.

Dizin analizi yapılan yerel suşların RdRp gen bölgesi yönünden kendi aralarında ve diğer Neboviruslar ile olan nükleotit benzerlik ve farklılık oranları Şekil 3.7'de sunuldu. Bu suşların RdRp gen bölgesinin kısmi dizinleri yönünden kendi aralarındaki nükleotit benzerlikleri %86,36-100 oranında tespit edildi. Elde edilen suşların prototip viruslar olan Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US arasındaki nükleotit benzerlikleri ise sırasıyla, %75,32-80,52 ve %82,47-87,01 olarak saptandı. (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Nebovirus RdRp gen bölgesi yönünden filogenetik analizi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45				
Bo/NB/80/US	1		0,24	0,17	0,17	0,17	0,20	0,15	0,17	0,17	0,17	0,17	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,13	0,13	0,15	0,17	0,16	0,17	0,18	0,15	0,15	0,30	0,39	0,15	0,21	0,21	0,19	0,19	0,18	0,19	0,18	0,20	0,29	0,29	0,28				
Bo/Newbury1/76/UK	2	79,22		0,26	0,26	0,28	0,28	0,26	0,28	0,28	0,25	0,25	0,26	0,24	0,25	0,25	0,23	0,23	0,23	0,25	0,27	0,30	0,25	0,24	0,26	0,23	0,27	0,27	0,28	0,29	0,30	0,27	0,13	0,26	0,23	0,27	0,31	0,31	0,31	0,30	0,33	0,30	0,31	0,08	0,08	0,08			
Bo/Izmir657/14/TUR	3	84,42	77,92		0,00	0,03	0,02	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07	0,10	0,10	0,08	0,10	0,10	0,10	0,09	0,08	0,13	0,07	0,09	0,10	0,13	0,31	0,33	0,21	0,18	0,19	0,19	0,19	0,18	0,19	0,19	0,20	0,27	0,27	0,26			
Bo/Izmir4844/14/TUR	4	84,42	77,92	100,00		0,03	0,02	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07	0,10	0,10	0,08	0,10	0,10	0,10	0,09	0,08	0,13	0,07	0,09	0,10	0,13	0,31	0,33	0,21	0,18	0,19	0,19	0,19	0,18	0,19	0,19	0,20	0,27	0,27	0,26			
Bo/Izmir4918/15/TUR	5	84,42	76,62	97,40	97,40		0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07	0,10	0,10	0,07	0,10	0,10	0,10	0,09	0,08	0,15	0,08	0,10	0,10	0,14	0,33	0,33	0,21	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,27	0,27	0,26				
Bo/CankirıCSG/16/TUR	6	82,47	76,62	98,05	98,05	96,75		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,08	0,06	0,05	0,04	0,06	0,06	0,08	0,13	0,12	0,10	0,13	0,12	0,09	0,10	0,15	0,09	0,11	0,12	0,15	0,33	0,34	0,21	0,18	0,19	0,21	0,21	0,20	0,21	0,22	0,29	0,29	0,28					
Bo/Izmir3469/14/TUR	7	86,36	77,92	95,45	95,45	96,75	94,81		0,02	0,02	0,03	0,03	0,08	0,06	0,05	0,04	0,05	0,05	0,07	0,13	0,10	0,09	0,13	0,11	0,10	0,08	0,08	0,17	0,10	0,11	0,10	0,16	0,31	0,35	0,19	0,20	0,17	0,17	0,18	0,17	0,18	0,18	0,19	0,29	0,29	0,28			
Bo/CankirıCAO/15/TUR	8	84,42	76,62	94,81	94,81	96,10	95,45	98,05		0,03	0,04	0,04	0,08	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06	0,08	0,15	0,11	0,10	0,15	0,11	0,11	0,09	0,10	0,16	0,11	0,13	0,13	0,15	0,33	0,35	0,20	0,19	0,17	0,19	0,21	0,20	0,21	0,22	0,31	0,31	0,30				
Bo/IzmirT1/15/TUR	9	84,42	76,62	96,10	96,10	97,40	95,45	98,05	97,40		0,03	0,03	0,07	0,05	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07	0,13	0,10	0,08	0,13	0,10	0,10	0,09	0,09	0,16	0,10	0,10	0,11	0,15	0,31	0,35	0,21	0,20	0,18	0,18	0,20	0,19	0,20	0,20	0,21	0,31	0,31	0,30			
Bo/Amasya9281/15/TUR	10	84,42	78,57	96,10	96,10	97,40	95,45	96,75	96,10	97,40		0,00	0,07	0,05	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07	0,13	0,10	0,08	0,13	0,10	0,10	0,09	0,09	0,16	0,10	0,12	0,11	0,15	0,30	0,33	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	0,20	0,21	0,28	0,28	0,27			
Bo/Amasya9276/15/TUR	11	84,42	78,57	96,10	96,10	97,40	95,45	96,75	96,10	97,40	100,00		0,07	0,05	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07	0,13	0,10	0,08	0,13	0,10	0,10	0,09	0,09	0,16	0,10	0,12	0,11	0,15	0,30	0,33	0,21	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	0,20	0,21	0,28	0,28	0,27				
Bo/Izmir1956470/13/TUR	12	84,42	77,92	94,81	94,81	96,10	92,86	92,86	92,21	93,51	93,51	93,51		0,07	0,08	0,06	0,07	0,07	0,08	0,12	0,09	0,05	0,12	0,10	0,08	0,10	0,08	0,13	0,08	0,09	0,07	0,13	0,29	0,35	0,21	0,17	0,19	0,19	0,18	0,21	0,19	0,20	0,25	0,25	0,24				
Bo/AnkaraA4/14/TUR	13	87,01	79,22	96,10	96,10	94,81	94,16	94,16	93,51	94,81	94,81	94,81	93,51		0,01	0,02	0,04	0,04	0,04	0,08	0,10	0,09	0,08	0,08	0,07	0,08	0,10	0,11	0,08	0,10	0,10	0,10	0,27	0,33	0,16	0,17	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	0,20	0,21	0,24	0,24	0,23			
Bo/Eskisehir134/13/TUR	14	86,36	78,57	95,45	95,45	95,45	94,81	94,81	94,16	95,45	95,45	95,45	92,86	99,35		0,01	0,03	0,03	0,03	0,08	0,11	0,09	0,08	0,08	0,08	0,07	0,11	0,12	0,09	0,11	0,10	0,11	0,28	0,34	0,15	0,16	0,21	0,21	0,21	0,20	0,21	0,22	0,25	0,25	0,24				
Bo/Sanliurfa2/14/TUR	15	86,36	78,57	96,75	96,75	96,75	96,10	95,45	96,75	96,75	96,75	94,16	98,05	98,70		0,03	0,03	0,05	0,10	0,11	0,08	0,10	0,08	0,08	0,08	0,05	0,10	0,12	0,09	0,11	0,10	0,11	0,28	0,34	0,17	0,16	0,19	0,19	0,19	0,18	0,19	0,20	0,26	0,26	0,25				
Bo/Izmir790/14/TUR	16	86,36	79,87	94,81	94,81	94,81	94,16	94,81	94,16	94,81	94,81	94,81	93,51	96,10	96,75	96,75		0,00	0,01	0,12	0,09	0,10	0,12	0,09	0,08	0,08	0,09	0,13	0,07	0,09	0,10	0,12	0,28	0,34	0,15	0,16	0,19	0,19	0,18	0,21	0,19	0,20	0,27	0,27	0,26				
Bo/Izmir4778/14/TUR	17	86,36	79,87	94,81	94,81	94,81	94,16	94,81	94,16	94,81	94,81	94,81	93,51	96,10	96,75	96,75	100,00		0,01	0,12	0,09	0,10	0,12	0,09	0,08	0,08	0,09	0,13	0,07	0,09	0,10	0,12	0,28	0,34	0,15	0,16	0,19	0,19	0,18	0,21	0,19	0,20	0,27	0,27	0,26				
Bo/Izmir4725/15/TUR	18	86,36	80,52	93,51	93,51	92,86	93,51	92,86	93,51	92,86	93,51	93,51	92,21	96,10	96,75	95,45	98,70	98,70		0,12	0,10	0,11	0,12	0,10	0,10	0,08	0,10	0,14	0,08	0,09	0,11	0,12	0,27	0,32	0,13	0,14	0,21	0,21	0,21	0,20	0,23	0,21	0,22	0,26	0,26	0,25			
Bo/AksarayK063/08/TUR	19	86,36	78,57	90,26	90,26	90,26	88,31	88,31	86,36	87,66	87,66	87,66	88,96	92,86	92,21	90,91	88,96	88,96	88,96		0,11	0,13	0,00	0,10	0,09	0,11	0,11	0,13	0,10	0,13	0,09	0,12	0,30	0,35	0,20	0,17	0,18	0,18	0,17	0,18	0,18	0,19	0,22	0,22	0,21				
Bo/Bursa13/09/TUR	20	86,36	77,27	90,26	90,26	90,26	88,96	90,91	89,61	90,26	90,26	90,26	91,56	90,26	89,61	89,61	91,56	91,56	90,26	89,61		0,10	0,11	0,10	0,08	0,11	0,05	0,13	0,06	0,07	0,05	0,12	0,30	0,37	0,22	0,17	0,17	0,17	0,17	0,19	0,17	0,18	0,31	0,31	0,30				
Bo/CankirıC1/15/TUR	21	85,71	75,32	92,21	92,21	93,51	90,26	91,56	90,91	92,21	92,21	92,21	94,81	92,21	91,56	92,86	90,91	90,91	89,61	87,66	90,26		0,13	0,10	0,08	0,10	0,09	0,13	0,10	0,12	0,10	0,12	0,33	0,35	0,24	0,20	0,17	0,17	0,17	0,16	0,18	0,17	0,17	0,31	0,31	0,30			
Bo/AksarayK056/08/TUR	22	86,36	78,57	90,26	90,26	90,26	88,31	88,31	86,36	87,66	87,66	87,66	88,96	92,86	92,21	90,91	88,96	88,96	100,00	89,61	87,66		0,10	0,09	0,11	0,11	0,13	0,10	0,13	0,09	0,12	0,30	0,35	0,20	0,17	0,18	0,18	0,17	0,18	0,18	0,19	0,22	0,22	0,21					
Bo/Starcross93/00/UK	23	87,66	79,22	90,26	90,26	90,26	88,31	89,61	89,61	90,26	90,26	90,26	90,26	92,86	89,61	90,91	91,56	91,56	90,26	89,61	94,81	91,56	89,61	90,91	91,56	90,91		0,03	0,09	0,10	0,08	0,09	0,12	0,09	0,08	0,31	0,38	0,19	0,18	0,15	0,15	0,15	0,14	0,17	0,16	0,16	0,26	0,26	0,25
Bo/PerinthC39/00/UK	24	88,31	77,92	90,91	90,91	90,91	88,96	90,26	89,61	90,91	90,91	90,91	92,21	93,51	92,86	92,86	92,21	92,21	90,91	91,56	92,86	92,21	91,56	96,75		0,09	0,09	0,07	0,08	0,10	0,07	0,06	0,33	0,37	0,19	0,17	0,14	0,14	0,14	0,13	0,16	0,14	0,15	0,28	0,28	0,27			
Bo/Monastir828/2006/TUN	25	86,36	80,52	91,56	91,56	91,56	91,56	92,21	91,56	91,56	91,56	91,56	90,26	92,86	93,51	94,81	92,86	92,86	89,61	89,61	90,26	89,61	91,56	91,56		0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,26	0,34	0,15	0,13	0,17	0,17	0,17	0,17	0,19	0,17	0,18	0,25	0,25	0,24					
Bo/DijonA02/06/FR	26	85,06	77,27	92,86	92,86	92,86	90,91	92,21	90,26	91,56	91,56	91,56	90,26	92,86	90,91	91,56	91,56	90,26	89,61	94,81	91,56	89,61	90,91	91,56	90,91		0,13	0,02	0,05	0,05	0,13	0,28	0,33	0,22	0,17	0,13	0,13	0,13	0,13	0,15	0,13	0,14	0,30	0,30	0,29				
Bo/32TE/2010/ITA	27	85,71	77,27	87,66	87,66	86,36	86,36	85,06	85,71	85,71	85,71	85,71	87,66	89,61	88,96	88,96	88,31	88,31	87,01	88,31	88,31	88,31	88,31	92,21	93,51	90,26	87,66		0,11	0,13	0,11	0,03	0,33	0,39	0,21	0,16	0,18	0,18	0,18	0,17	0,20	0,18	0,19	0,28	0,28	0,27			
Bo/DijonA448/08/FR	28	84,42	76,62	93,51	93,51	92,21	91,56	90,26	89,61	90,91	90,91	90,91	92,21	92,21	91,56	91,56	93,51	93,51	92,21	9																													

3.4.2. Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Rekombinasyon varlığının sorgulanması

3.4.2.1. BoNoV Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Rekombinasyon varlığının sorgulanması

BoNoV kapsit gen bölgesi yönünden beklenen büyüklükte ürün elde edilen dört yerel suşun tam kapsit ve bir suşun kısmi kapsit gen bölgesi dizin analizi gerçekleştirildi. Tam kapsit gen bölgesi bilgilerine sahip olunan BoNoV'ların nükleotit bazındaki benzerlikleri kendi aralarında %81,80-98,44, GIII.1'in prototip virusu olan Bo/Jena/80/DE ile %64,89-68,58; GIII.2'in prototip virusu olan Bo/Newbury2/76/UK ile ise %82,89-88,51 olarak belirlendi (Şekil 3.8). Bu suşların aminoasit bazında kendi aralarındaki benzerlikleri ise %90,42-98,64, Bo/Jena/80/DE ile %66,67-69,73, Bo/Newbury2/76/UK ile ise %91,19-96,93 olarak tespit edildi (Şekil 3.9).

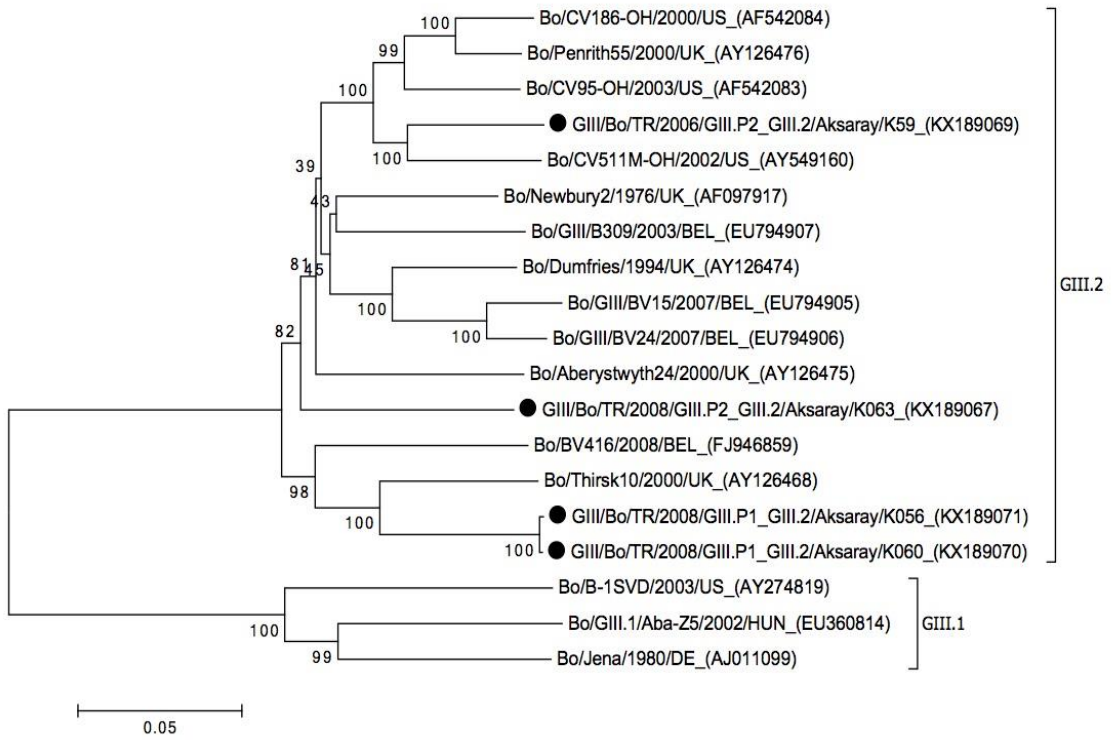
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K056	1	0,00	0,18	0,17	0,17	0,17	0,18	0,16	0,17	0,17	0,18	0,18	0,18	0,17	0,11	0,15	0,42	0,43	0,43
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K060	2	98,44	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,16	0,17	0,17	0,18	0,18	0,18	0,16	0,10	0,15	0,43	0,42	0,43
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P2_GIII.2/Aksaray/K063	3	81,80	83,21	0,16	0,15	0,14	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,16	0,16	0,15	0,17	0,16	0,42	0,41	0,40
GIII/Bo/TR/2006/GIII.P2_GIII.2/Aksaray/K59	4	82,06	83,21	85,63	0,11	0,10	0,09	0,12	0,11	0,14	0,14	0,15	0,14	0,15	0,19	0,18	0,41	0,40	0,42
Bo/CV186-OH/2000/US	5	81,99	83,21	86,72	89,91	0,08	0,10	0,13	0,04	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,17	0,17	0,43	0,43	0,42
Bo/CV95-OH/2003/US	6	82,25	83,40	87,16	90,36	92,78	0,10	0,11	0,08	0,13	0,13	0,15	0,14	0,14	0,17	0,17	0,44	0,43	0,40
Bo/CV511M-OH/2002/US	7	81,80	82,95	86,27	91,76	90,74	90,23	0,14	0,10	0,14	0,15	0,16	0,15	0,15	0,17	0,17	0,41	0,42	0,41
Bo/Newbury2/1976/UK	8	82,89	84,10	86,59	88,51	88,31	89,40	87,23	0,11	0,11	0,11	0,14	0,13	0,12	0,16	0,16	0,44	0,42	0,42
Bo/Penrith55/2000/UK	9	82,38	83,46	86,91	90,10	95,66	92,85	90,49	89,78	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,17	0,17	0,44	0,43	0,43
Bo/Dumfries/1994/UK	10	82,38	83,59	87,42	87,36	87,16	88,31	87,55	89,85	87,55	0,12	0,10	0,09	0,14	0,17	0,17	0,43	0,43	0,42
Bo/GIII/B309/2003/BEL	11	81,29	82,50	87,29	87,10	86,53	88,06	86,21	89,46	87,10	88,76	0,15	0,14	0,13	0,18	0,15	0,43	0,42	0,43
Bo/GIII/BV15/2007/BEL	12	81,67	82,82	85,50	86,46	86,33	86,14	85,95	87,42	86,91	90,80	86,08	0,04	0,15	0,19	0,20	0,42	0,41	0,41
Bo/GIII/BV24/2007/BEL	13	81,80	82,95	85,95	86,85	86,53	86,97	86,27	88,12	87,04	91,70	86,91	95,85	0,15	0,18	0,19	0,42	0,41	0,41
Bo/Aberystwyth24/2000/UK	14	82,57	83,97	86,72	86,46	87,48	87,36	86,27	88,51	87,99	87,55	87,93	86,33	86,33	0,16	0,17	0,43	0,41	0,44
Bo/Thirsk10/2000/UK	15	87,55	88,89	84,42	83,59	84,48	84,74	85,12	85,31	85,12	84,61	84,04	83,46	84,04	85,44	0,15	0,43	0,43	0,42
Bo/BV416/2008/BEL	16	84,04	85,31	85,70	83,91	84,74	85,12	84,80	85,38	84,67	84,93	86,59	82,69	83,52	85,19	86,78	0,42	0,43	0,44
Bo/GIII.1/Aba-Z5/2002/HUN	17	65,26	66,09	67,43	68,26	67,05	66,35	67,75	66,48	66,22	66,73	66,73	67,37	67,37	66,92	67,05	67,18	0,18	0,14
Bo/B-1SVD/2003/US	18	65,20	66,16	68,14	68,71	66,79	66,86	67,56	67,43	66,73	66,99	67,50	67,75	68,07	67,94	66,99	67,05	83,75	0,19
Bo/Jena/1980/DE	19	64,94	65,84	68,58	67,69	67,62	68,45	68,07	67,37	66,99	67,24	66,92	68,01	67,94	66,48	67,62	66,09	86,83	83,56

Şekil 3.8. BoNoV tam kapsit gen bölgesi yönünden pozitif bulunan örneklerin kendi aralarında ve diğer BoNoV'ların kapsit gen bölgesi yönünden nükleotit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K056	1		0,00	0,07	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06	0,03	0,04	0,37	0,39	0,37
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K060	2	98,64		0,07	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,07	0,07	0,06	0,03	0,04	0,38	0,39	0,38
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P2_GIII.2/Aksaray/K063	3	90,80	92,15		0,05	0,05	0,04	0,05	0,03	0,05	0,03	0,02	0,04	0,04	0,05	0,06	0,05	0,36	0,36	0,36
GIII/Bo/TR/2006/GIII.P2_GIII.2/Aksaray/K59	4	90,42	91,76	95,21		0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,04	0,06	0,06	0,05	0,07	0,07	0,38	0,38	0,38
Bo/CV186-OH/2000/US	5	91,57	92,72	95,21	95,59		0,03	0,04	0,03	0,02	0,04	0,03	0,05	0,05	0,04	0,06	0,06	0,38	0,38	0,38
Bo/CV95-OH/2003/US	6	92,15	93,49	95,79	95,98	97,51		0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,05	0,05	0,04	0,06	0,05	0,37	0,37	0,37
Bo/CV511M-OH/2002/US	7	91,19	92,53	95,02	96,55	95,98	95,98		0,05	0,04	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,07	0,07	0,38	0,37	0,38
Bo/Newbury2/1976/UK	8	91,19	92,53	96,93	95,40	96,74	96,55	94,83		0,03	0,02	0,01	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,37	0,37	0,37
Bo/Penrith55/2000/UK	9	91,76	92,91	95,02	95,98	98,47	97,13	96,36	96,74		0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,06	0,06	0,37	0,37	0,37
Bo/Dumfries/1994/UK	10	92,15	93,49	96,74	95,40	96,36	97,32	95,21	97,89	96,36		0,02	0,03	0,03	0,04	0,05	0,04	0,38	0,38	0,38
Bo/GIII/B309/2003/BEL	11	91,38	92,72	97,89	95,98	96,74	97,32	95,59	98,66	96,36	98,28		0,03	0,04	0,04	0,06	0,04	0,37	0,37	0,37
Bo/GIII/BV15/2007/BEL	12	91,00	91,95	96,36	94,44	95,40	95,40	94,64	96,36	95,02	96,93	96,74		0,01	0,06	0,07	0,05	0,38	0,37	0,38
Bo/GIII/BV24/2007/BEL	13	91,19	92,15	95,79	94,64	94,83	95,59	94,44	96,17	94,83	97,51	96,55	98,66		0,06	0,07	0,06	0,38	0,37	0,38
Bo/Aberystwyth24/2000/UK	14	91,76	92,91	95,21	94,83	95,98	96,36	94,83	95,98	96,36	96,55	96,36	94,25	94,64		0,05	0,06	0,38	0,38	0,38
Bo/Thirsk10/2000/UK	15	94,25	95,59	93,87	92,91	94,06	94,64	93,49	94,83	94,25	95,02	94,44	93,49	93,49	95,21		0,04	0,37	0,38	0,37
Bo/BV416/2008/BEL	16	93,49	94,83	95,40	93,30	94,25	94,83	93,68	95,59	93,87	95,79	96,17	94,83	94,64	94,25	95,98		0,36	0,37	0,36
Bo/GIII.1/Aba-Z5/2002/HUN	17	66,67	67,43	69,54	68,20	68,58	68,77	68,58	68,77	68,77	68,20	68,77	68,58	68,58	68,01	68,97	69,54		0,06	0,03
Bo/B-1SVD/2003/US	18	65,71	66,48	69,54	68,39	68,39	68,77	68,77	68,77	68,77	68,20	68,77	68,77	68,97	68,20	68,01	68,77	93,83		0,06
Bo/Jena/1980/DE	19	66,67	67,43	69,73	68,39	68,58	68,77	68,58	68,97	68,77	68,20	69,16	68,58	68,58	68,01	68,97	69,54	97,50	94,22	

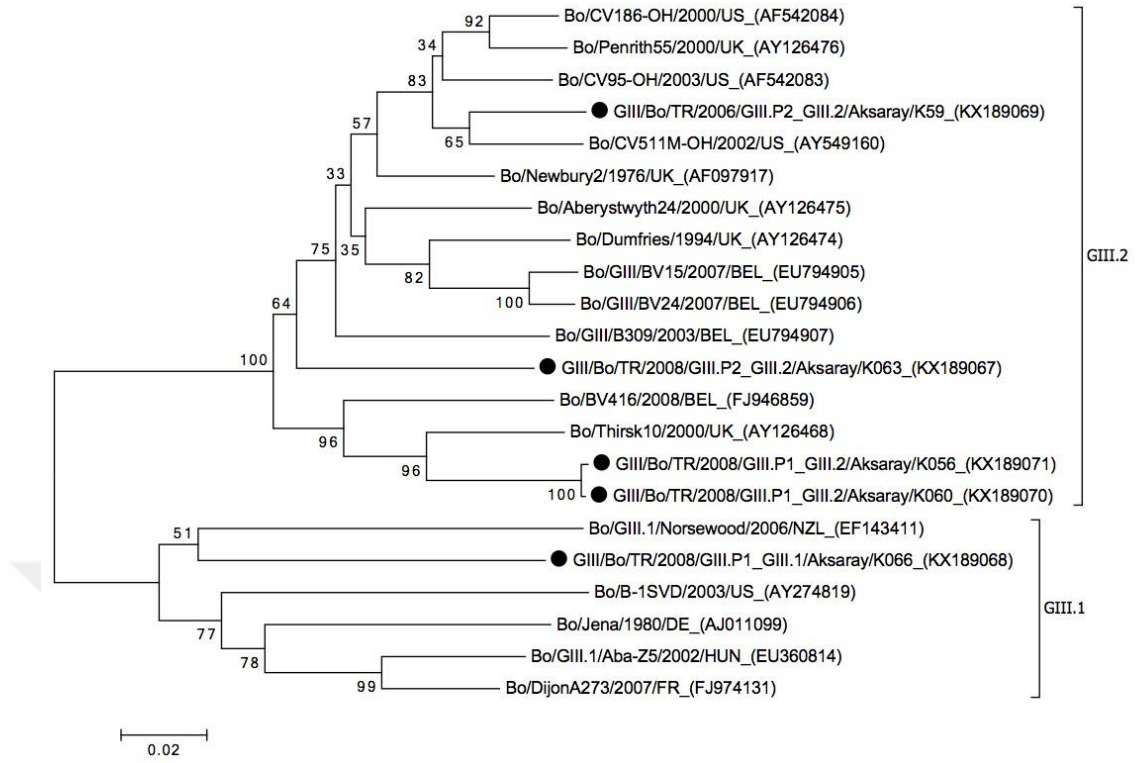
Şekil 3.9. BoNoV tam kapsit gen bölgesi yönünden pozitif bulunan örneklerin kendi aralarında ve diğer BoNoV’ların kapsit gen bölgesi yönünden aminoasit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu

Tam kapsit bölgesi yönünden yapılan filogenetik analizde yerel suşların hepsinin GIII.2 benzeri kapsit tipine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 3.10). Aksaray/K056 ile Aksaray/K060 yerel suşları Bo/Thirsk10/00/UK suşu ile aynı dalda yer almakta ve nükleotit bazında bu suşa sırasıyla %87,55, %88,89; aminoasit bazında ise %94,25, %95,59 oranlarında benzemektedir. Aksaray/K063 ise en yakın olarak Bo/GIII/B309/2003/BEL suşuna nükleotit benzerliği %87,29; aminoasit benzerliği ise %97,89 'dır. Aksaray/K59 ise Bo/CV511M-OH/2002/US ile aynı dalı paylaşmakta ve bu suşa nükleotit bakımından %91,76, aminoasit bakımından ise %96,55 oranında benzemektedir.



Şekil 3.10. BoNoV tam kapsit gen bölgesi yönünden filogenetik analizi

Kısmi kapsit gen bölgesi (410 nt) elde edilebilen Aksaray/K066 örneğinin filogenetik analizi sonucunda ise bu örneğin GIII.1 kapsit tipinde olduğu saptandı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. BoNoV kısmi kapsit gen bölgesi yönünden filogenetik analizi

Kapsit bölgesi dizin analizi sonucunda bu suşlar yeni nomenklatüre göre

GIII/Bo/TR/2006/GIII.P2_GIII.2/Aksaray/K59

GIII/Bo/TR/2008/GIII.P2_GIII.2/Aksaray/K063,

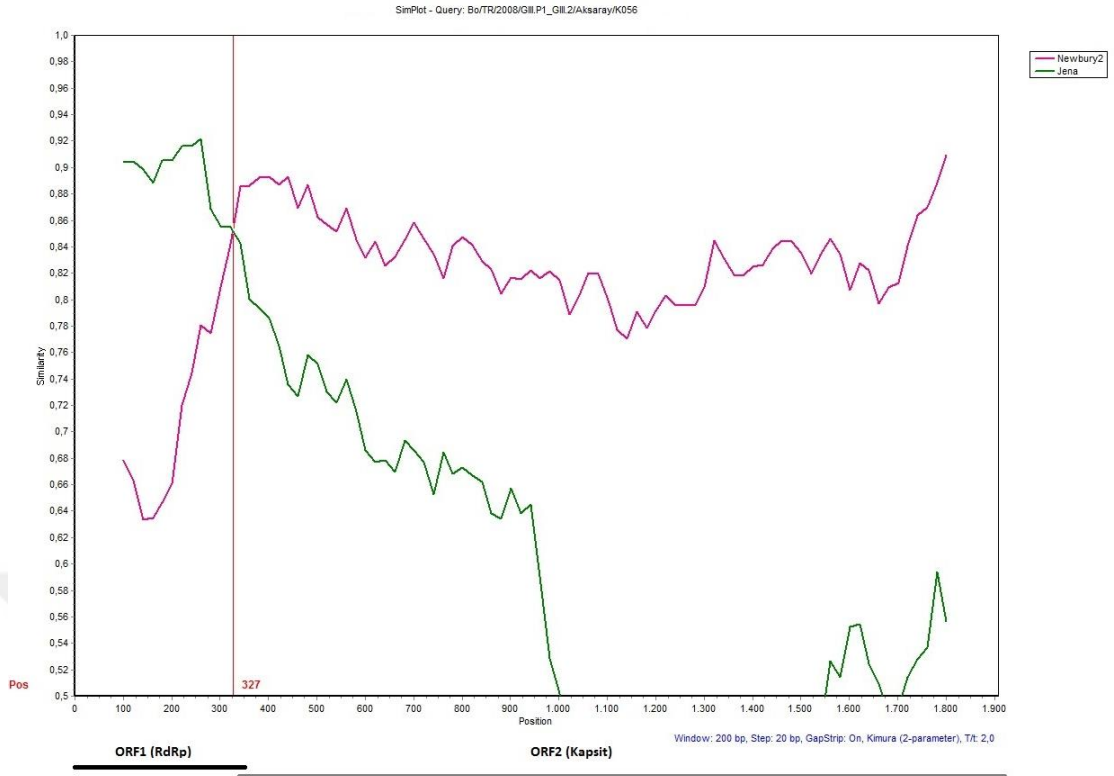
GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.1/Aksaray/K066,

GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K056,

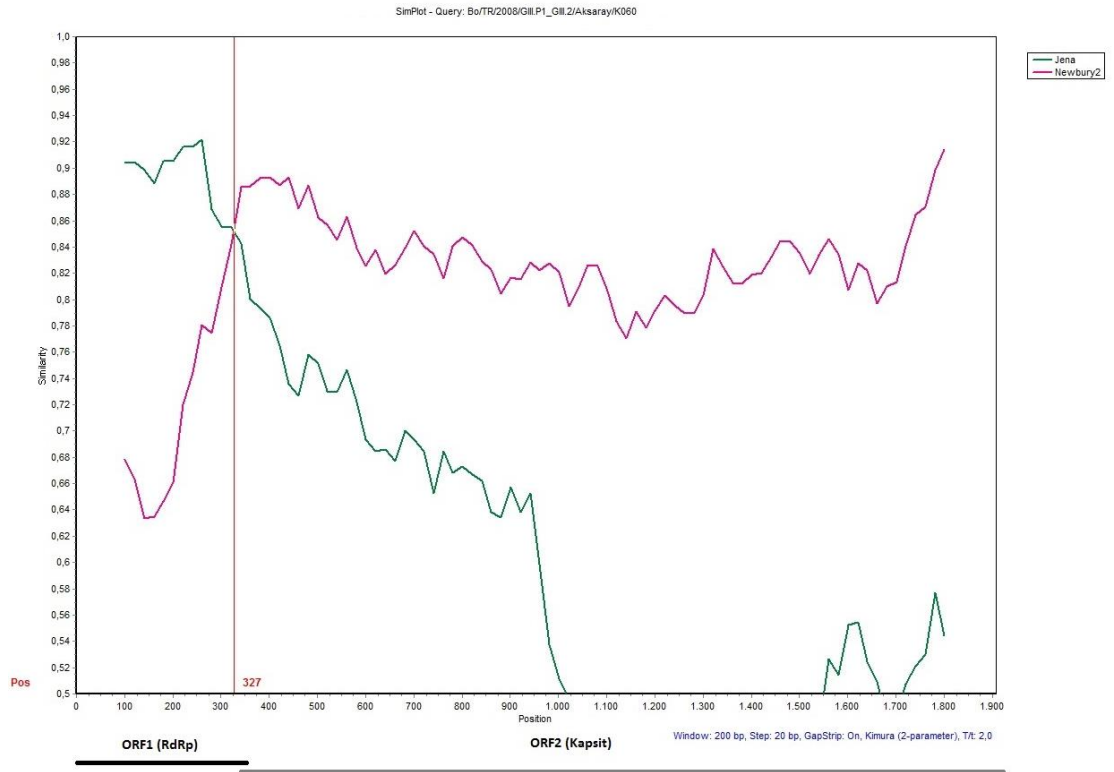
ve

GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K060 olarak isimlendirildi.

RdRp ve kapsit gen bölgesi tam dizin analizi yapılan dört BoNoV yerel suşuna ilişkin filogenetik analizler (Şekil 3.4 ve Şekil 3.10) sonucunda iki yerel suşun (Aksaray/K063 ve Aksaray/K59) hem RdRp hem de kapsit bölgesi yönünden BoNoV GIII.2’de yer aldığı görüldü. Buna karşın diğer iki yerel suş (Aksaray/K056 ve Aksaray/K060) RdRp gen bölgesi yönünden GIII.1 ve kapsit gen bölgesi yönünden GIII.2 olarak tespit edildi. SimPlot analizinde de GIII.P1/GIII.2 rekombinant suş oldukları görülen bu suşların, muhtemel rekombinasyon kırılma noktasının her iki suş için de 327. nükleotit olduğu belirlendi (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).



Şekil 3.12. GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K056 için Simplot analizi



Şekil 3.13. GIII/Bo/TR/2008/GIII.P1_GIII.2/Aksaray/K060 için Simplot analizi

3.4.2.2. Nebovirus Kapsit Gen Bölgesi Yönünden Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Rekombinasyon varlığının sorgulanması

Nebovirus RdRp gen bölgesi yönünden pozitif bulunan iki suşun kapsit gen bölgesinin tam dizin analizi yapılabildi. Kapsit gen bölgesi dizin analizi yapılan bu suşların nükleotit bazında birbirlerine benzerlik oranları %87,49 olarak tespit edildi. Bu suşlardan Bo/AksarayK056/08/TUR'un prototip viruslar olan Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US ile kapsit gen bölgesi yönünden nükleotit bazındaki benzerlikleri sırasıyla %85,43 ve %86,52 Bo/AnkaraA4/14/TUR'un prototip viruslar olan Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US ile kapsit gen bölgesi yönünden nükleotit bazındaki benzerlikleri sırasıyla %83,85 ve %85,49 bulundu (Şekil 3.14).

Elde edilen kapsit gen bölgelerinin aminoasit bazında kendi aralarındaki benzerlikleri %96,17 olarak bulunurken; Bo/AksarayK056/08/TUR'un Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US ile benzerlikleri sırasıyla %92,90 ve %93,08; Bo/AnkaraA4/14/TUR'un Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US ile benzerlikleri sırasıyla %91,62 ve %91,99 olarak tespit edildi (Şekil 3.15).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Bo/NB/80/US	1		0,07	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,12	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15
Bo/Newbury1/76/UK	2	92,90		0,08	0,09	0,11	0,12	0,11	0,11	0,08	0,08	0,08	0,14	0,14	0,14	0,15	0,16	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,15	0,16	0,16	0,17	0,17	0,17
Bo/M3641/2011/HUN	3	91,50	92,17		0,08	0,13	0,13	0,12	0,12	0,06	0,06	0,06	0,14	0,15	0,14	0,14	0,15	0,14	0,15	0,15	0,16	0,14	0,15	0,14	0,15	0,14	0,15	0,16
Bo/32TE/2010/ITA	4	89,92	90,04	91,14		0,13	0,13	0,13	0,13	0,06	0,06	0,06	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,14	0,14	0,15	0,16	0,17	0,17	0,16	0,17	0,16	0,17	0,17
Bo/CV562-OH/2002/US	5	91,68	89,56	88,16	86,70		0,04	0,03	0,03	0,12	0,12	0,12	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,18	0,19	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17	0,18
Bo/CV548-OH/2002/US	6	91,38	89,25	87,92	86,52	96,42		0,03	0,03	0,12	0,12	0,12	0,14	0,15	0,15	0,16	0,17	0,16	0,16	0,17	0,16	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17	0,18
Bo/CV504-OH/2002/US	7	92,29	89,74	88,89	86,82	96,96	97,15		0,00	0,11	0,11	0,11	0,14	0,15	0,14	0,15	0,16	0,15	0,16	0,16	0,15	0,17	0,18	0,17	0,18	0,17	0,17	0,17
Bo/CV526-OH/2002/US	8	92,17	89,74	88,89	86,82	96,96	97,15	99,76		0,11	0,11	0,11	0,14	0,15	0,14	0,15	0,16	0,15	0,16	0,16	0,15	0,17	0,18	0,17	0,18	0,17	0,17	0,17
Bo/BEC/Penrith182/2000/UK	9	92,29	92,11	93,81	92,53	89,01	89,13	89,50	89,50		0,02	0,03	0,13	0,14	0,14	0,13	0,14	0,13	0,14	0,14	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Bo/BEC/Penrith140/2000/UK	10	91,99	92,05	94,11	92,84	89,13	89,13	89,44	89,44	98,48		0,02	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,16	0,16	0,16	0,17	0,16	0,16	0,16
Bo/BEC/Starcross93s/2000/UK	11	92,23	92,05	93,93	92,47	89,19	89,07	89,80	89,68	97,51	97,69		0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15	0,16	0,15
OKY	12	88,65	87,43	87,37	85,55	86,34	87,07	87,19	87,19	88,40	88,04	87,92		0,04	0,08	0,13	0,13	0,12	0,13	0,13	0,14	0,16	0,17	0,15	0,16	0,16	0,14	0,15
TCG	13	88,40	87,19	86,70	85,55	86,04	86,70	86,76	86,76	87,37	87,49	87,25	96,42		0,09	0,13	0,14	0,13	0,14	0,14	0,14	0,16	0,17	0,16	0,16	0,16	0,14	0,15
Bo/CV519-OH/2002/US	14	87,80	86,89	87,01	85,55	86,70	86,52	87,07	86,95	87,37	87,61	87,55	92,05	91,44		0,13	0,14	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15	0,17
Bo/MA271/04/KOR	15	87,49	86,52	86,82	85,49	85,49	85,43	86,04	86,04	87,74	87,43	87,19	88,46	87,74	87,92		0,01	0,00	0,02	0,02	0,10	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,14
Bo/MA474/05/KOR	16	87,01	85,91	86,58	85,25	85,37	85,19	85,79	85,79	87,37	87,19	86,89	88,16	87,55	87,49	98,60		0,01	0,01	0,01	0,11	0,13	0,14	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12
Bo/SA63/04/KOR	17	87,61	86,64	86,82	85,61	85,61	85,55	86,16	86,16	87,86	87,55	87,31	88,59	87,86	87,92	99,76	98,60		0,02	0,02	0,10	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,14
Bo/MA362/04/KOR	18	87,19	86,10	86,76	85,61	85,43	85,25	85,97	85,97	87,49	87,31	86,76	88,40	87,55	87,86	98,48	98,79	98,48		0,01	0,11	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,14
Bo/MA729/05/KOR	19	86,82	85,73	86,40	85,19	85,31	85,12	85,61	85,61	87,07	86,89	86,58	88,10	87,61	87,37	98,36	99,27	98,36	98,54		0,11	0,13	0,14	0,13	0,13	0,13	0,13	0,14
Bo/AksarayK056/08/TUR	20	86,52	85,43	85,67	84,03	85,25	85,37	86,16	86,04	86,28	86,16	86,64	87,13	86,82	86,89	90,22	89,68	90,35	90,10	89,62		0,13	0,14	0,13	0,13	0,13	0,12	0,13
Bo/BEC/Penrith150/2000/UK	21	85,67	85,91	86,89	83,79	83,91	84,21	84,76	84,76	85,73	85,67	85,85	85,73	85,61	86,52	88,22	87,92	88,22	88,16	87,86	87,67		0,00	0,01	0,02	0,02	0,09	0,11
Bo/BEC/Starcross93r/2000/UK	22	81,91	81,97	83,06	82,85	80,02	80,39	80,87	80,87	81,97	81,91	81,97	81,66	81,54	82,45	84,27	84,03	84,27	84,21	83,91	83,73	95,87		0,01	0,02	0,02	0,10	0,11
Bo/BEC/Starcross117/2000/UK	23	85,67	86,10	87,13	84,09	83,85	84,15	84,70	84,70	85,85	85,73	85,97	86,04	85,97	86,70	88,40	88,16	88,40	88,34	88,16	88,16	98,79	94,66		0,02	0,01	0,09	0,11
Bo/BEC/Penrith142/2000/UK	24	85,37	85,37	86,70	83,73	83,61	83,61	84,21	84,21	85,43	85,12	85,55	85,79	85,73	86,40	88,34	88,10	88,34	88,28	88,10	88,22	98,12	93,93	98,24		0,00	0,09	0,11
Bo/BEC/Penrith143/2000/UK	25	85,79	85,73	87,07	84,03	83,97	83,97	84,58	84,58	85,67	85,37	85,79	85,79	85,61	86,34	88,59	88,34	88,59	88,52	88,34	88,22	98,36	94,17	98,60	99,57		0,09	0,11
Bo/DijonA386/08/FR	26	85,85	85,19	86,22	83,42	84,70	84,70	85,19	85,06	85,67	85,67	86,22	87,31	86,95	86,04	88,52	88,34	88,65	88,65	88,28	88,83	91,44	87,43	91,56	91,56	91,68		0,04
Bo/16TE/2010/ITA	27	83,79	83,42	84,21	84,76	82,64	82,57	83,06	82,94	83,42	83,42	84,15	84,64	84,46	83,24	85,49	85,61	85,61	85,73	85,61	86,34	88,04	86,98	88,16	87,98	88,22	93,99	0,06
Bo/AnkaraA4/14/TUR	28	85,49	83,85	85,73	84,38	83,24	83,67	84,03	83,91	85,12	85,00	85,67	86,04	85,37	85,73	87,80	87,80	87,92	88,04	87,67	87,49	89,92	87,56	90,16	90,04	90,22	94,35	92,83

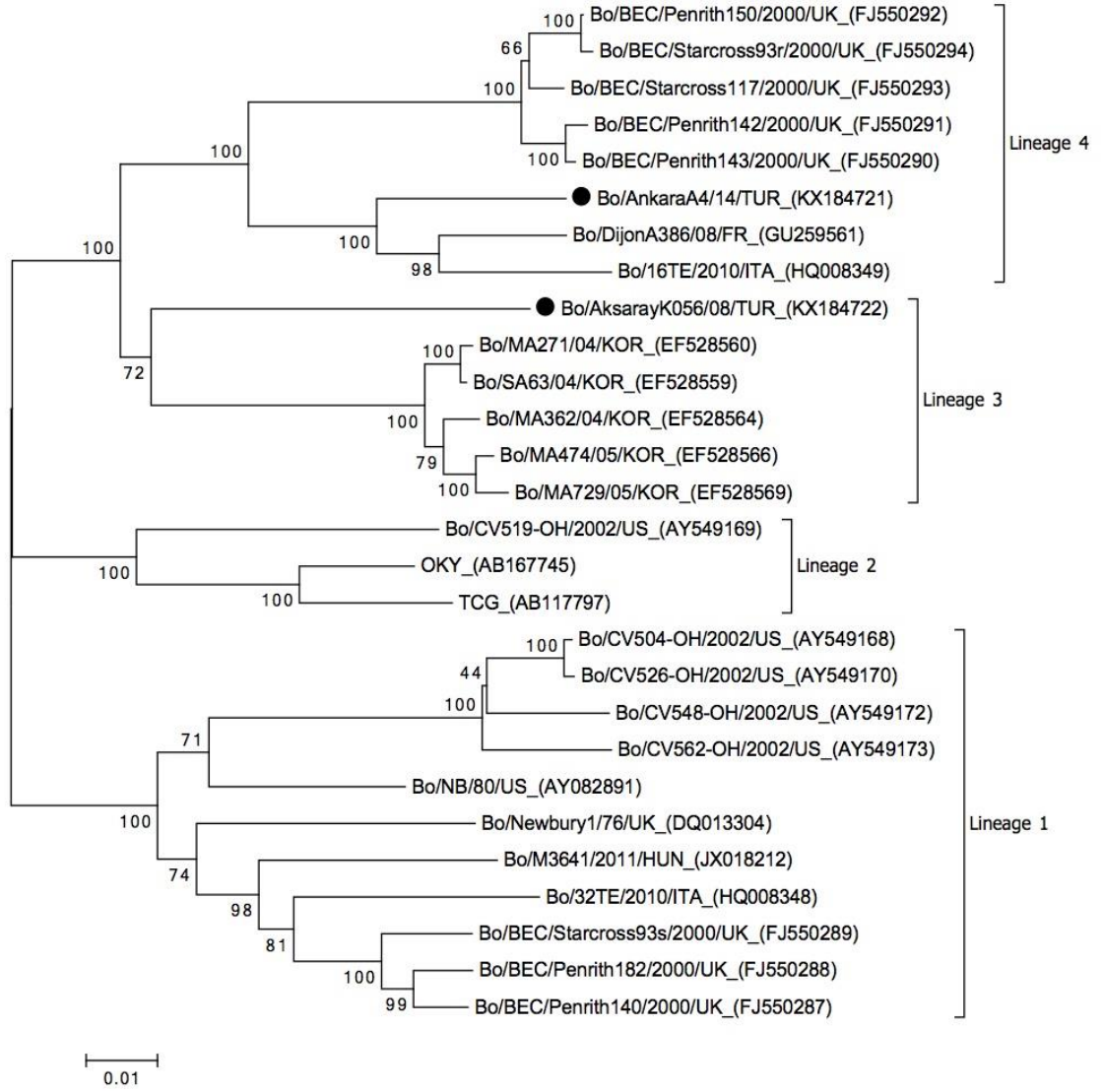
Şekil 3.14. Bo/AnkaraA4/14/TUR ve Bo/AksarayK056/08/TUR’un kendi aralarında ve diğer Nebovirusların kapsit gen bölgesi yönünden nükleotit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Bo/NB/80/US	1		0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,09	0,07	
Bo/Newbury1/76/UK	2	98,91		0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,09	0,08	
Bo/M3641/2011/HUN	3	98,72	98,54		0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,09	0,08	
Bo/32TE/2010/ITA	4	96,17	95,99	96,17		0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,06	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	
Bo/CV562-OH/2002/US	5	98,72	98,36	98,54	95,63		0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,06	0,06	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,10	0,08	
Bo/CV548-OH/2002/US	6	98,72	98,18	98,18	95,45	98,72		0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,10	0,08	
Bo/CV504-OH/2002/US	7	98,54	98,00	98,00	95,45	98,72	99,27		0,00	0,02	0,02	0,02	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,10	0,08	
Bo/CV526-OH/2002/US	8	98,54	98,00	98,00	95,45	98,72	99,27	99,64		0,02	0,02	0,02	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,10	0,08	
Bo/BEC/Penrith182/2000/UK	9	99,09	99,09	98,91	96,72	98,18	98,18	98,00	98,00		0,01	0,01	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,09	0,07	
Bo/BEC/Penrith140/2000/UK	10	98,36	98,36	98,91	96,36	98,00	98,18	98,00	98,00	98,91		0,01	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,10	0,08
Bo/BEC/Starcross93s/2000/UK	11	98,18	98,18	98,91	96,36	98,36	97,81	97,81	97,81	98,91	98,72		0,05	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,09	0,08
OKY	12	94,54	94,54	94,35	92,71	94,35	94,17	94,17	94,17	95,08	94,54	94,72		0,01	0,02	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,07	0,06
TCG	13	94,54	93,99	93,81	92,17	94,35	94,54	94,54	94,54	94,35	94,17	93,99	99,27		0,02	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,07
Bo/CV519-OH/2002/US	14	93,44	93,81	93,44	91,62	93,62	93,44	93,62	93,62	93,81	93,81	93,44	98,18	98,00		0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,07
Bo/MA271/04/KOR	15	93,62	93,08	93,26	91,26	92,71	93,08	93,26	93,26	93,81	93,26	93,08	94,35	93,81	93,81		0,01	0,01	0,02	0,02	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,07	0,04
Bo/MA474/05/KOR	16	93,62	93,08	93,26	91,26	92,71	93,08	93,26	93,26	93,81	93,26	93,08	94,72	94,17	94,17	98,91		0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,06	0,04	
Bo/SA63/04/KOR	17	93,81	93,26	93,44	91,44	92,90	93,26	93,44	93,44	93,99	93,44	93,26	94,54	93,99	93,99	99,45	99,09		0,01	0,01	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,06	0,04
Bo/MA362/04/KOR	18	93,62	93,26	93,44	91,44	92,90	93,26	93,44	93,44	93,99	93,44	93,44	94,35	93,81	93,81	98,36	98,72	98,54		0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06	0,04
Bo/MA729/05/KOR	19	92,90	92,35	92,53	90,53	91,99	92,35	92,53	92,53	93,08	92,53	92,35	94,17	93,62	93,62	98,36	99,09	98,54	98,18		0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,06	0,05
Bo/AksarayK056/08/TUR	20	93,08	92,90	92,90	91,44	92,71	92,90	93,26	93,26	93,62	93,08	93,26	95,26	94,54	94,72	96,54	96,54	96,72	96,54	95,99		0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,05	0,03	
Bo/BEC/Penrith150/2000/UK	21	93,81	93,99	93,81	91,26	93,08	93,44	93,62	93,62	93,81	93,62	93,44	94,35	94,17	94,35	95,45	95,81	95,63	96,36	95,26	96,36		0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,03	
Bo/BEC/Starcross93r/2000/UK	22	89,80	89,98	89,80	90,39	89,07	89,44	89,62	89,62	89,80	89,62	89,44	90,16	89,98	90,16	91,26	91,62	91,44	92,17	91,07	92,35	95,81		0,02	0,01	0,01	0,03	0,04	0,03	
Bo/BEC/Starcross117/2000/UK	23	93,08	93,44	92,90	90,71	92,53	93,26	93,44	93,44	93,26	92,90	93,08	94,35	93,99	93,99	95,26	95,99	95,45	96,17	95,45	96,90	98,91	94,72		0,01	0,01	0,02	0,04	0,02	
Bo/BEC/Penrith142/2000/UK	24	93,26	93,62	93,08	90,71	92,53	92,90	93,08	93,08	93,44	92,90	93,08	94,54	94,54	94,17	95,26	95,99	95,45	96,17	95,45	96,54	99,09	94,90	99,09		0,00	0,01	0,03	0,02	
Bo/BEC/Penrith143/2000/UK	25	93,44	93,81	93,26	90,89	92,71	93,08	93,26	93,26	93,62	93,08	93,26	94,72	94,35	94,35	95,45	96,17	95,63	96,36	95,63	96,72	99,27	95,08	99,27	99,82		0,01	0,03	0,02	
Bo/DijonA386/08/FR	26	93,08	92,90	92,90	90,53	92,35	92,35	92,53	92,53	93,26	92,53	92,90	94,72	94,35	93,99	95,63	95,99	95,81	95,99	95,45	97,09	97,81	93,62	97,81	98,72	98,54		0,03	0,01	
Bo/16TE/2010/ITA	27	89,98	89,80	90,16	91,50	89,62	89,25	89,44	89,44	90,16	89,44	90,16	91,62	90,89	91,07	92,35	93,26	92,53	93,08	92,53	93,99	94,90	93,90	94,90	95,45	95,63	95,99		0,03	
Bo/AnkaraA4/14/TUR	28	91,99	91,62	91,80	91,36	91,26	91,62	91,80	91,80	91,99	91,44	91,62	93,26	92,71	92,71	94,90	95,26	95,08	95,26	94,72	96,17	96,54	94,12	96,72	96,90	97,09	97,81	96,32		

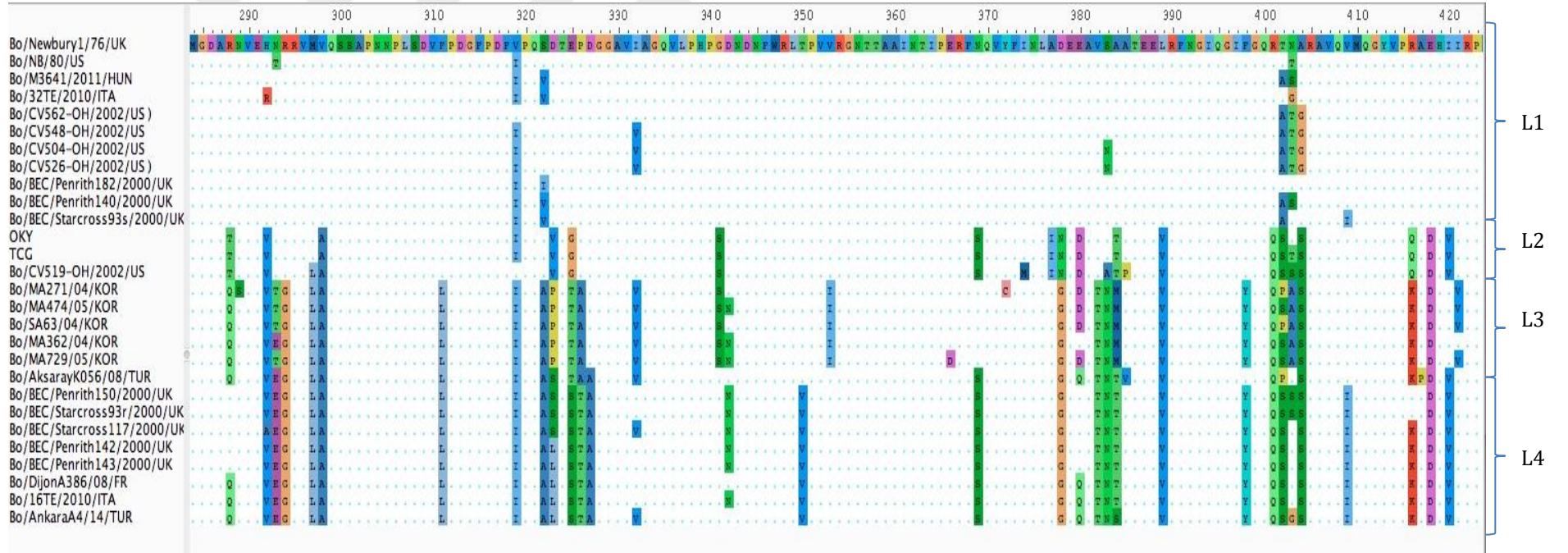
Şekil 3.15. Bo/AnkaraA4/14/TUR ve Bo/AksarayK056/08/TUR'un kendi aralarında ve diğer Nebovirusların kapsit gen bölgesi yönünden aminoasit bazındaki benzerlik ve farklılık tablosu

Kapsit gen bölgesinin dizin analizine dayalı olarak yapılan filogenetik ağaçta Bo/AksarayK056/08/TUR *Lineage 3*'te yer aldı (Şekil 3.16). Bu suşun aynı grupta bulunan diğer suşlar ile benzerlikleri incelendiğinde, en yakın benzerliği nükleotit ve aminoasit yönünden sırasıyla %90,35 ve %96,72 oranlarıyla Bo/SA63/04/KOR ile gösterdiği belirlendi. Bo/AnkaraA4/14/TUR ise filogenetik ağaçta *lineage 4*'te yer aldı. Bu grubu oluşturan suşlar içerisinde Bo/DijonA386/FR ve rekombinant suş olan Bo/16TE/2010/ITA ile aynı dalı paylaştığı ve bu suşlara nükleotit bazında sırasıyla %94,35; %92,83; aminoasit bazında ise %97,81; %96,32 oranında benzediği tespit edildi.

Elde edilen kapsit gen bölgesi dizinlerinin, daha önce *Lineage*'ları tanımlanan referens suşlar ile kapsit gen bölgesinin en değişken bölgesi olarak kabul edilen 288-420 aminoasitlerin bulunduğu bölgeye tekabül eden P2 domaini dikkate alınarak yapılan aminoasit dizini karşılaştırmasında, filogenetik analiz ile uyumlu olarak Bo/AksarayK056/08/TUR ve Bo/AnkaraA4/14/TUR'nin sırasıyla *Lineage 3* ve *Lineage 4*'de bulunun diğer suşlar ile benzer aminoasit değişikliklerini gösterdikleri saptandı (Şekil 3.17).



Şekil 3.16. Nebovirus kapsit gen bölgesi yönünden filogenetik analiz

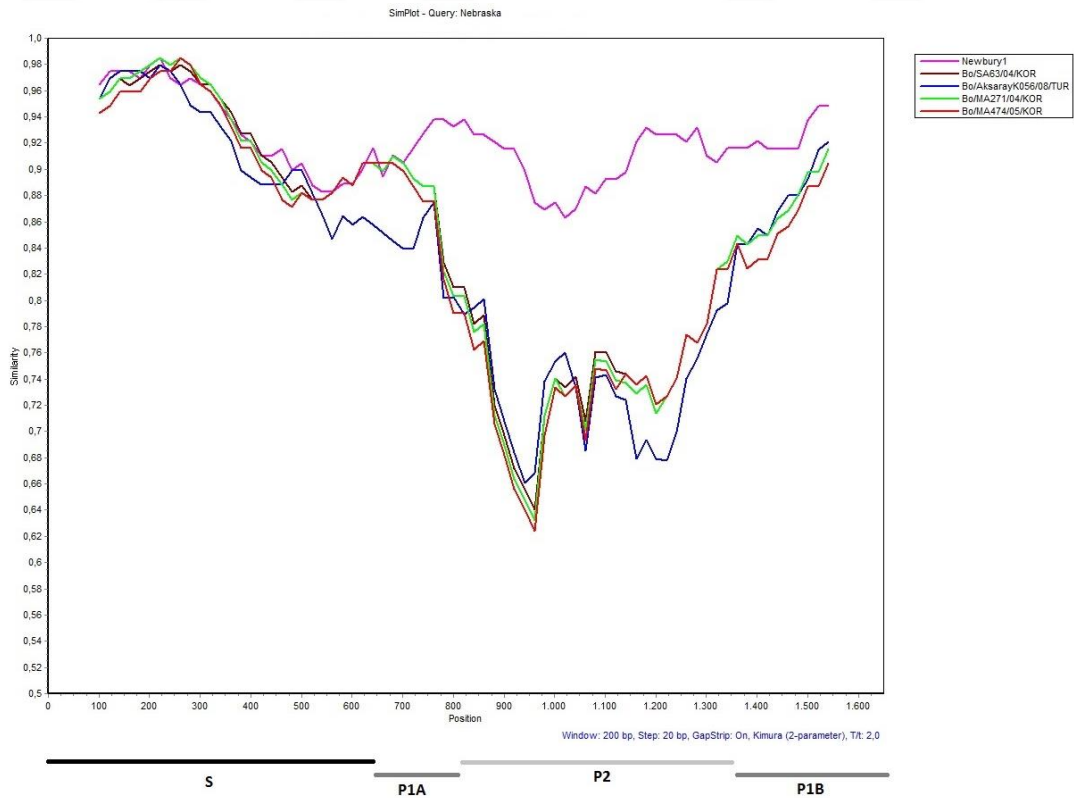


Şekil 3.17. Kapsit gen bölgesinin en değişken bölgesi olarak kabul edilen 288-420 aminoasitlerin bulunduğu bölgeye tekabül eden P2 domaini dikkate alınarak yapılan aminoasit dizini karşılaştırması

Nebovirus referens suşlarının (Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/US) ve saptanan birçok suşun kapsit gen bölgesi analizi sonucunda *Lineage 1*'de yer alması nedeniyle, yerel suşlar Bo/AksarayK056/08/TUR ve Bo/AnkaraA4/14/TUR için rekombinasyon olasılığı sorgulandı.

Bo/AksarayK056/08/TUR için Bo/Nebraska/80/US ve *Lineage 3*'te yer alan Bo/SA63/04/KOR ve Bo/MA271/04/KOR suşları referans alınarak yapılan SimPlot analizinde, bu suşun *Lineage 3*'te yer alan Kore suşlarıyla uyumlu olduğu ve analizin rekombinasyonu göstermediği saptandı (Şekil 3.18).

Bo/AnkaraA4/14/TUR için prototip viruslar Bo/Nebraska/80/US ve *Lineage 4*'te yer alan Bo/Penrith143/00/UK ile Bo/16TE/2010/ITA Bo/DijonA386/08/FR suşları kullanılarak yapılan Simplot analizi sonucunda ise, bu suşun rekombinant suş olan Bo/16TE/2010/ITA benzeri sonuç verdiği ve *Lineage 1*'de yer alan yerel saha suşumuz bulunmadığından Nebraska suşu rehber alınarak belirlenen muhtemel rekombinasyon kırılma noktasının 609. nükleotit olduğu saptandı (Şekil 3.19).



Şekil 3.18. Bo/AksarayK056/08/TUR için SimPlot analizi



Şekil 3.19. Bo/AnkaraA4/14/TUR için SimPlot analizi

4. TARTIŞMA

Buzağı ishallerinde BEC'lerin önemi gün geçtikçe daha iyi anlaşılmakta ve araştırmacılar, hakkında sınırlı bilgiler bulunan bu etkenler ile gün geçtikçe daha çok ilgilenmektedir. Bu çalışmalarda farklı popülasyonlar için enfeksiyon oranlarının belirlenmesi, genogrup ve genotiplerin varlığı/yaygınlığının incelenmesi ve saptanan yerel virusların genetik yapılarının detaylı incelenmesi, vb. konuları sorgulanmaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı illerinde yerleşik işletmelerde bulunan buzağılarda gözlenen ishal olgularında BEC'lerin (BoNoV ve Nebovirus) olası etiyolojik ajan olarak sorgulanması ve enfeksiyonun epidemiyolojisiyle ilgili bilgilerin kazanımı başlıca amaç olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda hem organize sığır yetiştiriciliği işletmeleri hem de küçük aile işletmelerine ait materyallerin kullanılmasına özen gösterilmiş; 11 entansif sığır yetiştiriciliği işletmesi ve 48 küçük aile işletmesinden temin edilen toplam 167 gaita örneği kullanılmıştır (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2). Tanı materyalleri entansif işletmelerden 2002-2016 yıllarında sağlanmış olmakla birlikte, I nolu işletme hariç tutulursa işletmelere ilgili veriler çoğunlukla 2013-2016 yılına ait örneklemelerdir. Küçük aile işletmelerine ait örneklerin çoğunluğu ise 2014-2016 yılında sağlanmıştır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar, prevalans belirlenmesi amacıyla değil, genel bazı yaklaşımlara esas oluşturacak bilgilerin oluşturulması amacıyla değerlendirilmiştir.

Gaita örneklerinin BEC RdRp gen bölgesinin çoğaltılması esasına dayalı çalışma sonucunda, 76'sı (%45.5) pozitif bulunmuş olup, elde edilen ürünlerin dizin analizi söz konusu gaita örneklerinin 56'sında (%33,5) BoNoV ve 37'sinde (%22,1) Nebovirus varlığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada tespit edilen BoNoV oranı (%33,5), birçok Avrupa ülkesi ve Kuzey Amerika'daki bazı eyaletlere ilişkin bildirimlerde (Cho ve ark., 2013; Di Bartolo ve ark., 2011; Jor ve ark., 2010; Kaplon ve ark., 2011; Smiley ve ark., 2003; van der Poel ve ark., 2000; van der Poel ve ark., 2003 ve Wise ve ark., 2004), yer alan oranlara (%20-80) benzer şekilde, oldukça

yüksektir. Bununla birlikte örneklenen ishallerde buzağılarda %17'den daha düşük oranlarda BoNoV tespitini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Alcala ve ark., 2003; Deng ve ark., 2003; Ferragut ve ark., 2016; Hassine-Zaafraane ve ark., 2012; Mattison ve ark., 2007; Mauroy ve ark., 2009a; Milnes ve ark., 2007; Oliver ve ark., 2003 ve Park ve ark., 2007). Türkiye'de ise BoNoV ile ilgili yalnızca iki çalışma bulunmakta olup, bu çalışmalarda pozitiflik oranları %1,7 ve %8,5 olarak bildirilmiştir (Gülaçtı ve ark., 2016 ve Yılmaz ve ark., 2011).

Bu çalışmada 37 dışkı örneği (%22,1) Nebovirus yönünden pozitif bulunmuştur. Kuzey Amerika'da Cho ve ark. (2013) %21,6, Smiley ve ark. (2003) Ohio'da yerleşik işletmelerden sağlanan örneklerde %28 oranında Nebovirus varlığını bildirmişlerdir. Tunus (Hassine-Zaafraane ve ark., 2012), Brezilya (Candido ve ark., 2016), İtalya (Di Martino ve ark., 2011), Fransa (Kaplon ve ark., 2011), İngiltere (Oliver ve ark., 2006a) ve Güney Kore'de (Park ve ark., 2008)'de yapılan çalışmalarda ise örneklenen popülasyonlar için pozitiflik oranları (%3-9,2), Kuzey Amerika'da saptanan oranlardan çok daha düşük bulunmuştur. Türkiye'de daha önce bildirimi yapılmamış olan Nebovirusun ishallerde buzağılarda, farklı ülkelerdeki birçok çalışmada saptanan oranlardan daha yüksek oranda saptanması dikkati çeker bulunmuştur.

Diğer yandan 2002-2016 yılları arasında materyal sağlanan 11 entansif işletmeden 2002 yılında materyal sağlanan bir işletme hariç (saklama koşullarında nükleik asit kaybı olasılığı yüksektir) diğerlerinde (Çizelge 3.1); küçük aile işletmelerinin ise %41,8'sinde (20/48) (Çizelge 3.2) BEC enfeksiyonu saptanmıştır. Örneklem tarihleri dikkate alındığında bu çalışmada Türkiye'de en azından 2006 yılından bu yana BoNoV ve 2008 yılından bu yana Nebovirus varlığına dair veriler elde edilmiştir. Tanı çalışmasına ait veriler genel olarak değerlendirildiğinde hem örneklenen işletmeler ve hem de test edilen örnekler için belirlenen pozitiflik oranlarının BoNoV için Nebovirustan daha yüksek olduğu görülmüş olup, bu veri BEC üzerine yapılan diğer çalışmalarla (Hassine-Zaafraane ve ark., 2012 ve Kaplon ve ark., 2011) benzerdir.

Bu çalışmada gerek entansif işletmeler ve gerekse küçük aile işletmelerinde örneklemelerin yapıldığı yıllar, işletmedeki hayvan sayıları, vb. dikkate alınarak BEC tespitlerine ilgili bilgiler (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2) değerlendirildiğinde, BEC'lerin düşünüldüğünden daha fazla buzağı ishallerinde rol oynadıklarını ve tek başlarına ya da -olası diğer etkenler ile birlikte- oluşan hastalık nedeniyle önemli ölçüde ekonomik kayıpların oluşumuna katkı sağlayan etkenler olduğu anlaşılmaktadır.

Araştırmalarda etken tespiti ya da serolojik çalışmalar sonucu saptanan oranların, kıtaya, ülkeye, örnekleme stratejisine, kullanılan test metotuna (konvansiyonel RT-PCR, nested-RT-PCR ya da qRT-PCR), primerlere ve test koşullarına göre değişiklik gösterdiği bir gerçektir. Nitekim BEC tanısı için yapılan çalışmalarda Park ve ark. (2007 ve 2008) onestep-RT-PCR yöntemine oranla nested-PCR sonucunda saptanan pozitiflik oranlarının belirgin derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da nested-PCR yöntemi ile saptanan BoNoV ve Nebovirus oranları onestep-RT-PCR yöntemi ile saptananlardan daha yüksek bulunmuş olup, böylece geniş bir perspektiften BEC enfeksiyonlarına ilgili epidemiyolojik sorgulamaların yapılabilmesi de sağlanmıştır.

Buzağı ishallerinde miks enfeksiyonların varlığı sık rastlanan bir durumdur. Her bir patojenin buzağı ishallerinde oynadığı rol ve neden olduğu klinik seyir farklılık göstermektedir. Genellikle RVA ve *C. parvum*, buzağı ishallerinden sorumlu etkenlerin başında gelmektedir (Cho ve ark., 2013). İshalli buzağılarda BEC'lerin kayda değer oranda tespit edilmesi, çiftliklerde enterik hastalıklarla mücadele açısından bu virüslara ilişkin çalışmaların artmasını gerektirmektedir. BEC'lerin yapılan deneysel çalışmalarda her ne kadar ishale neden olduğu kanıtlanmış (Hall ve ark., 1984; Jung ve ark., 2014; Oliver ve ark., 2003; Otto ve ark., 2011 ve Smiley ve ark., 2002) olsa da bu virüslerin patojenitesi ve hastalık oluşturma mekanizmaları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle sahada klinik tabloların gelişmesinde diğer enteropatojenlerin de rol almış olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, yapılan çalışmalarda BEC'ler ile diğer enteropatojenlerin

miks enfeksiyonlarına ilgili tespitler oldukça fazladır (Cho ve ark., 2013; Di Bartolo ve ark., 2011; Mauroy ve ark., 2009a ve Park ve ark., 2007).

Bu çalışmada 76 BEC pozitif gaita örneğinin her ne kadar tümü test edilememiş ise de, diğer enteropatojenler yönünden test edilenlere ilgili veriler dikkate alınarak çoklu enfeksiyonlar değerlendirildiğinde; *C. parvum*, BRV ve BCoV için sırasıyla %46,5 (27/58), %31,9 (23/72) ve %20,8 (15/72) oranlarında çoklu enfeksiyon saptanmıştır (Çizelge 3.5). Buna karşın test edilebilen gaita örneklerinin tümü (n=72) -muhtemelen ishal olgularında sıklıkla antibiyotik kullanımı nedeniyle- *E. coli* yönünden negatif olarak bulunmuştur.

BoNoV ve Nebovirus yönünden pozitif bulunan dışkı örnekleri diğer enteropatojenlerin varlığı yönünden değerlendirildiğinde (Çizelge 3.5); BoNoV pozitif örneklerin 18'i sadece BoNoV için pozitif iken, %48,8 (20/41), %37 (20/54) ve %25,9'inin (14/54) sırasıyla *C. parvum*, BRV ve BoCoV için de pozitif olduğu belirlenmiştir. Milnes ve ark. (2007) İngiltere'de 44 BoNoV pozitif örneğin 16'sında diğer enteropatojenlerin saptanmadığını, çoklu enfeksiyon oranlarının ise BRV, *C. parvum* ve BCoV için sırasıyla %31,8, %25 ve %11,4 olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Park ve ark (2007) ise tespit ettikleri 60 adet BoNoV örneğin 22'sinde yalnızca BoNoV, 38'inde diğer enteropatojenler bakımından da pozitiflik saptamışlardır. Konuyla ilgili diğer birçok bildirim (Cho ve ark. 2013; Di Bartolo ve ark., 2011; Hassine-Zaafraane ve ark. 2012; Kaplon ve ark. 2013 ve Mauroy ve ark., 2009a) benzer şekilde, bu çalışmada gaita örneklerinde BoNoV'ların sıklıkla bir ya da birkaç enteropatojenle birlikte saptandığı görülmüştür. Elde edilen verilere göre, bu çalışmada Nebovirus pozitif bulunan 37 dışkı örneğinden, diğer enteropatojenler yönünden de kontrol edilebilen 34 örneğin 14'ünde yalnızca Nebovirus varlığı saptanmış olmasına karşın, *C. parvum*, BRV ve BCoV katılımlı enfeksiyon oranları sırasıyla %51,6 (16/31), %32,4 (11/34) ve %8,8 (3/34) olarak belirlenmiştir. Bu veriler, birçok araştırmacı tarafından bildirildiği üzere Nebovirusun buzağılarda tek başına ya da diğer enteropatojenler ile birlikte enfeksiyona neden olabildiğini ortaya koymuştur (Bartels ve ark., 2010; Cho ve ark., 2013 ve Park ve ark., 2008). Diğer yandan test edilen 167 gaita örneğinin hem Nebovirus hem de BoNoV yönünden

pozitiflik oranı (%10,2; 17/167); bazı çalışmalarda (Hassine-Zaafrane ve ark., 2012 ve Kaplon ve ark., 2011) bildirilen oranların (sırasıyla %0,6 ve %2) aksine, söz konusu virus enfeksiyonlarının hiç de küçümsenmeyecek bir oranda birlikte seyrettiğini ortaya koymuştur.

Yeni doğan buzağı ishallerinin önemli nedenlerinin başında halen enfeksiyöz etkenlerin geldiği ve doğum sonrasındaki 0-2 haftalık yaş olmak üzere ilk 1 ay yaşa sahip buzağların enfeksiyona daha duyarlı olduğu genel bir kabuldür. Nitekim bu çalışmada da materyal sağlanan buzağların büyük çoğunluğunun (93/167) 0-2 haftalık yaş aralığında olması, bu yaş aralığı ile ishal vakaları arasındaki korelasyonu bildiren çalışmalarla uyumludur (Bartels ve ark., 2010 ve Cho ve ark., 2013).

BEC pozitifliği ile yaş arasındaki ilişki değerlendirildiğinde (Çizelge 3.3); BoNoV ve Nebovirus tespitlerinin en yaygın olarak 0-1 haftalık yaş aralığında; bunu takiben 1-2 haftalık ve 2-3 haftalık yaş aralığında olduğu gözlenmiştir. Cho ve ark. (2013) BoNoV ve Nebovirusların en yaygın olarak 2 haftalık yaşta; Milnes ve ark. (2007) ilk 1 ay içerisinde, Kaplon ve ark. (2011) ile Ferragut ve ark. (2016) 0-9 gün yaş aralığındaki buzağlarda, Candido ve ark. (2016) Nebovirus tespitlerinin tümünün (%4,8) 20 gün ve altındaki buzağlarda gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise BoNoV tespitlerinin (%8,5) 3-28 günlük buzağlardan yapıldığı belirtilmiştir (Yılmaz ve ark., 2011). Bu çalışmaların yanı sıra Jor ve ark. (2010) BoNoV tespitini çoğunlukla 90 gün yaş ve altında, Park ve ark. (2007, 2008) BoNoV tespitinin 90 gün yaş, Nebovirus tespitini ise 70 gün yaş altındaki buzağlarda bildirmişlerdir. Bunlardan başka 4-7 aylık sağlıklı buzağlarda BoNoV tespiti yönünde bildirimler de (Mijowski ve ark., 2010; Milnes ve ark., 2007 ve Reuter ve ark., 2009) bulunmaktadır. Nitekim bu çalışmada da 7 aylık bir sığırdan BoNoV saptanmıştır. BEC enfeksiyonu ile yaş arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde, GIII.1 ve GIII.2 genotipli BoNoV varlığının da önemli olabileceği düşünülmüştür. GIII.1 prototip virusu Bo/Jena/80/DE ile yapılan bir çalışmada, inokulasyondan 14-16 saat sonra buzağlarda ishalin başladığı gözlenmiş; bu durumun saha koşullarında 1-2 günlük buzağlarda ishalin gözlenebileceğini ortaya koyduğu bildirilmiştir (Otto ve ark., 2011). Nitekim bu çalışmada GIII.1

RdRp gen bölgesine sahip BoNoV ile enfekte olduğu saptanan buzağılardan (n=9) yedisinin 7 gün yaş ve altında olduğu; diğer iki buzağının ise 8 ve 10 gün yaşa sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmalarda söz konusu etkenlerin tespitinin farklı yaş aralıklarına ilişkin olmasında, örneklem, işletmenin yönetim farklılıkları, verilerin değerlendirilme kriterleri farklılıkları, vb. etkisi olduğu açıktır. Genel olarak doğum sonrasındaki ilk birkaç hafta için duyarlılığa işaret eden veriler olmakla birlikte, yaş faktörünün BoNoV için belirgin bir risk faktörü olmadığı ancak, pozitif örneklerin çoğunlukla genç hayvanlarda tespit edilmesinin yaş arttıkça riskin azaldığını ortaya koyduğu bildirilmiştir (Milnes ve ark., 2007).

Enfeksiyöz etkenlere bağlı olarak yeni doğan buzağı ishallerinin görülme sıklığının -bakım ve besleme koşullarının yeterince sağlanamaması, enfeksiyonlara direncin azalması, vb. nedenlerle- mevsimsel koşullardan etkilendiği bilinmektedir. Bu çalışmada BEC tespiti oranları sonbahar (%51,7), kış (%50), ilkbahar (%42,2) ve yaz (%35) mevsimleri için gitgide azalan oranlarda saptanmıştır. En yaygın BoNoV tespiti kış mevsimini takiben ilkbahar, sonbahar ve yaz mevsiminde; Nebovirus tespiti ise sırasıyla sonbahar (%41,4), kış (%20,4), ilkbahar (%17,2) ve yaz (%15) mevsiminde yapılmıştır (Çizelge 3.4). Bununla birlikte bu sonuçlar Nebovirus için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,05$), BoNoV için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,496$). Yapılan çalışmalarda da, mevsimler itibarıyla bazı oransal farklılıklar olmakla birlikte (Hassine-Zaafrane ve ark., 2012; Milnes ve ark., 2007 ve Park ve ark., 2008) BEC'lerin tüm yıl boyunca tespit edilebileceği, özellikle entansif işletmeler için buzağların yıl boyunca kapalı ortamda bulunmalarının ve ortam koşullarının sabit olmasının etkili olabileceği bildirilmiştir (van der Poel ve ark., 2003).

BoNoV genotiplerinin varlığı/yaygınlığının ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, moleküler karakterizasyonu, vb. üzerine yapılan araştırmalar, konuya ilişkin bilgileri her geçen gün arttırmakta ve ileride geliştirilmesi muhtemel tanı, biyolojik ürün geliştirme, vb. konularına ilişkin bilgi birikimi sağlamaktadır. Bu

çalışmada da 34 BoNoV'a ait RdRp gen bölgesi dizinlerinin filogenetik analizi, GIII.1 (n=9) ve GIII.2 (n=25) genotipli virusların ülkemizde sirküle olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3.4). Türkiye'de BoNoV üzerine yapılan her iki çalışmada da (Gülaçtı ve ark., 2016 ve Yılmaz ve ark., 2011) yalnızca GIII.2 genotipi saptanmış olmasına karşın; bu çalışmada Türkiye'de GIII.2 yanı sıra GIII.1 varlığı ilk kez belirlenmiştir. Amerika, Avrupa'daki birçok ülke, Güney Kore ve Arjantin'deki birçok çalışmada da GIII.2 genotipin belirgin oransal fazlalığına rağmen her iki genotipin de saptandığı bildirilmiştir (Di Martino ve ark., 2014; Ferragut ve ark., 2016; Jor ve ark., 2010; Kaplon ve ark., 2011; Park ve ark., 2007; Reuter ve ark., 2009 ve Smiley ve ark., 2003). GIII.1 genotipinin az olarak tespit edilmesinin muhtemel nedenleri arasında RT-PCR için tam olarak uyumlu olmayan primerlerin kullanılması, polimeraz gen bölgesine yönelik primerlerin kullanılması, GIII.P2/GIII.1 rekombinant BoNoV'ların varlığı ve bu serotipin saçılım süresinin kısa olmasının etkili olabileceği bildirilmiştir (Otto ve ark., 2011).

Bu çalışmada entansif işletmelerden birisinde (II) üç farklı yılda gözlenen ishal salgınları sırasında materyal temin edilmiş olup, saptanan BoNoV'ların RdRp kısmi dizin analizi 2006 ve 2016 yılında GIII.2 genotipli; 2008 yılında ise hem GIII.1 hem GIII.2 genotipli virusların işletmede bulunduğunu ortaya koymuştur. Benzeri şekilde V nolu işletmede 2013 yılında gözlenen ishal salgınında da iki BoNoV genotipinin de varlığı belirlenmiştir. Eş zamanlı olarak farklı genotiplerin varlığının, rekombinasyon ihtimalini arttıran önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (Reuter ve ark., 2009). Nitekim bu çalışmada saptanan iki rekombinant suş da II nolu işletmede 2008 yılında görülen ishal salgını sırasında örneklenen buzağılardan saptanmıştır.

İshalli buzağılarda saptanan Neboviruslardan dizin analizi yapılanların (n=20) tümünün Nebraska-benzeri RdRp gen bölgesine sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.6). Benzer şekilde Amerika, İtalya, Güney Kore ve Tunus'ta yapılan çalışmalarda saptanan tüm suşlar Nebraska-benzeri RdRp tipine sahiptirler (Di Martino ve ark., 2011; Hassine-Zaafraane ve ark., 2012; Park ve ark., 2008 ve Smiley ve ark., 2003). Candido ve ark. (2016) Brezilya'da tespit ettikleri tüm Nebovirusları Newbury1 ile yakın ilişkili bulmuşlardır. İngiltere'de de Oliver ve ark., (2006a)

Nebraska virus yanı sıra Newbury1 tespit etmişlerdir. Kaplon ve ark., (2011) ise Fransa'da Nebraska benzeri genotip yanı sıra muhtemel üçüncü bir genotipin de sirküle olduğunu bildirmiştir. Nebovirusun epidemiyolojisiyle ilgili az sayıda çalışma olmasına rağmen bugüne kadar elde edilen sonuçlar Newbury1 benzeri suşların yalnızca İngiltere ve Brezilya'da tespit edildiği yönündedir.

BoNoV'ların genetik karakterizasyonları ile yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu RdRp bölgesinin küçük bir kısmının moleküler analizine dayalı olarak yapılmış; sadece az bir çalışma ise hem RdRp hem de kapsit gen bölgesine ilişkin verileri sunmuştur (Di Martino ve ark., 2014; Ferragut ve ark., 2016; Han ve ark., 2004; Jor ve ark., 2010; Mauroy ve ark., 2009b ve Oliver ve ark., 2004). Bu çalışmada dört örneğin tam kapsit bölgesi analizi ve bir örneğin kısmi kapsit gen bölgesi analizi yapılmış olup, GIII.1 (n=1) ve GIII.2 (n=4) benzeri genotipli oldukları tespit edilmiştir. Dünyadaki diğer çalışmalarda da GIII.1 kapsit gen bölgesine sahip BoNoV'ların GIII.2 kapsit gen bölgesine sahip olanlardan çok daha az tespit edildiği bildirilmiştir (Oliver ve ark., 2006b). Bu çalışmada tespit edilen GIII.2 genotipindeki virusların kendi aralarındaki nükleotit bazındaki benzerlikleri %81,80-98,44; aminoasit bakımından benzerlikleri %90,42-98,64 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).

Diğer Calicivirus genuslarında olduğu gibi NoV'larda rekombinasyon sıklıkla tespit edilmektedir ve bu çoğunlukla genetik olarak ilişkili suşlar arasında olmaktadır. Crossover (geçiş çaprazlanma) noktası genellikle oldukça korunaklı bir bölge olan ORF1-ORF2 birleşim noktası yani RdRp gen bölgesinin bitiş, kapsit gen bölgesinin başlangıç noktasıdır (Bull ve ark., 2007 ve Han ve ark., 2004). Genellikle homolog NoV'lar arasında sıklıkla rekombinasyon oluşmasına karşın, genetik olarak uzak ilişkili NoV suşları arasında da nadir olmakla birlikte rekombinasyonlara rastlanılmaktadır (Rohayem ve ark., 2005). İlk BoNoV rekombinant suşu (Bo/Thirsk10/00/UK) İngiltere'de tespit edilmiştir (Oliver ve ark., 2004). ORF1'in 3' ucu, tam ORF2 ve ORF3 gen bölgelerinin tamamının dizin analizine göre, Bo/Thirsk10/00/UK RdRp gen bölgesi olarak GIII.1 içerisinde sınıflandırılmış ancak, ORF1-2 birleşim bölgesinden 3' yönünde ise GIII.2 olarak sınıflandırılmıştır

(Oliver ve ark., 2004). Coğrafi olarak farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda da bu rekombinant suş ile ilişkili (GIII.P1/GIII.2) rekombinant suşlar tespit edilmiştir (Di Martino ve ark., 2014; Han ve ark., 2004; Jor ve ark., 2010 ve Mauroy ve ark., 2009b). Farklı coğrafi bölgelerde yapılan moleküler çalışmalarda ortaya konulan potansiyel rekombinant suşlar, BoNoV'ların çeşitliliğinin ve genetik heterojenitesinin kanıtı olarak sayılmaktadır.

Bu çalışmada tespit edilen iki BoNoV'un (Bo/TR/2008/Aksaray/K063 ve Bo/TR/2006/Aksaray/K59) hem RdRp hem de kapsit gen bölgesi bakımından GIII.2 genotipli olduğu saptanmıştır. Ancak Bo/TR/2008/Aksaray/K056 ve Bo/TR/2008/Aksaray/K060 suşlarının filogenetik analizlerinden RdRp ve kapsit genlerin arasındaki uyumsuzluk dikkati çekmektedir. Bu örneklerin sağlandığı Aksaray ilindeki II nolu işletmede 2008 yılında yapılan örneklemelerde hem GIII.1 hem de GIII.2 NoV'ların varlığı Şekil 3.4 ve Şekil 3.11'de filogenetik analizlerde yer almaktadır. Bu nedenle söz konusu suşların RdRp gen bölgesinin 3' ucu ve tam kapsit bölgesi (ORF1-ORF2 birleşim bölgesi) dikkate alınarak yapılan SimPlot analizinde, her iki virusun da rekombinant olduğu ve muhtemel rekombinasyon kırılma noktasının 327. nükleotit olduğu saptanmıştır (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Hem SimPlot analizinde hem de fiogenetik analizde bu noktadan öncesi her iki virus için de GIII.1 genotipindeyken, bu noktadan sonrası GIII.2 genotipine benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar ışığında Bo/TR/2008/Aksaray/K056 ve Bo/TR/2008/Aksaray/K060 suşlarının GIII.P1/GIII.2 rekombinant suşları olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmayla Türkiye'de ilk defa BoNoV rekombinant suşları tanımlanmış ve bu suşların Avrupa'da tanımlanan diğer rekombinant suşlar gibi GIII.P1/GIII.2 olduğu saptanmıştır. Bu çalışmadaki bulgular, diğer rekombinasyon çalışmalarında (Di Martino ve ark., 2014 ve Oliver ve ark., 2004) olduğu gibi ORF1-2 birleşim bölgesinde öncelikli rekombinasyon bölgesinin varlığı ve bunun dışında da ve P1A ve P2 domainlerinin ara yüzünde ve/veya P2 *doimain*'i içinde de muhtemel rekombinasyon kırılma noktaları belirlenmesi (Rohayem ve ark., 2005) nedeniyle, RdRp gen bölgesi analizinin BoNoV ya da diğer calicivirusların karakterizasyonunda tek başına yeterli olamayacağını ortaya koymakta ve kesin karakterizasyon için tam kapsit gen bölgesinin dizin analizi gerekli görülmektedir.

BoNoV'un doğru karakterizasyonunun önemi BoNoV genotiplerinin prototip virusları olan Jena ile Newbury2'nin antijenik ve serolojik olarak birbirinden farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Oliver ve ark., 2006b). NoV kapsit gen bölgesinde rekombinasyon sonrasında oluşan genomik çeşitlilik, oluşan yeni rekombinantların immun yanıtta kaçmasına neden olarak virulensi önemli bir rol oynayabilir ve bu şekilde reenfeksiyonlara da neden olabilir (Reuter ve ark., 2006 ve Rohayem ve ark., 2005). Ayrıca serolojik çalışmalarda kapsit bölgesinin genotipi önem taşımaktadır. İki genotip arasında çapraz reaksiyonun olmaması nedeniyle buzağı popülasyonlarında her iki kapsit tipinin prevalansının belirlenmesi ve buzağıları BoNoV enfeksiyonlarından korumak için yapılacak olan aşılara uygun genotipin ya da her iki genotipin de eklenmesi önerilmektedir (Oliver ve ark., 2004 ve Oliver ve ark., 2006b).

Nebovirusların kısmi RdRp gen bölgesine yönelik yapılan moleküler çalışmalar iki tip RdRp olduğunu göstermiştir (Oliver ve ark., 2006a). Bunun tersine, Nebovirus polimeraz gen bölgesinin 3' ucu ile kapsit bölgesinin 5' ucundaki 522 nt'lik bölgenin dizin analizinde ya da tam kapsit dizininin analizlerinde herhangi farklı kapsit tipi ortaya koymak mümkün olmamıştır (Han ve ark., 2004; Oliver ve ark., 2006a; Park ve ark., 2008 ve Smiley ve ark., 2002). Ancak yakın zamanda, farklı coğrafik orijine sahip 31 suşun tam uzunluktaki kapsit bölgesinin dizin analizine göre dört farklı *Lineage* önerilmiştir (D'Mello ve ark., 2009). İlginç bir şekilde, bu dört farklı *Lineage*'ı, kapsitin korunaklı NH terminal bölgesine (S bölgesine) dayanarak ayırt etmek mümkün değildir (Di Martino ve ark., 2011 ve D'Mello ve ark., 2009). Bu nedenle, Nebovirusların kapsit *Lineage*'ını belirlemek için tam kapsit gen bölgesi dizin analizinin yapılması gerektiği bildirilmiştir (Di Martino ve ark., 2011).

Günümüzde Nebovirusların kapsit gen bölgesiyle ilgili yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Önceki çalışmalarda tek bir kapsit tipinin olduğu düşünülmüştür. Park ve ark.'nın (2008) 59 Nebovirus pozitif örneğin 12'sinin kapsit analizinin yapılabildiği çalışmada tespit edilen tüm suşlar tek bir dalda, Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/UK suşlarından farklı olarak yer almışlardır. Buradan yola

çıkılarak Bo/Newbury1/76/UK ve Bo/Nebraska/80/UK'den evrimleştiği düşünülen bu suşların, daha sonra D'Mello ve ark. (2009) tarafından *Lineage 3*'te yer aldıkları ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre *Lineage 1*, Amerika, İtalya ve İngiltere'de saptanan suşlardan, *Lineage 2* Japonya ve Amerika'da elde edilen suşlardan; *Lineage 3* Güney Kore suşlarından, son olarak *Lineage 4* ise İngiltere ve İtalya'da tespit edilen suşlardan meydana gelmektedir. Bu çalışmada tam kapsit gen bölgesi analizi yapılabilen Bo/AksarayK056/08/TUR ve Bo/AnkaraA4/14/TUR suşları ise sırasıyla *Lineage 3* ve *Lineage 4* yer almaktadır (Şekil 3.16). Henüz çok az Nebovirus kapsit dizini bulunduğu için bu konuda coğrafik bir değerlendirme yapmak mümkün olmamaktadır. Ayrıca, Nebovirus kapsitindeki değişken bölgelerin yapılan homoloji modelinde antijenik determinantları oluşturduğu, bu bölgelerdeki farklılıkların virusların antijenik olarak farklılaşmasına yol açabileceği ve tanımlanan dört farklı *Lineage*'da yer alan virusların antijenik olarak farklı olabileceği bildirilmiştir. Bunu açığa kavuşturmak için ileride serolojik ve antijenik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır (D'Mello ve ark., 2009).

Bu sonuçlar Türkiye'de en az iki Nebovirus kapsit tipinin sirküle olduğunu göstermektedir. Bu suşların her ikisi de RdRp gen bölgesi yönünden Nebraska benzeri olmalarına rağmen; Bo/AksarayK056/08/TUR kapsit gen bölgesi bakımından en çok *Lineage 3*'de yer alan Bo/SA63/04/KOR, Bo/MA271/04/KOR, Bo/MA362/04/KOR Bo/MA474/04/KOR, Bo/MA729/04/KOR (%89.62-90.35 nt yönünden, %95.99-96.72 aminoasit yönünden) suşlarıyla benzerlik göstermektedir (Şekil 3.14 ve 3.15). Bo/AnkaraA4/14/TUR ise kapsit gen bölgesi bakımından Bo/DijonA386/FR suşu, daha önce rekombinant olarak tanımlanan Bo/16TE/10/ITA suşu ve Bo/BEC/Penrith150/00/UK Bo/BEC/Starcross93r/00/UK, Bo/BEC/Starcross117/00/UK, Bo/BEC/Penrith142/00/UK, Bo/BEC/Penrith143/00/UK (%87,56-94,35 nt, %94,12-97,81 aminoasit) suşlarıyla benzemekte (Şekil 3.14 ve 3.15) ve bu suşlarla birlikte *Lineage 4*'de yer almaktadır (Şekil 3.16). Neboviruslarda başlangıçta iki farklı RdRp, tek bir kapsit bölgesinin tanımlanmasına karşın, her geçen gün yeni saha viruslarının elde edilmesi ve moleküler analizleri, Neboviruslara ilişkin yeni bilgiler sunmaktadır. *Lineage 4*'de yer alan virusların tümünün Newbury-1 RdRp gen bölgesine sahip olması,

rekombinant Nebovirus suşu olan Bo/16TE/10/ITA ile yakınlığı dikkate alınarak, Bo/AnkaraA4/14/TUR Nebovirusun SimPlot analizi bu suşun rekombinasyona uğradığını ve 609. nükleotinin muhtemel rekombinasyon kırılma noktası olduğunu göstermiştir (Şekil 3.19).

Genel olarak Calicivirüslerde (özelikle NoV ve Sapovirüslerde) RdRp-Kapsit birleşim bölgesi rekombinasyonun en yoğun olduğu bölgedir (Bull ve ark., 2007 ve Hansman ve ark., 2005). Ancak bunun dışında da kapsit gen bölgesi içinde P1A ve P2 domain'leri arasında ve P2 domaininde yer alan rekombinasyon bölgeleri de tespit edilmiştir (Rohayem ve ark., 2005). Nebovirüslerde kapsit gen bölgesinin en değişken kısmı P2 domaini içerisindeki 288-420 aminoasitleri arasına denk gelen bölgedir (D'Mello ve ark., 2009). Ancak bu çalışmada saptanan rekombinant virüsün (Bo/AnkaraA4/14/TUR) rekombinasyon kırılma noktası, Di Martino ve ark. (2011) tarafından bildirilen rekombinant suş (Bo/16TE/10/ITA) benzeri, kapsit gen bölgesinin S domaininde yer almaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak Nebovirus kapsit gen bölgesinin farklı bölgelerinde rekombinasyon meydana gelmesinin olası olduğu ve bu nedenle gelecekte elde edilecek virüslerin tam kapsit gen bölgesinin dizin analizi sonuçlarının önemini belirtmekte yarar görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı illerde (Aksaray, Amasya, Ankara, Bursa, Çankırı, Denizli, Eskişehir, İzmir, Kırklareli ve Şanlıurfa) yerleşik entansif sığır yetiştiriciliği işletmeleri ya da küçük aile işletmelerinde gözlenen ishal olguları sırasında materyal temin edilen 167 ishali buzağıya ait gaita örneklerinin kullanıldığı bu çalışmada, buzağı ishallerinde etiyolojik ajan olarak BEC'lerin sorgulanması ve BEC tespitlerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışmada elde edilen veriler;

1. BEC yönünden PCR temelli yöntemler kullanılarak test edilen 167 örneğin 76'sı pozitif bulunmuştur. Tanı materyallerinin çoğunluğunun 2012-2016 yıllarında olmakla birlikte, 2002-2016 yıllarına ait olduğu ve farklı yıllarda örneklenen entansif işletmeler ve küçük işletmelerin çoğunda sözkonusu ishal olgularında olası etiyolojik ajan olarak BEC tespitinin yapıldığı göz önünde bulundurulduğunda, ülkemizde buzağılarda BEC enfeksiyonlarının uzun yıllardır var olduğu ve muhtemelen önemli ekonomik kayıplara neden olduğu sonucuna varılmıştır.
2. Saptanan BEC pozitif gaita örnekleri, BoNoV ve Nebovirus yönünden incelendiğinde 56'sında BoNoV, 37'sinde Nebovirus varlığı saptanmıştır. Dışkı örneklerinin 17'sinde ise hem BoNoV hem de Nebovirus varlığı tespit edilmiştir. Türkiye'de daha önce yapılan çalışmalarda BoNoV bildirimi yapılmış olmasına karşın, bu çalışmada ilk defa Nebovirus tespiti yapılmıştır. BoNoV'un Neboviruslardan daha yaygın olduğu yönündeki literatürlere benzer olarak bu çalışma enfekte işletme sayısı, örnekleme yılları ve örneklenen hayvan sayılarının her birisi için değerlendirildiğinde, BoNoV enfeksiyonlarının Nebovirus enfeksiyonlarından daha yaygın olduğu yönünde bir kanaate varılmıştır.

3. BoNoV ve Nebovirus varlığı saptanması ile örneklenen buzağuların yaşları arasındaki ilişki, her bir etken için ayrı ayrı sorgulanarak, bazı epidemiyolojik bilgilere ulaşılması hedeflenmiştir. Yaş grupları için belirlenen BoNoV ve Nebovirus pozitiflik oranları, her iki etkenin de sıklıkla 0-1 haftalık (%53,1; %34,3) yaş aralığında, bunu takiben 1-2 haftalık (%37,7; %22,6) ve 2-3 haftalık (%25; %21,4) yaş aralığındaki buzağularda saptandığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte belirlenen yaş/enfeksiyon oranları dağılımı BoNoV açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,038$); Nebovirus açısından anlamlı bulunmamıştır.
4. BoNoV ve Nebovirus varlığı ile enfeksiyonun saptandığı mevsim arasındaki ilişki de, her bir etken için ayrı ayrı sorgulanmıştır. Mevsimsel dağılıma bakıldığında BEC'in en fazla sonbaharda (%51,7), bunu takiben kış (%50), ilkbahar (%42,2) ve yaz (%35) mevsimlerinde tespit edildiği gözlenmiştir. En yaygın BoNoV tespiti ise kış (%40,7) mevsimini takiben ilkbahar (%32,8), sonbahar (%27,6) ve yaz (%25) mevsiminde; Nebovirus tespiti ise en fazla sonbahar (%41,4) mevsiminde olmakla birlikte, kış (%20,4), ilkbahar (%17,2) ve yaz (%15) mevsiminde yapılmış olup, bu sonuçlar Nebovirus için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,05$), BoNoV için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,496$).
5. Buzağı ishallerinde miks enfeksiyonlara sıklıkla rastlanılması nedeniyle BEC'lerin epidemiyolojisiyle ilgili daha sağlıklı yorum yapabilmek amacıyla temin edilen gaita örnekleri diğer enteropatojenlerden BRV, BCoV, *E. coli* ve *C. parvum* yönünden de incelenmiş olup, birçok olguda *E. Coli* hariç diğer söz konusu etkenlerin de varlığı saptanmıştır. *E.coli* tespit edilememesinin örneklerin temini öncesinde genellikle antibiyotik kullanımı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.
6. Çalışma sırasında saptanan BoNoV'ların RdRp gen bölgesi dizin analizi sonrasında Türkiye'de daha önce tespit edilen GIII.2 genotipine sahip 25

BoNoV yanısıra bu çalışma ile ilk kez bildirimi yapılan GIII.1 genotipine sahip dokuz BoNoV identifiye edilmiştir.

7. Neboviruslar RdRp gen bölgesinin dizin analizine göre Nebraska-benzeri ve Newbury1-benzeri olmak üzere iki genotipe ayrılırlar. Bu çalışmada saptanan Nebovirusların tümünün Nebraska-benzeri olduğu saptanmıştır.
8. Araştırmada saptanan BoNoV ve Nebovirusların kapsit gen bölgesi yönünden de dizin analizi çalışması yapılmıştır. Kapsit gen bölgesi dizin analizi yapılabilen iki Nebovirus suşunun filogenetik ağaçta farklı *Lineage*'larda (*Lineage* 3 ve 4) yer aldığı görülmüştür. Kapsit gen bölgesi dizin analizi sonucunda *Lineage* 4'de sınıflandırılan bir Nebovirus suşunun, bu grupta yer alan diğer saha suşları gibi Nebraska-benzeri RdRp gen yapısına sahip olmasına karşın, her iki genotip için korunaklı ve benzer olan kapsit dizininden farklı oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle rekombinasyonun sorgulanması için uygulanan Simplot analizi, bu suşun İtalya'da bildirilen Bo/16TE/10/ITA ile çok benzer bir rekombinasyona sahip olduğunu ortaya koymuştur.
9. BoNoV suşlarının ikisi hariç diğerlerinin RdRp gen bölgeleri ile uyumlu kapsit yapısına sahip olduğu saptanmıştır. İki BoNoV suşunun RdRp ve kapsit gen bölgesine ait dizinleri arasındaki uyumsuzluk dikkate alınarak yapılan Simplot analizi sonucunda her iki suşun (GIII/Bo/TR/2008/Aksaray/K056 ve GIII/Bo/TR/2008/Aksaray/K060) GIII.P1/GIII.2 rekombinant suş oldukları saptanmıştır.

Tüm bu sonuçlar; BEC'lerin tek başına ya da diğer enteropatojenler ile birlikte Türkiye'de uzun yıllardır buzağı ishal olgularının etiyolojik ajanlarından olduğunu göstermiştir. Ayrıca saptanan BEC'lerin moleküler karakterizasyon çalışmaları farklı genotiplerde yer alan BoNoV ve Nebovirusların hastalığın oluşumunda rol oynadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmadan elde edilen bilgilerden hareketle;

1. Türkiye’de uzun yıllardan bu yana varlığı yönünde bilgiler edindiğimiz Nebovirus ve BoNoV’ların ishal olgularındaki rolünün ortaya konulması için daha geniş popülasyonlar kullanılarak prevalans çalışmalarının yapılması,
2. Seroprevalans çalışmaları için geliştirilmiş ticari kitler bulunmadığı için, VLP kullanılarak hazırlanacak ELISA sistemlerinin bilimsel çalışmalar kapsamında geliştirilerek, seroprevalans çalışmaları ile söz konusu etkenlerin yaygınlığına dair yeni bilgilerin edinilmesi,
3. Bu çalışma kapsamında, gerek insan ve gerekse buzağılarda enfeksiyon nedeni olan BoNoV’lar için sıklıkla bildirildiği gibi, 2 rekombinant suş tanımlanmıştır. Yeni çalışmaların, rekombinasyonların gerçekleşme oranı ve niteliği konusunda bilgiler sunacağı düşünülmektedir. Benzeri durum Neboviruslar için de söz konusu olacaktır. Bu bağlamda saha suşlarının elde edilmesi ve moleküler karakterizasyonları yönünde çalışmaların sürdürülmesi,
4. Buzağı ishallerine neden olan bazı patojenlere ilişkin ticari aşılar bulunmasına rağmen, günümüzde BEC enfeksiyonlarına yönelik ticari bir aşı bulunmamaktadır. Bununla birlikte bilimsel çalışmalar kapsamında bu amaca yönelik aşı geliştirme çalışmaları vardır. Türkiye’de enfeksiyon etkeni olan BoNoV’lara ilgili bilgilerin artması sonrasında, aşı geliştirme çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

ÖZET

Buzağlarda BEC Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojisi

Bu çalışmada, farklı illerde (Aksaray, Amasya, Ankara, Bursa, Çankırı, Denizli, Eskişehir, İzmir, Kırklareli ve Şanlıurfa) yerleşik entansif sığır yetiştiriciliği işletmeleri ya da küçük aile işletmelerinde gözlenen ishal olguları sırasında 167 ishalli buzağılardan temin edilen gaita örneklerinde BEC'lerin (BoNoV ve Nebovirus) varlığının yanı sıra diğer bazı enteropatojenler (BRV, BCV, vb) de sorgulanmıştır. Bu amaçla BEC RdRp gen bölgesini hedef alan Onestep-RT-PCR sonrasında Nested-PCR uygulanmış, test edilen gaita örneklerinin 76'sı BEC yönünden pozitif bulunmuştur. Saptanan BEC pozitif materyaller, BoNoV ve Nebovirus yönünden incelendiğinde 56'sında BoNoV, 37'sinde Nebovirus varlığı saptanmış ve 17 gaita örneği söz konusu her iki etken yönünden de pozitif bulunmuştur. Ayrıca BEC tespiti verileri örneklenen hayvanların yaşı, örneklemenin yapıldığı mevsim ve diğer enteropatojenler ile çoklu enfeksiyonlar yönünden de incelenmiştir.

RdRp gen bölgesi dizin analizi bilgileri 34 BoNoV için elde edilmiş olup, filogenetik analiz sonucunda, 25 BoNoV daha önce de Türkiye'de ishalli buzağılardan saptanmış olan GIII.2 genotipinde, 9 BoNoV ise ilk kez bu çalışmada bildirilen GIII.1 genotipinde olarak tanımlanmıştır. Nebovirusların tümünün Nebraska-benzeri olduğu tespit edilmiştir. RdRp gen bölgesi dizin bilgilerine sahip olunan BoNoV suşlarından kapsit gen bölgesi dizin bilgileri de elde edilebilen ikisinin rekombinant suş (GIII.P1/GIII.2) olduğu, diğerlerinin RdRp gen bölgeleri ile uyumlu kapsit yapısına sahip olduğu saptanmıştır. Kapsit gen bölgesi dizin analizi yapılabilen iki Nebovirus suşunun filogenetik ağaçta farklı *Lineage*'larda (*Lineage* 3 ve 4) yer aldığı görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada hem entansif işletmelerde hem de küçük aile işletmelerinde görülen buzağı ishallerinin oluşumunda BEC'lerin tek başına ya da diğer enteropatojenlerle birlikte önemli rol oynadığı saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada Türkiye'de Nebovirus ve GIII.1 genotipli BoNoV'ların tespitinin yanısıra bu virusların rekombinant suşlarının varlığı da ilk kez tanımlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Bovine Enterik Calicivirus, Buzağı, İshal, Nebovirus, Norovirus.

SUMMARY

Molecular Epidemiology of BEC Infections in Calves

In this study, we tested fecal samples of 167 diarrheic calves from small and inbred herds of different provinces (Aksaray, Amasya, Ankara, Bursa, Çankırı, Denizli, Eskişehir, İzmir, Kırklareli ve Şanlıurfa) for presence of BECs (BoNoV and Nebovirus) along with other enteric pathogens (BRV, BCV etc). For this purpose we used Nested-PCR after Onestep-RT-PCR targeting RdRp region. Out of 167 samples 76 found positive for BEC and of these positives 56 were identified as BoNoV and 37 were identified as Nebovirus and 17 of the samples were found positive for both agents. Along with BEC positivity, age distribution of calves, season of samplings and contribution of other enteric agents are also investigated.

Sequencing data of RdRp gene region is obtained for 34 BoNoV and their phylogenetic analysis showed that 25 BoNoVs have GIII.2 genotype which is similar to those previously reported from Turkey and 9 BoNoVs have GIII.1 genotype which is firstly reported in this study. All Neboviruses were found Nebraska-like. BEC strains having sequenced for RdRp were also investigated for capsid gene region. Of these samples two BoNoV strains were identified as recombinant strain (GIII.P1/GIII.2) while the capsid sequence data of other samples were found consistent with their RdRp gene region. Two Nebovirus strains which were able to be sequenced, were observed on different lineages (lineage 3 and 4) in phylogenetic tree.

As a result BECs were designated having an important role on newborn diarrhea alone or along with other enteric pathogens for both small and inbred herds. Also this study is the first to reveal presence of Neboviruses and GIII.1 genotyped BonoV along with the recombinant strains of these viruses in Turkey.

Keywords: Bovine Enteric Calicivirus, Calf, Diarrhea, Nebovirus, Norovirus

KAYNAKLAR

- ALCALA AC, HIDALGO MA, OBANDO C, VIZZI E, LIPRANDI F, LUDERT JE (2003). Molecular identification of bovine enteric caliciviruses in Venezuela. *Acta Cient Venez* **54**:148–152
- ALKAN F, KARAYEL I, CATELLA C, BODNAR L, LANAVE G, BÁNYAI K, DI MARTINO B, DECARO N, BUONAVOGLIA C, MARTELLA V (2015). Identification of a Bovine Enteric Calicivirus, Kırklareli Virus, Distantly Related to Neboviruses, in Calves with Enteritis in Turkey. *J Clin Microbiol* **53**: 3614–3617.
- ANDO T, NOEL JS, FANKHAUSER RL (2000). Genetic Classification of ‘Norwalk-like Viruses’. *J Infect Dis* **181**: 336–348.
- ATMAR RL, ESTES MK (2001). Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* **14**: 15–37.
- BARTELS CJM, HOLZHAUER M, JORRITSMA R, SWART WAJM, LAM TJGM (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med* **93**: 162–169.
- BERTOLOTTI-CIARLET A, CRAWFORD SE, HUTSON AM, ESTES MK (2003). The 3’ end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* **77**: 11603–11615.
- BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ (1974). Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, **1**: 149-152.
- BRIDGER JC, HALL GA, BROWN JF (1984). Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infect Immun* **43**: 133–138.
- BULL RA, TANAKA MM, WHITE PA (2007). Norovirus recombination. *J Gen Virol* **88**: 3347–3359.
- BULL RA, WHITE PA (2010). Genome organization and recombination, In: *Caliciviruses Molecular and Cellular Virology*, Ed: Hansman GS, Jiang XJ, Green K, Caister Academic Press, Norfolk, UK. s:45-65.
- CANDIDO M, ALENCAR ALF, ALMEIDA-QUEIROZ SR, BUZINARO MG, MUNIN FS, GODOY SHS, LIVONESI MC, FERNANDES AM, SOUSA RLM (2016). First detection and molecular characterization of Nebovirus in Brazil. *Epidemiol Infect* 1–3.

- CHEN R, NEILL JD, NOEL JS, ANNE M, GLASS RI, ESTES MK, VENKATARAM B V (2004). Inter- and Intragenus Structural Variations in Caliciviruses and Their Functional Implications Inter- and Intragenus Structural Variations in Caliciviruses and Their Functional Implications. *J Virol* **78**: 6469–6479.
- CHO Y IL, YOON KJ (2014). An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci* **15**: 1–17.
- CHO Y-I, HAN J-I, WANG C, COOPER V, SCHWARTZ K, ENGELKEN T, YOON K-J (2013). Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Vet Microbiol* **166**: 375–385.
- CLARKE IN, LAMBDEN PR (1997). The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* **78**: 291–301.
- CLARKE IN, LAMBDEN PR (2000). Organization and Expression of Calicivirus Genes. *J Infect Dis* **181**: 309–316.
- CLARKE IN, ESTES, MK, GREEN, KY, HANSMAN GS, KNOWLES NJ, KOOPMANS MK, MATSON DO, MEYERS G, NEILL JD, RADFORD A, SMITH AW, STUDDERT MJ, THIEL HJ, VINJÉ J. (2012). Caliciviridae, *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*, Ed: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, Elsevier. s: 977-986.
- CLC Main Workbench 7 (2015). <https://www.qiagenbioinformatics.com/>, CLCbio Qiagen, Aarhus, Denmark
- COSTANTINI V, LOISY F, JOENS L, LE GUYADER FS, SAIF LJ (2006). Human and Animal Enteric Caliciviruses in Oysters from Different Coastal Regions of the United States. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1800–1809.
- CROUCH CF, OLIVER SP, FRANCIS MJ (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and Escherichia col F5 (K99). *Vet Rec* **149**: 105–108.
- D'MELLO F, JERVIS SM, EDWARDS PM, OLIVER SL, BRIDGER JC (2009). Heterogeneity in the capsid protein of bovine enteric caliciviruses belonging to a new genus. *Virology* **387**: 109–116.
- DASTJERDI A M, GREEN J, GALLIMORE CI, BROWN DW, BRIDGER JC (1999). The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* **254**: 1–5.
- DASTJERDI AM, SNODGRASS DR, BRIDGER JC (2000). Characterisation of the bovine enteric calici-like virus, Newbury agent 1. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 125–131.
- DENG Y, BATTEN CA, LIU BL, LAMBDEN PR, ELSCHNER M, GÜNTHER H, OTTO P, SCHNÜRCH P, EICHHORN W, HERBST W, CLARKE IN (2003). Studies of

- epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J Clin Microbiol* **41**: 2300–2305.
- DI BARTOLO I, PONTERIO E, MONINI M, RUGGERI FM (2011). A pilot survey of bovine norovirus in northern Italy. *Vet Rec* **169**: 73.
- DI FELICE E, MAUROY A, POZZO FD, THIRY D, CECI C, DI MARTINO B, MARSILIO F, THIRY E (2016). Bovine noroviruses: a missing component of calf diarrhoea diagnosis. *Vet J* **207**: 53–62.
- DI MARTINO B, DI PROFIO F, DI FELICE E, MELEGARI I, CECI C, MAUROY A, THIRY E, MARTELLA V, MARSILIO F (2014). Genetic heterogeneity of bovine noroviruses in Italy. *Arch Virol* **159**: 2717–2722.
- DI MARTINO B, DI PROFIO F, MARTELLA V, CECI C, MARSILIO F (2011). Evidence for recombination in neboviruses. *Vet Microbiol* **153**: 367–372.
- DUIZER E, SCHWAB KJ, NEILL FH, ATMAR RL, KOOPMANS MPG, ESTES MK (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* **85**: 79–87.
- EDGAR RC (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797, doi:10.1093/nar/gkh340.
- FARKAS T, NAKAJIMA S, SUGIEDA M, DENG X, ZHONG W, JIANG X (2005). Seroprevalence of noroviruses in swine. *J Clin Microbiol* **43**: 657–661.
- FERRAGUT F, VEGA CG, MAUROY A, CONCEIÇÃO-NETO N, ZELLER M, HEYLEN E, URIARTE EL, BILBAO G, BOK M, MATTHIJNSSENS J, THIRY E, BADARACCO A, PARREÑO V (2016). Molecular detection of bovine Noroviruses in Argentinean dairy calves: Circulation of a tentative new genotype. *Infect Genet Evol* **40**: 144–150.
- GREEN KY, ANDO T, BALAYAN MS, BERKE T, CLARKE IN, ESTES MK, MATSON DO, NAKATA S, NEILL JD, STUDDERT MJ, THIEL HJ (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* **181**: 322–330.
- GREEN K (2013). Caliciviridae: The Noroviruses, In: *Fields virology* 6th ed., Ed: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. s:583–609.
- GULAÇTI I, SOZDUTMAZ I, ISIDAN H (2016). Molecular Characterization of the Bovine Noroviruses from Diarrhoeic Calves in Turkey 2. *Turk J Vet Anim Sci* **40**: 1–6.
- GUNTHER H, OTTO P (1987). Diarrhea in young calves. “Zackenvirus” (Jena agent 117/80) a new diarrhea pathogen in calves. *Arch Exp Veterinärmed* **41**: 934–938
- HALL GA, BRIDGER JC, BROOKER BE, PARSONS KR, ORMEROD E (1984). Lesions

of gnotobiotic calves experimentally infected with a calicivirus-like (Newbury) agent. *Vet Pathol* **21**: 208–215.

HAN MG, CHEETHAM S, AZEVEDO M, THOMAS C, SAIF LJ (2006). Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves. *Vaccine* **24**: 317–326.

HAN MG, SMILEY JR, THOMAS C, SAIF LJ (2004). Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J Clin Microbiol* **42**: 5214–5224.

HAN MG, WANG Q, SMILEY JR, CHANGE KO, SAIF LJ (2005). Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses. *J Clin Microbiol* **43**: 778–785.

HANSMAN GS, TAKEDA N, OKA T, OSETO M, HEDLUND KO, KATAYAMA K (2005). Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis* **11**: 1916–1920.

HARDY ME, KRAMER SF, TREANOR JJ, ESTES MK (1997). Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch Virol* **142**: 1469–1479.

HASSINE-ZAAFRANE M, KAPLON J, SDIRI-LOULIZI K, AOUNI Z, POTHIER P, AOUNI M, AMBERT-BALAY K (2012). Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses detected in central-eastern Tunisia. *Arch Virol* **157**: 1599–1604.

<http://www.cdc.gov/norovirus/downloads/keyfacts.pdf>, Norovirus illness key facts, Erişim Tarihi: 22.04.2016.

JIANG X, ESPUL C, ZHONG WM, CUELLO H, MATSON DO (1999). Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol* **144**: 2377–2387.

JIANG X, WANG M, GRAHAM DY, ESTES MK (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* **66**: 6527–6532.

JOHNSON PC, MATHEWSON JJ, DUPONT HL, GREENBERG HB (1990). Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* **161**(1): 18–21.

JOR E, MYRMEL M, JONASSEN CM (2010). SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. *J Virol Methods* **169**: 1–7.

- JUNG K, SCHEUER KA, ZHANG Z, WANG Q, SAIF LJ (2014). Pathogenesis of GII.2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves. *Vet Microbiol* **168**: 202–207.
- KAPIKIAN AZ (2000). The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis* **181 Suppl** : 295–302.
- KAPIKIAN AZ, WYATT RG, DOLIN R, THORNHILL TS, KALICA AR, CHANOCK RM (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* **10**: 1075–1081.
- KAPLON J, FREMY C, BERNARD S, REHBY L, AHO S, POTHIER P, AMBERT-BALAY K (2013) Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine* **31**: 2433–2440.
- KAPLON J, GUENAU E, ASDRUBAL P, POTHIER P, AMBERT-BALAY K (2011). Possible novel Nebovirus genotype in cattle, France. *Emerg Infect Dis* **17**: 1120–1123.
- KARST SM, ZHU S, GOODFELLOW IG (2015). The molecular pathology of noroviruses. *J Pathol* **235**: 206–216.
- KOOPMANS M, VAN STRIEN E, VENNEMA H (2003) Molecular epidemiology of human caliciviruses, In: *Viral Gastroenteritis*, Ed: Desselberger U, Gray J, Elsevier. s:530.
- KRONEMAN A, VEGA E, VENNEMA H, VINJÉ J, WHITE PA, HANSMAN G, GREEN K, MARTELLA V, KATAYAMA K, KOOPMANS M (2013.) Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* **158**: 2059–2068.
- LARSSON A (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* **30**: 3276–3278.
- LIU BL, LAMBDEN PR, GUNTHER H, OTTO P, ELSCHNER M, CLARKE IN (1999). Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* **73**: 819–825.
- LOLE KS, BOLLINGER RC, PARANJAPPE RS, GADKARI D, KULKARNI SS, NOVAK NG, INGERSOLL R, SHEPPARD HW, RAY SC (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intra-subtype recombination. *J Virol* **73**: 152–160.
- MARTELLA V, CAMPOLO M, LORUSSO E, CAVICCHIO P, CAMERO M, BELLACICCO AL, DECARO N, ELIA G, GRECO G, CORRENTE M, DESARIO C, ARISTA S, BANYAI K, KOOPMANS M, BUONAVOGLIA C (2007). Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis* **13**: 1071–1073.
- MARTELLA V, LORUSSO E, DECARO N, ELIA G, RADOONA A, D'ABRAMO M, DESARIO C, CAVALLI A, CORRENTE M, CAMERO M, GERMINARIO CA,

- BANYAI K, DI MARTINO B, MARSILIO F, CARMICHAEL LE, BUONAVOGLIA C (2008). Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis* **14**: 1306–1308.
- MATHIJS E, MUYLKENS B, MAUROY A, ZIANT D, DELWICHE T, THIRY E (2010). Experimental evidence of recombination in murine noroviruses. *J Gen Virol* **91**: 2723–2733.
- MATTHEWS RE (1979). Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **12**: 129–296.
- MATTISON K, SHUKLA A, COOK A, POLLARI F, FRIENDSHIP R, KELTON D, BIDAWID S, FARBER JM (2007). Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis* **13**: 1184–1188
- MAUROY A, GILLET L, MATHIJS E, VANDERPLASSCHEN A, THIRY E (2011). Alternative attachment factors and internalization pathways for GII.2 bovine noroviruses. *J Gen Virol* **92**: 1398–1409.
- MAUROY A, SCIPIONI A, MATHIJS E, SAEGERMAN C, MAST J, BRIDGER JC, ZIANT D, THYS C, THIRY E (2009a). Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA. *Vet Microbiol* **137**: 243–251.
- MAUROY A, SCIPIONI A, MATHIJS E, THYS C, THIRY E (2009b). Molecular detection of kobuviruses and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe. *Arch Virol* **154**: 1841–1845.
- MENON VK, GEORGE S, SHANTI AA, SARAVANABAVAN A, SAMUEL P, RAMANI S, ESTES MK, KANG G (2013). Exposure to human and bovine noroviruses in a birth cohort in southern India from 2002 to 2006. *J Clin Microbiol* **51**: 2391–2395.
- MESQUITA JR, BARCLAY L, NASCIMENTO MSJ, VINJE J (2010). Novel Norovirus in Dogs with Diarrhea. *Emerg Infect Dis* **16**: 980–982.
- MIJOVSKI JZ, POLJSAK-PRIJATELJ M, STEYER A, BARLIC-MAGANJA D, KOREN S (2010). Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infect Genet Evol* **10**: 413–420.
- MILNES AS., BINNS SH., OLIVER SL., BRIDGER JC (2007). Retrospective study of noroviruses in samples of diarrhoea from cattle, using the Veterinary Laboratories Agency's Farmfile database. *Vet Rec* **160**: 326–330.
- MOON HW (1997). Comparative histopathology of intestinal infections. In: *Mechanism in The Pathogenesis of Enteric Disease* Ed: Paul PS, Francis DH, Benfield DA, Springer Science, Business Media, New York. s:1–19.
- NAYAK MK, BALASUBRAMANIAN G, SAHOO GC, BHATTACHARYA R, VINJE J, KOBAYASHI N, SARKAR MC, BHATTACHARYA MK, KRISHNAN T (2008).

Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology* **377**: 117-23.

OLIVER S., BROWN DW., GREEN J, BRIDGER J. (2004). A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* **326**: 231–239.

OLIVER SL, ASOBAYIRE E, CHARPILLENNE A, COHEN J, BRIDGER JC (2007a). Complete genomic characterization and antigenic relatedness of genogroup III, genotype 2 bovine noroviruses. *Arch Virol* **152**: 257–272.

OLIVER SL, ASOBAYIRE E, DASTJERDI AM, BRIDGER JC (2006a). Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* **350**: 240–250.

OLIVER SL, BATTEN C A., DENG Y, ELSCHNER M, OTTO P, CHARPILLENNE A., CLARKE IN, BRIDGER JC, LAMBDEN PR (2006b). Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. *J Clin Microbiol* **44**: 992–998.

OLIVER SL, DASTJERDI A M, WONG S, EL-ATTAR L, GALLIMORE C, BROWN DWG, GREEN J, BRIDGER JC (2003). Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* **77**: 2789–2798.

OLIVER SL, WOOD E, ASOBAYIRE E, WATHES DC, BRICKELL JS, ELSCHNER M, OTTO P, LAMBDEN PR, CLARKE IN, BRIDGER JC (2007b). Serotype 1 and 2 bovine noroviruses are endemic in cattle in the United Kingdom and Germany. *J Clin Microbiol* **45**: 3050–3052.

OTTO PH, CLARKE IN, LAMBDEN PR, SALIM O, REETZ J, LIEBLER-TENORIO EM (2011). Infection of Calves with Bovine Norovirus GIII.1 Strain Jena Virus: an Experimental Model To Study the Pathogenesis of Norovirus Infection. *J Virol* **85**: 12013–12021.

PARK SI, JEONG C, YOON SS, CHOY HE, SAIF LJ, PARK SH, KIM YJ, JEONG JH, PARK SI, KIM HH, LEE BJ, CHO HS, KIM SK, KANG MI, CHO KO (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 SI, JEONG C, KIM HH, PARK SH, PARK SJ, HYUN BH, YANG DK, KIM SK, KANG MI, CHO KO (2007). Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea. *Vet Microbiol* **124**: 125–133.

PARK SI, JEONG C, PARK SJ, KIM HH, JEONG YJ, HYUN BH, CHUN YH, KANG MI, CHO KO (2008). Molecular detection and characterization of unclassified bovine enteric caliciviruses in South Korea. *Vet Microbiol* **130**: 371–379.

- PARK SI, PARK DH, SAIF LJ, JEONG YJ, SHIN DJ, CHUN YH, PARK SJ, KIM HJ, HOSMILLO M, KWON HJ, KANG MI, CHO KO (2009). Development of SYBR Green real-time RT-PCR for rapid detection, quantitation and diagnosis of unclassified bovine enteric calicivirus. *J Virol Methods* **159**: 64–68.
- PINTO P, WANG Q, CHEN N, DUBOVI EJ, DANIELS JB, MILLWARD LM, BUONAVOGLIA C, MARTELLA V, SAIF LJ (2012). Discovery and genomic characterization of noroviruses from a gastroenteritis outbreak in domestic cats in the us. *PLoS One* **7**: doi:10.1371/journal.pone.0032739.
- PRASAD BV, HARDY ME, DOKLAND T, BELLA J, ROSSMANN MG, ESTES MK (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**: 287–290.
- PUUSTINEN L, BLAZEVIC V, HUHTI L, SZAKAL ED, HALKOSALO A, SALMINEN M, VESIKARI T (2012). Norovirus genotypes in endemic acute gastroenteritis of infants and children in Finland between 1994 and 2007. *Epidemiol Infect* **140**: 268–275.
- REUTER G, PANKOVICS P, EGYED L (2009). Detection of genotype 1 and 2 bovine noroviruses in Hungary. *Vet Rec* **165**: 537–538.
- REUTER G, VENNEMA H, KOOPMANS M, SZUCS G (2006). Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary. *J Clin Virol* **35**: 84–88.
- ROHAYEM J, MUNCH J, RETHWILM A (2005). Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *J Virol* **79**: 4977–4990.
- SCIPIONI A, MAUROY A, VINJÉ J, THIRY E (2008). Animal noroviruses. *Vet J* **178**: 32–45.
- SMILEY JR, CHANG KO, HAYES J, VINJE J, SAIF LJ (2002). Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol* **76**: 10089–10098.
- SMILEY JR, HOET AE, TRAVEN M, TSUNEMITSU H, SAIF LJ (2003). Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J Clin Microbiol* **41**: 3089–3099.
- SMITH AW, SKILLING DE, CHERRY N, MEAD JH, MATSON DO (1998). Calicivirus emergence from ocean reservoirs: Zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis* **4**: 13–20, doi:10.3201/eid0401.980103.
- SOEDIONO B (2008). Norovirus immunobiology and vaccine design. University of North Carolina, Department of Microbiology and Immunology, Doktora Tezi.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013). MEGA6:

- Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725–2729.
- TAN M, HEGDE RS, JIANG X (2004). The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to Histo-Blood group antigen receptors **78**: 6233–6242.
- TAN M, JIANG X (2014). Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. *Expert Rev Mol Med* **16**: e5, doi:10.1017/erm.2014.2.
- THOMAS C, JUNG K, HAN MG, HOET A, SCHEUER K, WANG Q, SAIF LJ (2014). Retrospective serosurveillance of bovine norovirus (GIII.2) and nebovirus in cattle from selected feedlots and a veal calf farm in 1999 to 2001 in the United States. *Arch Virol* **159**: 83–90.
- THORNE LG, GOODFELLOW IG (2014). Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol* **95**: 278–291.
- VAN DER POEL WH, VINJE J, VAN DER HEIDE R, HERRERA MI, VIVO A, KOOPMANS MP (2000). Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* **6**: 36–41.
- VAN DER POEL WHM, VAN DER HEIDE R, VERSCHOOR F, GELDERBLUM H, VINJÉ J, KOOPMANS MPG (2003). Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Vet Microbiol* **92**: 297–309.
- VINJE J (2015). Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* **53**: 373–381.
- WANG QH, MYUNG GH, CHEETHAM S, SOUZA M, FUNK JA, SAIF LJ (2005). Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* **11**: 1874–1881.
- WIDDOWSON M-A, ROCKX B, SCHEPP R, VAN DER POEL WH., VINJE J, VAN DUYNHOVEN YT, KOOPMANS MP (2005). Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol* **76**: 119–128.
- WISE AG, MONROE SS, HANSON LE, GROOMS DL, SOCKETT D, MAES RK (2004). Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. *Virus Res* **100**: 165–177.
- WOLF S, WILLIAMSON W, HEWITT J, LIN S, RIVERA-ABAN M, BALL A, SCHOLES P, SAVILL M, GREENING GE (2009). Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet Microbiol* **133**: 184–189.
- WOODE GN, BRIDGER JC (1978). Isolation of Small Viruses Resembling Astroviruses and Caliciviruses from Acute Enteritis Of Calves. *J Med Microbiol* **11**: 441–452.

YILMAZ H, TURAN N, ALTAN E, BOSTAN K, YILMAZ A., HELPS CR, CHO KO (2011). First report on the phylogeny of bovine norovirus in Turkey. *Arch Virol* **156**: 143–147.

ZHENG D-P, ANDO T, FANKHAUSER RL, BEARD RS, GLASS RI, MONROE SS (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**: 312–323.



EKLER

Ek-1. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan etik kurul kararı.



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

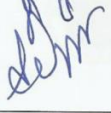
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :03/07/2013
TOPLANTI NO :2013-13
DOSYA NO :2013-77
KARAR NO :2013-13-89

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Feray Alkan'ın yaptığı ve araştırmacı olarak İlke Karayel'in katıldığı "Buzağılarda Enterik Calicivirus (BEC) Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sığır
Hayvan Sayısı : 150
Geçerlilik Süresi : 15/07/2013 – 15/07/2015

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatın CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: İlke

Soyadı: KARAYEL

Doğum yeri ve tarihi: İzmir 02.03.1987

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji

Anabilim Dalı, 0312 3170315

II- Eğitimi

2005-2010: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Lisans/Yükseklisans Eğitimi Ankara)

2001-2005: Tire Kutsan Anadolu Lisesi Tire/ İZMİR

1998-2001: Fatih İlköğretim Okulu Bayındır /İZMİR

1993-1998: Fatih İlköğretim Okulu ve Kazım Dirik İlköğretim Okulu Bayındır/İZMİR

Yabancı dili: İngilizce (İleri Seviye), Almanca (Orta Seviye)

III- Ünvanları

2010: Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2013- 2016: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları

KARAYEL İ, ALKAN F (2015). DNA Aşıları ve Veteriner Hekimlik Alanında Kullanımı, *Van Vet J* **26** (3), 177-182

ALKAN F, KARAYEL İ, CATELLA C, BODNAR L, LANAVE G, BÁNYAI K, DÍ MARTİNO B, DECARO N, BUONAVOGLIA C, MARTELLA V (2015). Identification of a Bovine Enteric Calicivirus, Kırklareli Virus, Distantly

Related to Neboviruses, in Calves with Enteritis in Turkey. *J Clin Microbiol* **53** (11), 3614-3617

ALKAN F, TİMURKAN MÖ, KARAYEL İ (2015). The molecular characterization and detection of Group A rotavirus from calves with diarrhea in Turkish Republic of Northern Cyprus. *Kafkas Üniv. Vet.Fak.Derg.* 21 (1), 127-130

ALKAN F, TİMURKAN MÖ, KARAYEL İ. (2013). Rotavirus diarrhea outbreaks in Arabian thoroughbred foals in a stud farm, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **19**, A141-A145. DOI:10.9775/kvfd.2012.8186

Bildiriler

COŞKUN N, KARAYEL İ, ALKAN F. Serological Investigation of Bovine Enteroviruses in Cattle from Different Provinces. 2015 International Congress on Applied Biological Science, Üsküp, MAKEDONYA (Sözlü Bildiri)

KARAYEL İ, ALKAN F. Buzağı İshallerinde Viral Etiyoloji. 11. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi 21-24 Mayıs 2015, Samsun, Türkiye. (Sözlü Bildiri)

KARAYEL İ, ALKAN F. Virus Kaynaklı Buzağı İshalleri. 17. International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress 28-30 Nisan 2015, İstanbul, Türkiye. (Sözlü Bildiri)

ALKAN F, KARAYEL İ, CATELLA C, BODNAR L, LANAVE G, BANYAI K, DECARO N, BOUNAVOGLIA C, MARTELLA V. Discovery Of A Novel Bovine Enteric Calicivirus, Kırklareli Virus, in Calves With Enteritis In Turkey. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 31 Ekim- 3 Kasım 2014, Viyana, Avusturya. (Poster Sunumu)

ALKAN F, KARAYEL İ, LANAVE G, BANYAI K, BOUNAVOGLIA C, MARTELLA V. Isolation And Molecular Characterization of A Bovine Enterovirus From Calves With Diarrhea, Turkey. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 31 Ekim- 3 Kasım 2014, Viyana, Avusturya. (Poster Sunumu)

OGUZOGU TC., TİMURKAN MÖ, FARAJI A, KARAYEL İ, BİLGE-DAĞALP S, ALKAN F, AKÇA Y. Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Bazı Önemli Viral Hastalıklara Karşı Kontrol ve Mücadele Modellerine Genel Bakış. X. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27.Eylül.2012 Kuşadası-Aydın-Türkiye. (Sözlü Bildiri)

KARAYEL İ, TİMURKAN M.H, NALBANTOĞLU S, ALKAN F. Simultaneous infection with Rota-, Coronavirus and Cryptosporidium in calves with diarrhea. IX.

International Congress of Veterinary Virology, Madrid-İspanya, 4-7 Ekim 2012.
(Poster Sunumu)

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Workshop on molecular diagnosis of relevant zoonotic arboviruses, Animal Health and Research Center (INIA-CISA), Valdeolmos, Madrid, İspanya (15-19 Haziran 2015).

ERASMUS Doktora Stajı; İtalya Bari Üniversitesi'nde "Department of Veterinary Public Health" de 4 ay süreyle (24.09.2012-31.01.2013) staj.

Almanya Hannover Veteriner Yüksek Okulu Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Diyagnostik Bölümünde Staj (09.03.2009-03.04.2009).

Almanya Hannover Veteriner Yüksek Okulu Küçük Hayvan Kliniği'nde Yaz Stajı (20.07.2009-30.08.2009)

Almanya Hannover Veteriner Yüksek Okulu Balık Hastalıkları Enstitüsü'nde 14,5 saat üzerinde Balık Hastalıklarında Klinik Diyagnostik Kursu (2008-2009 Bahar yarıyılı)

ERASMUS aracılığıyla Hannover Veteriner Yüksek Okulunda 1 yıl süreyle Eğitim (2008-2009)

Burslar

2214-TÜBİTAK Yurtdışı Araştırma Burs Programı (Doktora Öğrencileri için) Calicivirus and Rotavirus Genomics (Survey on Native Calicivirus and Rotavirus Genomes by Using Next Generation Sequence Analysis). Institute of Veterinary Medical Research, Hungarian Academy of Sciences, Budapeşte-Macaristan 3 Ay süreyle (28.09.2015-25.12.2015) araştırma.

2211- TÜBİTAK Yurtiçi Doktora Bursu, 2010 yılı

Ödüller

2009-2010 Eğitim-Öğretim yılı Prof. Dr. Metin TAŞBAŞ Ödülü

Projeler

KKTC'de Sığır, Koyun ve Keçilerin Yeni Doğan Yavrularında Rotavirus, Coronavirus, salmonella Spp. Escherichia Coli K99/F5 ile Cryptosporidium Spp. Etkenlerinin Araştırılması, KKTC Gıda, Tarım ve Enerji Bakanlığı, Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ve TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (Yardımcı Araştırmacı)

Buzağılarda Enterik Calicivirus Enfeksiyonlarının (BEC) Moleküler Epidemiyolojisi, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, No: 13L3338011 2013-2016 (Yardımcı Araştırmacı)

VII- Diğer

Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2014).

