



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



SIĞIR CORONAVİRUSLARIN S GEN BÖLGESİ MOLEKÜLER ANALİZİ

Seçil SEVİNÇ

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feray ALKAN**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIR CORONAVİRUSLARIN S GEN BÖLGESİ
MOLEKÜLER ANALİZİ**

Seçil SEVİNÇ

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feray ALKAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
18L0239002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2019**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sığır Coronavirusların S Gen Bölgesi Moleküler Analizi” 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.

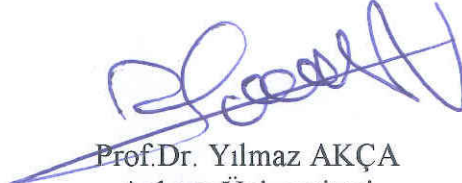
Öğrencinin Adı Soyadı: Seçil SEVİNÇ

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalında
Seçil SEVİNÇ tarafından hazırlanan
“Sığır Coronavirusların S Gen Bölgesi Moleküler Analizi”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul / ~~red~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.07.2019


Prof.Dr. Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof.Dr. Yakup YILDIRIM
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Raportör


Prof.Dr. Feray ALKAN
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof.Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof.Dr. Sibel YAVRU
Selçuk Üniversitesi
Üye

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

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	1
1.1.1. Coronavirusların Sınıflandırılması	2
1.1.2. Coronavirus Yapısı ve Genomu	3
1.1.3. Coronavirus Transkripsiyon ve Replikasyonu	7
1.1.4. Virus Enfeksiyonunun Konak Hücreler Üzerindeki Etkileri	10
1.2. Epidemiyoloji	10
1.3. Bulaşma	14
1.4. Patoloji	15
1.5. Klinik Bulgular	16
1.6. Nekropsi Bulguları	17
1.7. İmmunoloji, Kontrol ve Koruma	18
1.8. Tanı	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Gereç	21
2.1.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar ve Tanı Materyalleri	21
2.1.2. Referans Virus	23
2.2. Yöntem	23
2.2.1. Çalışmada Kullanılan Örneklerin Hazırlanması	23
2.2.1.1. Nazal Akıntı Örneklerinin Hazırlanması	23
2.2.1.2. Gaita Örneklerinin Hazırlanması	23
2.2.2. Moleküler Genetik İdentifikasyon	24
2.2.2.1. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	24
2.2.2.2. BCoV Tanısı için RT-Nested PCR Tekniği	25

2.2.2.2.1. Viral RNA'nın Revers Transkripsiyonu	25
2.2.2.2.2. BCoV Tanısı için Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Nested PCR) Tekniği	26
2.2.2.3. BCoV S Gen Bölgesinin Revers Transkripsiyon – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR) Tekniği ile Çoğaltılması	28
2.2.2.3.1. Ekstraksiyon ve Viral RNA'nın Revers Transkripsiyonu	28
2.2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tekniği	28
2.2.3. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi	31
2.2.4. Dizin Analizi	32
2.2.5. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	32
2.2.6. Filogenetik Analiz	32
3. BULGULAR	33
3.1. BCoV Tanısı İçin RT-Nested PCR ve Filogenetik Analiz	33
3.2. BCoV'ların S Gen Bölgesi Moleküler Genetik Analizi	37
3.2.1. RT-PCR ve Dizin Analizi Sonuçları	37
3.2.2. Filogenetik Analiz Sonuçları	39
3.2.3. Nükleik Asit Benzerlik Sonuçları	45
3.2.4. S Gen Bölgesi Amino Asit Dizin Sonuçları	46
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67
EKLER	78
Ek 1. Etik Kurul Raporu	78
Ek 2. BCoV S Gen Bölgesi Amino Asit Dizin Tablosu	79
ÖZGEÇMİŞ	87

ÖNSÖZ

Coronavirüsler SARS-coronavirus ve MERS-coronavirus salgınları sonrasında zoonotik virüsler içinde önem kazanmışlardır. İnsan dahil birçok memeli türünde enfeksiyona neden olan bu virüsler, sığırlarda yenidoğan buzağı ishallerinin önemli etkenleri olarak birçok kez tanımlanmıştır. BCoV yenidoğan buzağı ishalleri yanı sıra, yetişkin sığırlarda da sindirim sistemini (winter disanteri) ve solunum sistemini enfekte eden nedenlerden birisi olarak öne çıkmıştır. Farklı sistemleri enfekte edebiliyor olmaları ve farklı konakçılara adaptasyona ilişkin bilgiler, virüsün “peplomer” veya “spike” glikoproteini kodlayan gen bölgesi (S gen) ile ilişkilendirildiği için bu bölgeye yönelik moleküler temelli çalışmalara ilgi artmıştır.

Bu çalışmada BCoV varlığı tespit edilen gaita ve nazal akıntısı örneklerinde S gen bölgesinin kısmi/tam dizini analizi yapılması ve sonuçlarının değerlendirilerek; ülkemizde sirkülasyonda olan BCoV’lar ile ilgili bilgilerin edinilmesi, farklı sistemlerde enfeksiyona sebep olan virüslerin S gen bölgesindeki farklılığın sorgulanması, mevcut aşılarda kullanılan Mebus suşu ile elde edilen saha suşları arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız hedeflenen verilere ulaşmış ve literatüre birçok farklı çalışmada kullanılabilecek yeni bilgileri sunmuştur.

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresince; bilgisi, deneyimleri ve görüşleriyle bana yol gösteren, her zaman, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Feray Alkan’a, aynı süreçte üzerimde emeği olan, destek ve yardımlarını esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz Akça ile Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Aykut Özkul, Prof. Dr. Seval Bilge Dağalp, Prof. Dr. Mehmet Taner Karaoğlu ve Prof. Dr. Tuba Çiğdem Oğuzoğlu ile Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan Yardımcı’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince birlikte görev yaptığım, laboratuvar ortamında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tüm araştırma görevlisi ve lisansüstü öğrenim gören öğrenci arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince; sonsuz sabrı, anlayışı, özveri ve desteğiyle her daim yanımda olan Dr. Mehmet Cevat Temizkan'a ve koşulsuz sevgileriyle hayatım boyunca her zaman bana destek olan sevgili annem Hülya Sevinç'e, sevgili babam H. Murat Sevinç'e, sevgili kardeşim Seher Sevinç Özgen'e sonsuz minnetlerimi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Projenin yürütülmesine mali destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 18L0239002) teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Celsius türünden derece, Santigrat derece
µl	Mikrolitre
BCoV	Sığır coronavirus (Bovine coronavirus)
BLAST	Basit Lokal Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
bp	Baz çifti
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
cm	Santimetre
CPE	Sitopatik Efekt (Cytopathic Effect)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Di nükleot trifosfat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	G kuvveti (G Force)
HE	Hemaglutinin-Esteraz
HRT-18	İnsan Rektal Tümör Hücresi-18 (Human Rectal Tumoral Tissue-18)
Ig	İmmunglobulin
kb	Kilobaz
kDa	kilodalton
M (Birim)	Molar
MDBK	Madin-Darby sığır böbrek hücresi
MERS	Orta Doğu Solunum Sistemi Sendromu (Middle East Respiratory Syndrome)
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
N	Nükleokapsid
NCBI	Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
ng	Nanogram
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu

pH	Asitlik/bazlık Ölçütü (Hidrojenin Gücü; Power of Hydrogen)
qPCR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)
RBD	Reseptör Bağlanma Bölgeleri (Reseptör Binding Domain)
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Bir dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions Per Minute)
RT-Nested PCR	Reverse transkripsiyon nested polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
S	Spike
SARS	Ciddi Akut Solunum Yetmezliği Sendromu (CASYS) (Severe Acute Respiratory Syndrome)
TAE	Tris Asetat Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)
TRS	Transkripsiyonal Regülatör Dizi (Transcriptional Regulatory Sequence)
U	Ünite
UTR	Translasyona Uğramayan Bölge (Untranslated Region)
VERO	Afrika yeşil maymun böbrek hücresi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. BCoV'un sınıflandırmadaki yeri	2
Şekil 1.2. BCoV'un genom yapısı	4
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ile elde edilmesi hedeflenen dizinlerin S gen bölgesindeki yerleşimi	30
Şekil 3.1. BCoV Nested-RT-PCR 2. tur sonucu jel görüntüsü	33
Şekil 3.2. BCoV'ların nükleik asitleri ile N gen filogenetik analizi	35
Şekil 3.3. BCoV kısmi S gen bölgesi çoğaltılması için farklı primerlerle yapılan RT-PCR jel görüntüleri	38
Şekil 3.4. BCoV amino asitleri ile S gen filogenetik analizi	41
Şekil 3.5. BCoV nükleik asitleri ile S gen filogenetik analizi	42
Şekil 3.6. BCoV nükleik asitleri ile çok değişken bölge (S1) filogenetik analizi	43
Şekil 3.7. BCoV amino asitleri ile çok değişken bölge (S1) filogenetik analizi	44
Şekil 3.8. Tüm BCoV S geni dizinlerinin benzerlik oranları	45
Şekil 3.9. BCoV kısmi S1 dizinlerinin benzerlik oranları	47
Şekil 3.10. Yerel BCoV'ların karşılaştırmalı amino asit değişim tablosu	51
Şekil 3.11. Farklı ülkelerde bildirilen BCoV'ların karşılaştırmalı amino asit değişimi tablosu	52

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Tanı materyallerinin temin edildiği yerler, örneklerin türü ve sayıları	21
Çizelge 2.2. Tanı materyallerine ilgili detaylı bilgileri	22
Çizelge 2.3. RT-PCR karışım bileşenleri ve protokolü	26
Çizelge 2.4. Nested-PCR’da kullanılan N gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla yönelik primerlerin dizinleri, yerleşim yerleri ve elde edilen ürün büyüklükleri	26
Çizelge 2.5. Nested-PCR karışım bileşenleri ve protokolü	27
Çizelge 2.6. Kullanılan primerlerin dizinleri, lokasyonu ve ampikon büyüklükleri	29
Çizelge 2.7. S gen bölgesinin eldesi amacıyla uygulanan PCR karışım bileşenleri ve programları	31
Çizelge 3.1. BCoV saptanan tanı materyallerine ilgili bilgiler ve N gen gen bankası kayıt no	34
Çizelge 3.2. N gen bölgesi dizinleri Gen Bankasına kaydedilen yerel BCoV suşları ve filogenetik analiz için kullanılan Gen Bankası veri tabanında kayıtlı diğer coronavirus suşlarına ilgili bilgiler	36
Çizelge 3.3. Farklı primer çiftleri ile kısmi /tüm S gen bölgesi dizinleri sağlanan BCoV’larla ilgili Gen Bankası numaraları	39
Çizelge 3.4. S gen bölgesi dizinleri Gen Bankası veri tabanında kayıtlı ve yerel BCoV suşları S filogenetik analiz için kullanılan Gen Bankası veri tabanında kayıtlı diğer coronavirus suşlarına ilgili bilgiler	40

1. GİRİŞ

Coronavirüsler insan dahil birçok memeli türünde tanımlanmış olup, özellikle Ciddi Akut Solunum Yetmezliği Sendromu (SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome) coronavirus ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS: Middle East Respiratory Syndrome) coronavirus salgınları sonrasında zoonotik öneme sahip virüsler arasında önem kazanmışlardır. Sığırlarda enfeksiyon oluşturan coronaviruslar (Bovine coronavirus: BCoV) ülkemizde ve birçok ülkede özellikle yenidoğan buzağılarda ishal olgularının önemli etkenleri olarak birçok kez tanımlanmıştır. BCoV'lar yenidoğan buzağı ishalleri yanı sıra yetişkin sığırlarda da sindirim sistemi enfeksiyonlarına (winter dysentery) neden olmakta, ayrıca solunum sistemi enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden birisi olarak görülmektedir. BCoV'ların, farklı sistemlere ilişkin klinik tablolara neden olabiliyor olmaları ve farklı konakçıya adaptasyonuna ilişkin bilgiler, özellikle “peplomer” veya “spike” glikoproteini kodlayan gen bölgesine (S gen) yönelik moleküler temelli çalışmalara ilgiyi arttırmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, virüsün yapısal/biyolojik özelliklerindeki değişikliklerin (sıklıkla rekombinasyonlar ile ilişkili) belirlenmesinin yanı sıra enfeksiyon ve aşılama bağli korunma konusunda da bilgiler edinilmesini sağlamaktadır.

1.1. Etiyoloji

Coronavirüsler, ilk defa Tyrrell ve ark. (1968), tarafından elektronmikroskopik incelemede karakteristik bir virion morfolojisine sahip etken olarak bildirilmiş; Mebus ve ark. (1973), tarafından virus olarak tanımlanmıştır. İnsanları etkileyen, 2003 yılında başlayan, SARS salgını sonucunda coronavirusların biyoçeşitliliği ve genomuği üzerine olan araştırmalar artmıştır. Coronavirüsler; insanlar haricinde, sığırların da dahil olduğu, evcil ve vahşı çok sayıda hayvan türüne bulaşabilmektedir (Wang ve Zhang, 2016; Woo ve ark., 2009). Coronavirüsler akut ve kronik solunum, sindirim ve merkezi sinir sistemi hastalıklarına neden olmaktadır (Weiss ve Navas-Martin, 2005).

1.1.1. Coronavirusların Sınıflandırılması

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi'nin 2016 yılında yayımlanan onuncu raporuna (10th Report of International Committee on Taxonomy of Viruses) göre; BCoV *betacoronavirus* genusunda yer alır ve SARS-Coronavirus ile ilişkilidir. *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* ve *Gammacoronavirus* genuslarını içeren *Coronavirinae* alt ailesi, *Torovirinae* alt ailesi ile birlikte *Coronaviridae* ailesini oluşturur. *Coronaviridae* ailesi *Nidovirales* dizininde yer alır (Şekil 1.1) (Han ve ark., 2006; ICTV, 2016).



Şekil 1.1. BCoV'un sınıflandırmadaki yeri.

Betacoronavirus genusu genetik ve serolojik özellikler bakımından değerlendirilerek üç gruba ayrılmıştır. BCoV'un ait olduğu Grup 2, fare hepatit virusu, tavuk enterik coronavirusu, sialodacryoadenitis virusu, domuz hemagglütinasyon ensefalomiyelit virusu ve insan coronavirusu OC43 gibi memelilerin ve kuşların viruslarını içerir. Grup 2'nin karakteristik bir özelliği, diğer gruplarda bulunmayan hemagglütinin-esteraz (HE) proteinini kodlayan bir genin varlığıdır (Liu ve ark., 2006).

RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enziminin varlığı, homolog RNA rekombinasyonunun yüksek frekansda olması ve coronavirusların genomlarının büyük olması coronavirusların çeşitliliğine neden olmaktadır (Woo ve ark., 2009).

Coronavirüslerin nasıl evrimleştirdiği ve birbirleri arasında olan ilişkilerin nasıl geliştirdiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu durumla ilgili çeşitli evrim modelleri önerilmiştir. İlk evrim modeli 2007’de ortaya konmuştur. Buna göre yarası coronavirüsleri tüm coronavirüslerin gen kaynağıdır (Vijaykrishna ve ark., 2007). Ancak sonrasında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar bu hipotezi desteklememektedir (Woo ve ark., 2009). Önerilen yeni evrim modeline göre yarası coronavirüsleri alfa ve beta genuslarındaki coronavirüslerin gen kaynağı iken, kuş coronavirüsleri gamma ve delta genuslarındaki coronavirüslerin gen kaynağıdır (Woo ve ark., 2012).

Coronavirüslerin kolaylıkla değişime uğrayabilmesi sonucunda suşlarında ve genotiplerinde çeşitliliğin artması söz konusudur. Son zamanlarda türler arasında bulaşma da bildirilmiştir. Bu durum 2003 yılında görülen SARS salgını gibi felaket getiren sonuçlarla ortaya çıkan zoonotik salgınların nedeni de olabilmektedir (Kim ve ark., 2019; Ohlson, 2010).

1.1.2. Coronavirus Yapısı ve Genomu

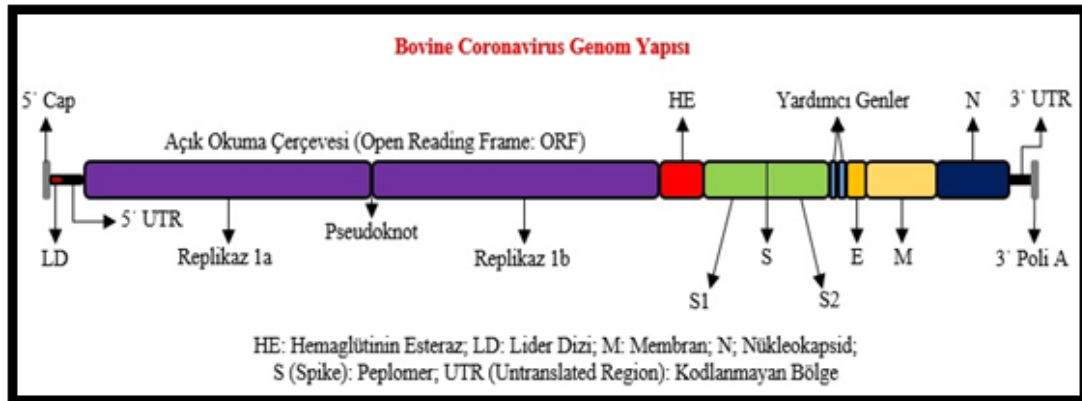
Coronavirüsler, elektronmikroskopi ile görüntülendiğinde güneş ışınları gibi dışı doğru uzanan karakteristik sivri glikoproteinlere sahiptir. Bu görünüm sebebiyle isimlerini Latince’de “taç” anlamına gelen “corona” sözcüğünden almışlardır (Tyrrell ve ark., 1968).

Coronavirüsler zarlı, 80 – 220 nanometre boyutunda, pleomorfik olup, genellikle küresel simetriye sahiptir. *Coronaviridae* ailesinin genomu, coronavirüsler için 27,6 – 31 kilobaz (kb) boyutunda olup, bilinen en büyük segmentsiz ribonükleik asit (RNA) virüsü genomudur. BCoV genomu ise 31 028 baz uzunluğundadır. Genom linear ve tek zincirli RNA içerir (MacLachlan ve Dubovi, 2017).

Genom segmentsiz, pozitif polariteye sahip RNA yapısında olup, sitoplazma içerisinde mesajcı RNA (mRNA) gibi fonksiyon görebilir. Genom içerisinde 5’ Cap

ve 3' PoliA kuyruğu barındırmaktadır ve bu durum viral genomun replikaz translasyonu için sitoplazmada mRNA gibi davranmasına yardımcı olmaktadır (Fehr ve Perlman, 2015; Lai, 1990).

Genom; yapının üçte ikisini oluşturan, içerisinde iki adet replikaz geni ve yapısal olmayan genler ile genomun kalan üçte birlik kısmını oluşturan yapısal ve yardımcı protein genlerinden oluşmaktadır. Genomun 5' ucunda RNA replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli saç tokası formunda lider dizi ve kodlanmayan bölgeler (Untranslated Region: UTR) bulunmaktadır. Buna ilaveten her yapısal veya yardımcı proteinin başlangıcında bulunan ve bunların monosistronik olarak sentezlenmesine destek olan transkripsiyonel düzenleyici bölgeler bulunmaktadır. Genomun 3' ucuna yakın bölgesi ise replikasyon ve sentez için gerekli yapısal RNA bölgelerini içermektedir. BCoV genomu organizasyonu sırasıyla; 5' Cap – Lider Dizi – 5' UTR – Replikaz – HE Bölgesi – S (Spike: Peplomer) Bölgesi – E (Envelope: Zarf) Bölgesi – M (Membran) Bölgesi – N (Nükleokapsid) – 3' UTR – Poli A Kuyruğu ve yapısal genler arasına dağılmış şekilde yardımcı genleri içermektedir (Fehr ve Perlman, 2015; Lai, 1990; Maclachlan ve Dubovi, 2017; Saif, 2010) (Şekil 1.2). Yardımcı proteinlerin hücre kültüründe replikasyon için zorunlu olmadığı ancak viral patogeneze önemli olabileceği ortaya konmuştur (Zhao ve ark., 2012).



Şekil 1.2. BCoV'un genom yapısı.

S Geni: S geninden sentezlenen S proteininin iki temel görevi bulunmaktadır. Bunlardan biri N-Terminal sinyal sekans dizisini kullanarak konak hücre

endoplazmik retikulumuna girişi sağlamaktır. Diğer önemli görevi ise virus üzerinde “mızrak şeklinde” yapılar oluşturarak, virusun konak hücreye bağlanmasını sağlamaktır (Beniac ve ark., 2006; Delmas ve Laude, 1990). Başlangıçta; coronavirusların hücrelere ve dokulara tropizmi, konakçı aracılığı ve patogenezi ile ilgili etkileşimlerin, virusun zarfında yer alan S glikoproteinleri ve konakçı hücre reseptörleri arasında olduğu düşünölmüş ise de daha sonra yapılan çalışmalara göre bu etkileşimlerin, S proteolitik aktivasyonu ile konakçı hücrenin proteazları arasında olduğu görölmüştür. Coronaviruslar reseptör bağlanması, füzyonun aktivasyonu ve birleşmeyi içeren, virusun hücreye girişinin her aşamasında çok sayıda mekanizma ve strateji geliştirmiş olması nedeniyle dikkat çekicidir. Örneğin; coronavirus türüne bağlı olarak, S proteini yapısında protein ihtiva eden bir reseptöre ya da karbonhidrat parçalarına bağlanmaya aracılık edebilir (Belouzard ve ark., 2012; Beniac ve ark., 2006; Delmas ve Laude, 1990; Masters ve Perlman, 2013; Millet ve Whittaker, 2015). BCoV’larda 768 ve 769 amino asitleri arasında, S proteinini S1 ve S2 kısımlarına ayıran bir proteaz bölünme bölgesi bulunmaktadır (Abraham ve ark., 1990). Protein konak hücrede furin-benzeri proteaz ile ikiye bölünerek S1 ve S2 polipeptidlerini oluşturmaktadır (Abraham ve ark., 1990; De Groot ve ark., 1987; Luytjes ve ark., 1987; Saif, 2010) ve bunun viral enfektivitede önemli bir işlevi olduğuna inanılmaktadır (Storz ve ark., 1981). S1, S proteininin geniş reseptör bağlama alanını oluşturarak hücre reseptörlerine tutunmada görevli iken (Kubo ve ark., 1994; Saeki ve ark., 1997), S2 proteini “mızrak şeklinde” sapını oluşturarak viral ve hücrel membranların füzyonuna aracılık etmektedir (Fehr ve Perlman, 2015; Yoo ve ark., 1991). Bölünme bölgelerindeki amino asit kompozisyonundaki küçük mutasyonel değişiklikler, doku ve hücre tropizmi, konakçı aralığı ve patogenezi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olabilir. BCoV’un tropizmi ile ilgili yapılan çalışmalarda (Chouljenko ve ark. 1998; Hasöksüz ve ark. 2002; Martinez ve ark. 2012; Millet ve Whittaker, 2015) coronavirusların S1 kısmının genomik içeriğinin, tropizmde kritik rol oynadığı düşünölmektedir S geninin S1 alt ünitesinde signal peptit olarak tanımlanan alan (1-17 amino asitleri arası), S1A olarak tanımlanan immunreaktif alan (351-403 amino asitleri arası), S1B olarak tanımlanan immunreaktif alan (517-621 amino asitleri arası), hidrofobik bölge (955-992 amino asitleri arası), heptad tekrar dizisi (993-1032 amino asitleri arası) ve karboksil

terminal çapa dizisi (1312-1325 amino asitleri arası) bulunmaktadır (Chouljenko ve ark., 1998). S2 alt ünitesi daha stabil iken S1 alt ünitesindeki tek bir amino asit değişikliği (528. amino asit) viral nötralizasyona karşı direnç sağlayabilmektedir (Lin ve ark., 2000; Yoo ve Dereg, 2001). S ve HE glikoproteinleri, N ve M glikoproteinlerinden daha immunojeniktir (Lee ve ark., 2010).

M Geni: M geninden sentezlenen M proteini ise virion içerisinde en bol bulunan ve viriona şeklini veren protein olma özelliğindedir. Translasyonu endoplazmik retikulum içerisinde gerçekleşmesine rağmen M proteinlerinin birçoğu sinyal dizisi içermemektedir (Fehr ve Perlman, 2015). Protein 23 – 26 kilodalton (kDa) moleküler kütlede ve 9 – 12 kDa moleküler kütledeki E proteini ile birlikte zarfa gömülü bulunmaktadır. M ve E proteinleri virion birleştirme işleminde görev almaktadırlar (Popova ve Zhang, 2002; Rottier ve ark., 1984; Vennema ve ark., 1996).

E Geni: E geninden sentezlenen E proteini, virion içerisinde en az bulunan proteindir (Godet ve ark., 1992) ve transmembran özelliği olduğu düşünülmektedir (Fehr ve Perlman, 2015). Bu protein, virionun morfogenezinde, virusun konakçı hücrelerin zar geçirgenliklerinde değişiklik yapmasında ve virus-konakçı etkileşimlerinde önemli rol oynamaktadır (Liu ve ark., 2007). Protein üzerinde bulunan N-Terminal ve C-Terminal bölgelerinin iyon kanalı aktivitesi vardır. Aynı zamanda bazı E proteinlerinin virionların serbest kalmasında görevi olduğu bilinmektedir (Fehr ve Perlman, 2015). Nitekim SARS coronavirus E proteinlerinin, viral replikasyonda zorunlu olmadığı, ancak patogenez için gerekli olduğu ortaya konmuştur (Nieto-Torres ve ark., 2014).

N Geni: N geninden sentezlenen N proteini ise temel amino asitler yönünden zengin ve helikoidal nükleokapsid oluşturan bir fosfoproteindir. Nükleokapsitte bulunan bu protein, her ikisi de RNA'yı in vitro olarak bağlayabilen iki ayrı (N-terminal ve C-terminal) bölgeyi içermektedir. Ancak her bölge RNA'yı bağlamak için farklı mekanizmalar kullanmaktadır (Chang ve ark., 2006; Hurst ve ark., 2009). N proteini; viral patogenez, transkripsiyon ve replikasyon ile bağlantılı çeşitli

fonksiyonları yerine getirir. Viral replikasyon sırasında büyük miktarlarda ifade edilen yüksek oranda korunmuş bir protein olduğundan; BCoV N proteinini kodlayan gen bölgesi hedef alınarak yapılan reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) uygulamaları, tanı materyalinde BCoV varlığını saptamada sıklıkla kullanılan en etkin yöntemlerdendir (Alkan ve ark., 2011; Fernandes ve ark., 2018; Saif, 2010; Tsunemitsu ve ark., 1999).

HE Geni: HE geni ise hemagglütinin esteraz proteinini sentezlemektedir. Bu protein, sialik asitlerin yüzey glikoproteinlerine bağlanmasına yardımcı olmakta ve asetil esteraz aktivitesi içermektedir (Klauegger ve ark., 1999; Saif, 2010). Bu iki özellik S proteini aracılı hücreye girişi hızlandırmakta ve virusun mukoza boyunca yayılmasını sağlamaktır (Cornelissen ve ark., 1997). HE proteini sadece bazı betacoronaviruslarda bulunmaktadır (Lissenberg ve ark., 2005).

1.1.3. Coronavirus Transkripsiyon ve Replikasyonu

Virionun konak hücreye girişi, S proteinlerinin ve reseptörlerinin, konak hücre plazma membranında hücre reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Bu bağlantı, S1 protein yapısına göre değişkenlik gösteren ve virusun doku spesifik tropizmini sağlayan, reseptör bağlanma bölgeleri (Reseptör Binding Domain: RBD) ile gerçekleşmektedir. Bağlanmayı takiben virusun hücre sitoplazmasına girmesi gerekmektedir. Genel kanı bu girişin endositoz (viropeksis) yoluyla olduğudur (Fehr ve Perlman, 2015; Maclachlan ve Dubovi, 2017). Endozom yoluyla girişte hücreye alınan virus asidifiye olur ve uygun pH'ya ulaşıldığında S proteini, nükleokapsid ile sarılı viral genomun endozom membranından sitoplazmaya geçmesine aracılık eder (Fehr ve Perlman, 2015; Simmons ve ark., 2004).

Coronavirus transkripsiyon ve replikasyon aşamalarının tamamı konak hücre sitoplazmasında gerçekleşmektedir. Virionun S proteinine bağlı reseptör bağlanmasını takiben sitoplazmaya girişinin ardından coronavirus replikasyonunun ilk aşaması, virion genomik RNA'sının replikaz genlerinin translasyonu ile

başlamaktadır. Replikaz geni Şekil 1.2’de görülen iki büyük açık okuma çerçevesi, replikaz 1a ve replikaz 1b’den oluşmaktadır (Fehr ve Perlman, 2015). Bu iki poliprotein sentezlenebilmesi için virus, bir RNA pseudoknotunun içerisinde bulunan, UUUAAAC veya UCUAAAC sekansından oluşan ve “kaygan dizi” olarak da bilinen (Brian ve Baric, 2005; Chouljenko ve ark., 2001) bir diziden faydalanmaktadır. Bu dizinin görevi, replikaz 1a sonundaki dur kodonunu bir sıra kaydırarak ribozomal çerçeve kayması yaratmak ve bunun sonucunda ribozomun dur kodonunu tanımayarak replikaz 1b genini de sentezlemesini sağlamaktır (Baranov ve ark., 2005; Brierley ve ark., 1989). Bu durum her zaman şekillenmediğinden üretilen poliprotein 1a ve poliprotein 1ab proteinlerinin oranı da eşit değildir. İlgili proteinlerin sentezlenmesinin sonucunda oluşan replikaz transkriptaz kompleksinin ve yapısal olmayan proteinlerin ise RNA replikasyonunu kolaylaştırıcı (Araki ve ark., 2010), konak immun sistemi baskılayıcı ve konak hücrenin kendisine ait proteinleri sentezlemesini önleyici etkisi (Huang ve ark., 2011; Kamitani ve ark., 2006; Kamitani ve ark., 2009; Tanaka ve ark., 2012) olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, coronavirus RNA replikasyonu için son derece önemli olan RdRp, RNA helikazların ve diğer önemli yapısal olmayan proteinlerin sentezi de yine pozitif yönlü sentezle bu aşamada gerçekleşmektedir (Snijder ve ark., 2003).

Coronavirus replikasyonu için kabul edilen bir model olsa da, bu model henüz tam olarak açıklanamamıştır (Bentley ve ark., 2013). Mevcut bilgiler ışığında, BCoV’larının yapısal ve yardımcı protein genlerinin sentezinde, viral genomun negatif yönlü hareket ettiği ve bu süreçte başta RdRp ile transkripsiyonal regülatör dizileri (Transcriptional Regulatory Sequence: TRS) olmak üzere, cis-akting faktörlerin aktif rol oynadığı düşünülmektedir. Bu modelde pozitif yönlü her subgenomik mRNA bölgesinin 3' ucunda bir terminal anti-lider bölge bulunmaktadır. Terminal bölgeler, virus gövde TRS (Body-TRS: TRS-B) bölgelerinin, 5' lider dizinine (Leader-TRS: TRS-L) komplementer yapıdadır (Brian ve Baric, 2005; Maclachlan ve Dubovi, 2017; Sawicki ve ark., 2007; Sethna ve ark., 1991). Bu sayede RdRp polimerazların yardımı ile sentezlenen negatif yönlü komplementer diziler, 3' den 5' ne doğru hareket ederek birleştirilir. Birleşen komplementer dizilerin de komplementeri sentezlendiğinde, translasyona hazır

mRNA sekans dizileri açığa çıkar. Her gen bölgesinde bulunabilen ve virus tarafından kullanılabilen bu model ile tüm gen bölgeleri parça parça subgenomik olarak çoğaltılabilmektedir (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Sethna ve ark., 1991). Ancak çok sayıda oluşan bu yapılara karşın her gen bölgesinin sonunda bulunan stop kodonundan dolayı, viral genler, polisistronik bir yapıya sahip olmalarına rağmen monosistronik özellik göstermektedir (Lai, 1990).

Replikasyonun şekillenmesinde ise RdRp proteinler genomun sonuna kadar RNA'yı eşler. Bu negatif yönlü dizinin komplementeri polimerazlar tarafından sentezlendiğinde, pozitif yönlü tek zincir coronavirus genomun replikasyonu da tamamlanmış olur (Maclachlan ve Dubovi, 2017).

Viral genomun replikasyonu ve subgenomik RNA'ların sentezinin tamamlanmasını takiben yapısal proteinlerden S, E ve M proteinleri hızla konak hücre endoplazmik retikulumun lümeni içerisine ilerlerler ve translate olmaya başlarlar (Krijnse-Locker ve ark., 1994; Tooze ve ark., 1984). Bu süreçte N proteinleri ise sitoplazmada sentezlenerek viral genomu kaplamaktadır (De Haan ve Rottier, 2005).

Virionların oluşmasında M proteinleri protein-protein ilişkilerine yardım ederek aktif rol almaktadır, ancak tek başına olgun virionların oluşması için yeterli değildir. E proteinleri endoplazmik retikulum yüzeyinde translate olmaktadır (Bos ve ark., 1996; Maclachlan ve Dubovi, 2017). E proteini ve E proteini ile birlikte sentezlenen virus-benzeri partiküller yardımı ile M proteini viral zarfın oluşmasını tamamlayabilmektedir. M proteini aynı zamanda nükleokapsidlerle ve S proteinleri ile de bağlantı kurarak virion bütünlüğünü sağlamaktadır (Siu ve ark., 2008).

Endoplazmik retikulum içerisinde oluşturulan içi genomdan yoksun virion partikülleri, pre-golgi membranı ile sarılı halde sitoplazmaya çıkarılmakta ve burada nükleokapsid ile sarılmış viral genomu içerisine alarak, olgun virion şekillenmektedir. Son olarak olgun virionların, plazma membrana doğru hareket

ettiği ve golgi ile veziküler transport yoluyla ekzositik olarak dışarıya transfer olduğu düşünülmektedir (Fehr ve Perlman, 2015; Maclachlan ve Dubovi, 2017).

1.1.4. Virus Enfeksiyonunun Konak Hücreler Üzerindeki Etkileri

BCoV, ilk olarak primer sığır böbrek hücre kültüründe izole edilmiştir ve bundan sonra çeşitli hücre kültürlerinde çoğaltılmıştır. Bu hücre kültürlerine örnek olarak, Sığır embriyosu böbrek hücresi, VERO (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi), MDBK (Madin-Darby sığır böbrek hücresi), Domuz böbrek hücresi, Sığır fetal dalak hücresi, Sığır embriyosu akciğer hücresi ve HRT-18 (insan rektal tümör hücresi) hücre kültürleri sayılabilir. HRT-18 hücre hattı, tripsin varlığında solunum yolu enfeksiyonuna neden olan BCoV'larının üretilmesi için en hassas hücre hattıdır (Benfield ve Saif, 1990; Jerez ve ark., 2005).

BCoV, virus suşlarına ve konakçı hücrelere bağlı olarak çeşitli sitopatogenik etkiler (Cytopathogenic Effect: CPE) oluşturmaktadır. Örneğin; fare hepatit virusu, Kanatlı Enfeksiyöz Bronşit Virus, SARS ve BCoV hücre füzyonuna neden olmaktadır. CPE mekanizması, hücresel proteinlerin translasyonunun inhibisyonu ve hücresel gen alt kümesinin transkripsiyonu gibi çeşitli nedenlere göre değişmektedir (Masters ve Perlman, 2013).

1.2. Epidemiyoloji

BCoV'lar ilk önce yenidoğan buzağı ishalleri ile ilişkili olarak tanımlanmış, daha sonra yetişkin sığırlarda kış dizanterisi ve solunum sistemi enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Mebus ve ark., 1973; Saif ve ark., 1991; Storz ve ark., 2000). Günümüzde dünya genelinde buzağı ishallerinin başlıca etkenlerinden birisidir ve ekonomik açıdan oldukça önemlidir (Fernandes ve ark., 2018; Gunn ve ark., 2015).

BCoV'ların varlığı ülkemizde ilk olarak Alkan (1998) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada ishali buzağılardan sağlanan gaita örneklerinin %13,4'ünde bovine rotavirus ile birlikte, %15,4'ünde ise tek başına olmak üzere BCoV varlığı olduğunu tespit etmiştir. Takiben Erdoğan ve ark. (2003), Kars yöresinde yenidoğan buzağılarda bovine rotavirus ve BCoV yaygınlığının belirlenmesi üzerine çalışmışlar; BCoV yönünden test ettikleri 104 buzağıdan sağlanan gaita örneğinde yalnızca birinde (%1) pozitiflik saptamışlardır.

Hasöksüz ve ark. (2005), Türkiye'nin kuzeydoğusunu içine alan bölgede 96 örnek toplayarak, 27 örnekte (%28,1) BCoV varlığını tespit etmişlerdir. Daha önceki çalışmalarda sadece buzağılarda görülen ishallerle yönelik çalışılmıştır. Bu çalışmada ise sindirim sistemini ve solunum sistemini enfekte eden BCoV'lar üzerine çalışılmıştır. Söz konusu çalışma solunum sistemini enfekte eden BCoV'larla ilgili ülkemizdeki ilk çalışma olma niteliğindedir.

Hasırcıoğlu (2005), Malatya'dan 63 ishali buzağıdan ve 77 (63 örnek buzağının anneleri) klinik açıdan sağlıklı gözüken inekten gaita örneği toplamıştır. Örneklerin Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Analiz (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ile analizi sonrasında, buzağının iki (%3,1) tanesinde BCoV pozitifliği saptamışlardır. Ayrıca 36 buzağı ve 46 annenin kan serumu örneklerinin BCoV antikorunu yönünden kontrolü sonucunda dokuz (%25) buzağıda ve 35 (%76) inekte seropozitiflik tespit etmiştir.

Çabalar ve ark. (2007), Van yöresinde 89 ishali buzağıdan gaita örneği toplayarak; bovine rotavirus ve BCoV varlığının tespitine yönelik çalışmışlardır. Çalışma sonucunda 16 (%17,97) örnekte bovine rotavirus ve bir (%1,12) örnekte BCoV varlığını bildirmişlerdir. Aynı yıl Gümüşova ve ark. (2007), Türkiye'nin kuzey bölgesinde bovine rotavirus ve BCoV enfeksiyonu üzerine çalışmışlardır. Çalışma sonunda, klinik ve subklinik bovine rotavirus ve BCoV enfeksiyon oranı ve ineklerdeki serolojik prevalansı belirlemişlerdir. Çalışma için sağlıklı ve ishali buzağılardan toplam 100 gaita örneği toplamışlardır. Sağlıklı görünümlü buzağının bovine rotavirus antijen pozitifliği %4,08 oranında bulunurken, BCoV antijeni

saptanamamıştır. İshalli buzağılarda bovine rotavirus ve BCoV antijen pozitifliği sırasıyla %41,17 ve %1,96 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, 256 inekten alınan kan serumu örneklerinde bovine rotavirus ve BCoV seroprevalansı ise %71,48 ve %98,43 olarak bulunmuştur.

Yıldırım ve ark. (2008), bovine rotavirus ve BCoV prevalansı üzerine yaptıkları bir çalışmada, 498 aşılanmamış yetişkin sığırdan alınan kan serumlarında BRV ve BCoV antikor pozitiflik oranlarını %29,3 ve %26,3 olarak bildirmişlerdir.

Tokgöz ve ark. (2013), Adana’da oldukça kapsamlı bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada süt ineği işletmelerinde bakteriyel, viral ve paraziter etkenlerin durumlarını incelemişler ve BCoV varlığı bildirmişlerdir. Al ve Balıkcı (2012), da örneklediği buzağılarda seropozitiflik (%13) tespit etmiştir.

Yavru ve ark. (2016), Burdur bölgesinde 184 buzağıdan gaita ve kan, buzağının annelerinden ise kan örnekleri toplamışlardır. Direkt ELISA ile test edilen buzağının gaitalarından sadece bir (%0,54) tanesinde BCoV antijeni tespit edilmiştir. Ayrıca 172 (%93,99) buzağı ve 172 (%93,99) inekte BCoV antikorunu tespit etmişlerdir.

Saklı (2017), tez projesi kapsamında, Konya ve Afyon illerinden topladığı 96 gaita örneğinde hızlı tanı kiti ile bir örnekte BCoV tespit ederken, aynı örneklerle yapılan RT-PCR çalışmasında 13 örnekte BCoV ve dört örnekte hem bovine rotavirus hem de BCoV varlığını tespit etmiştir. Bu çalışma ile RT-PCR tekniğinin hızlı tanı kitlerine olan üstünlüğü ortaya konmuştur.

Kozat ve Tuncay (2018), Siirt yöresindeki yenidoğan ishalleri buzağılarda rotavirus, coronavirus, Cryptosporidium Spp, *Escherichia coli* K 99 ve *Giardia lamblia* etkenlerinin prevalansı üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında 100 ishalleri buzağı ve 10 sağlıklı buzağı olmak üzere toplamda 110 buzağıdan örnek

toplanmıştır. Hızlı tanı kiti kullanarak ishalleri buzağuların gaitasında %7 *Escherichia coli*+BCoV varlığını tespit etmişlerdir.

Kaya ve Coşkun (2018), Kozat ve Tuncay'ın çalışmasına benzer bir çalışmayı Tokat ilinde yapmış olup, 107 örnekte %9,35 oranında BCoV varlığını saptamışlardır.

Yapılan bu çalışmalarda genel olarak BCoV varlığının tespit edilmesi ve serolojik değerleri üzerine çalışılmıştır. Alkan ve ark. (2011), BCoV'un S gen bölgesini elde etmeye yönelik ilk detaylı moleküler çalışmayı yapmıştır. Bu çalışmada, sindirim sistemi enfeksiyonu bulguları gösteren 147 sığırdan gaita ve solunum sistemi enfeksiyonu gösteren 199 sığırdan nazal akıntı örneği temin edilmiştir. ELISA ve N gen bölgesini elde etmeye yönelik RT-PCR ile 18 örnekte (16 gaita ve iki nazal akıntı) BCoV varlığı saptanmıştır. BCoV varlığı tespit edilen gaita örneklerinden iki tanesinin kısmi S gen bölgesini elde etmişlerdir. Bu çalışma ile hem BCoV varlığını bildirmişler hem de Gen Bankasına Türkiye suşları açısından katkı sağlamışlardır. Daha sonra Timurkan ve ark. (2015), BCoV'un N gen bölgesine yönelik çalışmaları ile Türkiye'de tespit edilen BCoV dizin bilgilerine katkı sağlamışlardır.

BCoV'lar ülkemizde yaygın olduğu gibi dünya genelinde de yaygın olarak tespit edilmiştir. Brezilya (Beuttemmuller ve ark., 2017), Güney Kore (Park ve ark., 2007b), Amerika Birleşik Devletleri (Chouljenko ve ark., 2001), Kanada (Gelinas ve ark., 2001), Japonya (Kanno ve ark., 2007), İsveç ve Danimarka (Bidokhti ve ark., 2013), Fransa (Boireau ve ark., 1990), İtalya (Decaro ve ark., 2008a), Vietnam (Shin ve ark., 2019) gibi birçok ülkede BCoV varlığıyla ilgili çalışmalar mevcuttur. Avustralya'da da 2018 yılında ilk defa BCoV varlığı bildirilmiştir (Symes ve ark., 2018). Günümüzde farklı klinik olguların etkeni olarak coronavirusların sorgulandığı çalışmalar yanı sıra, saptanan virusların genetik analizi üzerine yapılan çalışmalar sıklıkla bildirilmektedir (Beuttemmuller ve ark., 2017; Fernandes ve ark., 2018). Teknolojinin ilerlemesi ve bilgi birikiminin de artmasıyla birlikte; bu çalışmalarda virusun evrimi, türler arasında geçişe etki eden olası değişikliklerin belirlenmesi ve

aşı geliştirme çalışmaları gibi konulara ağırlık verilmiştir (Anthony ve ark., 2017; Bidokhti ve ark., 2013; Lee ve ark., 2010).

1.3. Bulaşma

BCoV, fekal-oral veya solunum yoluyla bulaşır (Yang ve Leibowitz, 2015). Solunum sistemindeki ve bağırsaklardaki epitel hücrelerini enfekte eder. Replikasyon, virusun nazal akıntı ve dışkı ile yayılmasına yol açar. Enfekte hayvanda virus saçılımı, önce nazal akıntıyla başlar, daha sonra dışkıyla saçılma devam eder. Dışkıda virus varlığının enfeksiyondan 35 gün sonrasına kadar tespit edilebileceği bildirilmiştir (Oma ve ark., 2016).

Düşük titrede virusa sahip yetişkin sığırlar taşıyıcıdır ancak, doğum sürecinde virusun titresini arttırmaktadır. Progesteron ve diğer hormon seviyelerinin artmasının viral titreyi yükseltmesi ve bulaşma olasılığının artması mümkündür (Crouch ve ark., 1985). Yavrunun bağışıklık sistemi henüz gelişmediği için anneye olan yakın teması sonucunda viral bulaşma artmaktadır. Virusun dışkı yoluyla buzağılara bulaşmaması için, annenin rektumunun ve doğum malzemelerinin temizliğine çok önem gösterilmelidir. Bulaşma kaynağı olarak annelere gösterilmesine rağmen; enfekte olan buzağının fazla miktarda virus saçması, virusun saçılımının uzun süreli olması nedeniyle, birçok işletmede özellikle 0-1 ay yaş grubu buzağının şiddetli enfeksiyonu gözlemlenmektedir (Kapil ve ark., 1990; Oma ve ark., 2016).

Coronavirüsler büyük RNA genoma sahiptir ve “quasispecies” olarak bulunur. Bu durum coronavirüslerde adaptif mutasyon ve türler arası geçiş ihtimalini arttırmaktadır. Hasöksüz ve ark. (2007), zürafada, sığır benzeri coronavirus tespit etmişlerdir. Yine Alekseev ve ark. (2008), dört farklı türde BCoV homologu virus tespiti yapmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda; sığırlar ve yabani ruminantlar arasında virusun bulaşması ve yayılmasının mümkün olduğu görülmektedir. Gen Bankasındaki diğer verileri incelediğimizde bunların dışında balina, kedi, köpek, domuz, at, birçok yaras ve birçok kuş çeşidi, tavşan, deve ve insan gibi pek çok

türden elde edilmiş coronavirus dizinlerini görülebilmektedir. Ayrıca coronaviruslar tüm yaş gruplarını enfekte edebilmektedir.

1.4. Patoloji

Buzağılar, coronavirus enfeksiyonunu geçirdikten 10 gün sonrasına kadar dışkılarıyla ve nazal akıntılarla virüsü saçmaya devam eder. Coronavirus antijeni, üst solunum yolu ve intestinal sistem epitel hücrelerinde yaygın olarak, akciğerlerde de nadiren tespit edilir. Buzağılardaki coronavirus enterit tablosu, rotavirusun enterit tablosuna oldukça benzemektedir. Coronavirusun neden olduğu enfeksiyonda kalın bağırsak daha fazla etkilenmektedir. Hastalık en sık bir – üç haftalık buzağılarda meydana gelmektedir. Buzağının enterik coronavirus enfeksiyonunun patogenezi, domuz yavrularında görülen bulaşıcı gastroenterit enfeksiyonunun patogeneziye benzerdir (Maclachlan ve Dubovi, 2017). Kalın bağırsaktaki bağırsak villus ve mukozal yüzeyini kaplayan olgun emici hücrelerin tahribi, hızlı su ve elektrolit kaybıyla birlikte sindirim ve emilim bozukluğuna yol açar. Bunun sonucunda gelişen hipoglisemi, asidoz ve hipovolemi, özellikle çok genç hayvanlarda dolaşım yetmezliği ve ölüme sebep olabilir (Murphy ve ark., 1999).

Süt ve et sığırlarında, kış dizanterisinin patogenezi ve lezyonları, buzağı ishallerine benzemektedir, ancak barsaklarda daha fazla hemoraji ve kalın bağırsak mukozasının kriptolarında hücrelerin yoğun nekrozu ile birlikte seyretmesiyle farklılık gösterir. Nazal yayılma, dışkıyla yayılmaya göre dört – beş gün daha kısa sürede gerçekleşmektedir (Murphy ve ark., 1999). Kış dizanterisi sonucunda süt sığırlarında görülen anoreksi ve depresyon, süt verimindeki azalmaya neden olur. Bazı sığırlarda gözlenen akut ve çok miktarda kanlı ishalin sebebi ise tam olarak açıklanamamıştır (Maclachlan ve Dubovi, 2017; Murphy ve ark., 1999).

1.5. Klinik Bulgular

BCoV; sığırlarda ve özellikle buzağılarda ishalin başlıca nedenlerinden biridir. Ayrıca solunum yolu enfeksiyonlarına da neden olmaktadır (Storz ve ark., 2000; Thomas ve ark., 1982). Enteritisin şiddeti; enfeksiyon geçiren buzağının yaşına, immunolojik durumuna, enfektif dozun büyüklüğüne ve BCoV suşunun virulansına bağlıdır. Yaşlılara oranla yaşı daha genç hayvanlarda, inkübasyon süresi daha kısa ve hastalığın şiddeti daha fazladır (Boileau ve Kapil, 2010; CABI, 2019; Kapil ve ark., 1990). Genç buzağılarda inkübasyon süresi yaklaşık 24 – 48 saattir ve klinik belirtiler genellikle beş gün sonra gözlenmektedir. Yenidoğan buzağılardaki klinik belirtilerin şiddeti, kolostrumla alınan maternal antikorların seviyesine göre değişiklik göstermektedir. İshal, sulu ve sarımsak renktedir ve bazen mukusla ya da kanla karışıktır (Valarcher ve Hagglund, 2010). Sıvı alımı vücuttaki sıvı kaybını karşılamaya yeterli olmadığında, hayvan susuz kalarak depresif, zayıf, hipotermik bir hale gelir. Ayrıca emme refleksi azalır. Buzağuların çoğunluğu iyileşir ancak bazı buzağuların şiddetli ishali tedavi edilemez. Bunun sonucunda ateş çok yükselir, hayvan sürekli yatma eğilimi gösterir ve kardiyovasküler kollaps (dehidrasyon, asidoz ve hiperkalemi sonucunda) şekillenerek komaya girer ve ölüme kadar ilerler (Boileau ve Kapil, 2010; Kapil ve ark., 1990). Morbidite oranı yüksektir, mortalite oranı ise alınan maternal antikor miktarına, aktif üretilen antikor düzeyine ve dehidrasyonun şiddetine göre değişiklik göstermektedir (Valarcher ve Hagglund, 2010).

BCoV'un sindirim sisteminin yanı sıra solunum sistemini de etkilediği bilinmektedir (Storz ve ark., 2000). Deneysel koşullar altında; BCoV ile enfekte edilen kolostrumdan yoksun yenidoğan buzağılarda, hırıltılı ve ağzı-açık solunum gibi respiratorik sorunlar gözlenir. Doğal koşullarda, BCoV'un neden olduğu buzağı pnömonisi, sıklıkla altı ile dokuz aylık buzağılarda görülür. Etkilenen hayvanlarda ateş, öksürük, taşipne, nefes darlığı ve serözden mukopurulente değişebilen nazal akıntı önemli bulgulardandır (Boileau ve Kapil, 2010; Traven ve ark., 2001).

BCoV, ayrıca kış dizanterisine sebep olmaktadır. Bulaşıcı olan bu hastalık erişkin sığırlarda akut diyare, ateş, depresyon ve düşük süt verimi ile karakterizedir (Toftaker ve ark., 2017). Mortalite düşüktür ancak etkilenen sürülerde morbidite yüksektir. Enfeksiyon, hayvanların verimlerinin azalmasına ve sürü sağlığının olumsuz yönde etkilenmesine neden olabilir (Bouleau ve Kapil, 2010; Clark, 1993; Traven ve ark., 2001).

1.6. Nekropsi Bulguları

BCoV ile enfekte buzağılarda yapılan nekropsi sonucunda, bazı ishalli buzağıkların abomasumunda peteşiler görülmektedir. Buzağıkların tümünde abomasumda süt varlığı, ince ve kalın bağırsaklarında sıvı içeriği varlığı tespit edilmektedir. Steromikroskop ile üç saat içinde ölen buzağıkların incelenmesi sonucunda; ince bağırsağın üst, orta ve alt kısımlarında bulunan villusların uzun olduğu görülür. Ölüm 42 – 96 saat sonra olduğunda villusların kısaldığı görülmektedir. Özellikle en alt ince bağırsakta belirgin olarak bu durum gözlenmektedir. 44 – 48 saat sonra ölen buzağıkların mezenterik lenf düğümlerinin büyümüş olduğu tespit edilmektedir (Mebus ve ark., 1973). Buzağılarda rotavirus sadece ince bağırsağı etkilerken, BCoV hem ince bağırsağı hem de kalın bağırsağı etkilemektedir (MacLachlan ve Dubovi, 2017).

Kış dizanterisi geçiren sığırların nekropsisinde, kolonda özellikle spiral kolonda piknoz, karyoreksis, granüler dejenerasyon, hidropik dejenerasyon ve kript epitel hücrelerinin hiyalin damlacığı dejenerasyonu görülmektedir (Van Kruiningen ve ark., 1987).

Solunum yolu enfeksiyonu geçiren hayvanların nekropsisinde ise, akciğerlerde kan damarlarının büyümesi ve interstisyel septa kalınlaşması ile alveoler kanama bulgularının varlığı görülmektedir. Atelektazi alanı ve hem inter hem de intra alveoler ödem gözlenmektedir (Hansa ve ark., 2012).

1.7. İmmunoloji, Kontrol ve Koruma

Viruslara karşı geliştirilen immün yanıtta en önemli savunma sistemi sitokinlerdir. Sیتokinler, lenfositlerce üretilmektedir. Viral enfeksiyona cevabı ilk başlatan ise sitokin ailesinden interferonlardır. İnterferonlar cevabı başlatmanın yanında adaptif immünite de görev almaktadır. Aynı zamanda enfekte hücrelerden sinyal gönderen interferonlar (Tip 1), T ve B lenfositler, doğal öldürücü hücreleri (NK) gibi savunma hücrelerinin viruslara saldırmasını da sağlamaktadır (MacIachlan ve Dubovi, 2017; Valarcher ve Hagglund, 2010). Özellikle B lenfositlerin aktive olması BCoV için önem taşımaktadır. Bunun nedeni B lenfositlerden oluşan plazma hücrelerinin, çeşitli immünglobulinleri (Ig) üretmesi ve bu antikorların BCoV tespitinde kullanılması olarak gösterilebilir.

BCoV enfeksiyonlarında, konak hücrede virusun etkisiz hale getirilmesinde IgA, IgG, IgM (Heckert ve ark., 1991; MacIachlan ve Dubovi, 2017) ve hemaglütinin inhibisyon antikorlarının (Saif, 2010) seviyeleri artmaktadır. Savunma hücreleri temel olarak yüzey glikoproteinlerine, spesifik olarak da S proteinini N-Terminal bölgelerine saldırmaktadır. Hücresel immün yanıtta ise S ve N proteinleri hedef alınmaktadır (MacIachlan ve Dubovi, 2017). İmmün yanıtla bağılı olarak sığırlarda, özellikle buzağılarda, adaptif immünite oluşmaya başlar. Adaptif immünitede ise hayvanı koruyan antikorun IgA olduğu bildirilmiştir (Clark, 1993). Enterik BCoV'a karşı korunma bağırsakta bulunan spesifik antikorlara bağılıdır (Clark, 1993). Benzer şekilde respiratorik BCoV'da solunum yolunda bu antikorların varlığı önem kazanmaktadır (Saif, 2010). Özellikle IgG1 izotipi antikorlar, yeni doğan buzağılara süt ve kolostrum yoluyla geçerek pasif immünite oluşturabilmektedir (Bok ve ark., 2018; Clark, 1993; Crouch ve ark., 2001). Doğum yapan sığırlardan elde edilen fazla kolostrumun buzağılara uygun miktarlarda ve şartlarda verilmesinin de coronaviruslara karşı immün sistemi uyarıcı etkisinin olabileceğı tespit edilmiştir (Bok ve ark., 2018; Gül, 1999). Coronavirus enfeksiyonlarına karşı aktif rol alan antikorlar, buzağılarda, bağırsak mukozal yüzeyinde yerleşmekte ve sonraki süreçte gerçekleşebilecek enfeksiyon durumunda aktif immün yanıtın oluşmasına yardımcı

olmaktadır. Bu durum buzağılarda IgA sentezini gerçekleştirmesini ve virusa karşı savunmanın ve bağışıklığın şekillenmesini de sağlamaktadır (Clark, 1993).

BCoV'lara bağışıklığın sağlanması ve korunmada diğer bir önemli yol ise aşılamalardır. Buzağılarda kolostrum alımından önce oral aşılamanın etkili olduğu, ancak kolostrum almış buzağılara yapılan aşılamaların etkili olmadığı bildirilmektedir. Bunun sebebinin kolostrum yoluyla anneden geçen antikorların aşının etkisini azaltması olarak görülmektedir. Aşılamada diğer bir strateji gebe annenin aşılansıdır. Bu sayede kolostrumda aşının etkisiyle oluşan antikorlar yavruya geçebilmektedir (Valarcher ve Hagglund, 2010). Annenin aşılansının coronavirustan korunmada etkili olabileceğini belirten birçok çalışma bulunmaktadır (Bok ve ark., 2018; Crouch ve ark., 2001; Ikemori ve ark., 1997; Kohora ve ark., 1997). Aşılama ile beraber yavrunun beslenme şartlarının iyileştirilmesi, sürüdeki enfektif hayvanların tespiti ve bu hayvanların sürüden uzaklaştırılmasının da enfeksiyonun yayılmasını önleyici olabileceği bildirilmiştir (Bulgin ve ark., 1989; Collins ve ark., 1987).

Enfeksiyonun önlenmesi sıhhi ve tıbbi önlemlere dayanır. Sürüdeki enfeksiyonların tekrarı arttırılmış biyogüvenlik (örn; karantina, ziyaretçiler için sağlanan koruyucu kıyafetler, el hijyeni ve ekipmanın dezenfeksiyonu) ile önlenebilir. Yine kolostrum alımı, temiz ortam, iyi havalandırma, sıkışık olmayan barınma koşulları ve farklı yaştaki hayvanların ayrılması gibi iyi bakım şartlarıyla enfeksiyonların önüne geçilebilir (Valarcher ve Hagglund, 2010).

1.8. Tanı

BCoV'un tanısı için çeşitli yöntemler kullanılır. Bunlar; elektron mikroskobi ile direk virus tespiti, hemagglütinasyon testi, ELISA ile antijen ya da antikor tespiti, hücre kültüründen virus izolasyonu ve en çok kullanılan yöntem olan viral RNA'nın RT-PCR ile tespitidir. BCoV antijenleri çoğunlukla test spesifitesi ve duyarlılığının yüksek olması sebebiyle ELISA ile tespit edilir. ELISA'nın avantajları hızlı sonuç

vermesi ve fazla sayıdaki örneklerin çalışılmasındaki kolaylığıdır (Schoenthaler ve Kapil, 1999). Nazal akıntılarda, akciğer lizatlarında ya da dışkılarda BCoV RNA'sını saptamak için oldukça hassas moleküler yöntemler daha yaygın kullanılmaktadır. Bunlar RT-PCR (Hasöksüz ve ark., 2008), daha fazla duyarlılığı olan Reverse Transkripsiyon Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-Nested PCR) (Cho ve ark., 2001) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) analizleridir (Decaro ve ark., 2008a).

BCoV, solunum sistemi ve sindirim sistemi enfeksiyonuna neden olarak sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu çalışma ile farklı işletmelerde gözlenen sindirim ya da solunum sistemi klinik enfeksiyonu olgularından saptanan BCoV'un S glikoproteini kodlayan genin kısmi analizi (S1 gen bölgesi) / tüm analizi yapılarak, ülkemizin yerel suşları ile ilgili bilgilerin elde edilmesi, olası moleküler değişiklikler ve halen ülkemizde kullanılmakta olan ticari aşılarda kullanılabilirliği konusunda değerlendirmelerde bulunulması, farklı sistemlerde enfeksiyon oluşturan virusların yapısal farklılıklarının sorgulanması ve virusun bu sistemlere tropizm özelliğinde ilgili gen bölgesinin olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar ve Tanı Materyalleri

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında yürütülen iki proje (TÜBİTAK:1040490, AÜ BAP:13L3338011) kapsamında sağlanan 29 örnek ile bu çalışma süresince temin edilen 90 örnek olmak üzere toplam 119 tanı materyali (78 nazal akıntı ve 41 gaita) kullanıldı (Çizelge 2.1). Söz konusu materyaller solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonu bulguları gösteren, klinik açıdan BCoV enfeksiyonu şüphesi taşıyan hayvanlardan alındı. Tanı materyallerin sağlandığı işletmelerin yerleşim yerleri, tanı materyalinin türü (gaita ya da nazal akıntı), örnekleme yılı ve örneklenen hayvanlara ilgili bireysel bilgiler Çizelge 2.2’de bildirildi.

Çizelge 2.1. Tanı materyallerinin temin edildiği yerler, örneklerin türü ve sayıları.

İl	Hayvan Sayısı	Örnek Türü	
		Nazal akıntı	Gaita
Proje Materyalleri	29	1	28
Ankara	32	32	0
Burdur	10	10	0
Denizli	14	5	9
Hatay	4	4	0
Tokat	15	15	0
Erzurum	5	2	3
İzmir	10	9	1
Toplam	119	78	41

Çizelge 2.2. Tanı materyallerine ilgili detaylı bilgileri.

Sıra No	Örnek Adı	Türü*	Yıl	Yer	Hayvanın Yaşı	Klinik Bulgular
1-2	Bala 05, Bala 48	G	2001	Ankara		İshal
3-5	KÇŞ158692,15868, 158676	G	2005	Aksaray		İshal, dehidrasyon
6-7	KÇŞ 56, 59	G	2006	Aksaray	11-14 gün	İshal
8-10	A 4, 8, 11	G	2006	Eskişehir	15-20 gün	İshal
11-13	Ka 55, 71, 84	G	2006	Kars		İshal, dehidrasyon
14-15	V 7, 27	G	2006	Van		İshal
16-17	KÇŞ324063,324031	G	2008	Aksaray	5-15 gün	İshal
18	TG 591	G	2011	Kırklareli	70 gün	İshal, iştahsızlık
19	H 1	G	2013	İzmir	14 gün	İshal, dehidrasyon
20	D.H.9.7.14	G	2014	Ankara	7 gün	Pis kokulu ishal
21-23	U 1, 8552, 8553	G	2014	Urfa	8-10 gün	İshal, dehidrasyon
24-25	G76, 83	G	2015	Amasya	4 gün	İshal
26-27	4945, 4950	G	2015	İzmir	15 gün	İshal
28	Çankırı 5	G	2016	Çankırı	5 gün	İshal, dehidrasyon
29-31	Ö 2, 13, 60	G	2017	Erzurum	1 ay	İshal
32-40	G 1-9	G	2017	Denizli	7 gün- 15 ay	Sarı sulu ishal, iştahsızlık, dehidrasyon
41	Bayındır 12	G	2018	İzmir	15 gün	İshal
42	A 11 NS	NA	2006	Eskişehir	15 gün	Nazal akıntı, öksürük
43-44	Ö 22, 26	NA	2014	Erzurum	2 yaş	Nazal akıntı, öksürük
45-49	S 1, 6, 7, 8, 9	NA	2017	Denizli	7-30 gün	Nazal akıntı, öksürük, iştahsızlık
50-53	Defne,Tor,Taner,Mert	NA	2017	İzmir	4 yaş	Nazal akıntı
54-56	C 33, 34, 37	NA	2017	Ankara	2-4 ay	Nazal akıntı, öksürük
57-65	5868,91491,4761, 4768,4954,9071,4771, 4767,3940	NA	2018	Ankara	15 gün	Nazal akıntı, öksürük
66-68	Jersey, Kardelen, Suzan	NA	2018	İzmir	5 yaş üstü	Nazal akıntı
69-72	76, 77, 79, 773	NA	2018	Ankara	8 ay	Nazal akıntı, öksürük
73-77	T 1-5	NA	2018	Tokat	15 gün-8 ay	Nazal akıntı, öksürük
78-82	C 1-5	NA	2019	Ankara		Nazal akıntı, solunum güçlüğü
83-86	C 6-9	NA	2018	Ankara	8 ay	Nazal akıntı, öksürük
87-88	I 1, I 2	NA	2019	İzmir	15 gün	Nazal akıntı, öksürük
89-92	355, 356, 0061, 1817	NA	2019	Hatay		Nazal akıntı, öksürük, solunum güçlüğü
93-99	8280,8327,8324,8298, 8325,8329,8328	NA	2019	Ankara	15 gün	Nazal akıntı, öksürük, depresyon
100-104	1 N- 5 N	NA	2019	Burdur	1,5- 9 ay	Nazal akıntı
105-109	1 N13- 5 N13	NA	2019	Burdur	1- 1,5 yaş	Nazal akıntı, öksürük
110-119	9808,6291,9640,9641, 350,203,6292,9806, 9638,204	NA	2019	Tokat	45-90 gün	Nazal akıntı, öksürük

*: G: Gaita; NA: Nazal Akıntı

2.1.2. Referans Virus

Çalışmada referans virus olarak, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonunda bulunan BCoV-Mebus suşu kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışmada Kullanılan Örneklerin Hazırlanması

2.2.1.1. Nazal Akıntı Örneklerinin Hazırlanması

Nazal akıntı örnekleri, içerisinde 2 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) ve 25 000 U/ml Penisilin, 20 mg/ml Streptomisin bulunan tüplere alındı. Laboratuvara getirilen örnekler, vortekslendikten sonra içerisindeki sıvı steril tüplere alındı ve +4°C’de 3 000 devirde, 20 dakika santrifüj edildi. Nükleik asit varlığını araştırmak üzere sıvının 250 mikrolitesi (µl) alınarak steril yeni 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı. Geriye kalan sıvı ise -80°C derecede saklandı.

2.2.1.2. Gaita Örneklerinin Hazırlanması

Gaita örnekleri, içerisinde 25 000 U/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin bulunan PBS ile 1/10 oranında süspanse edildi. +4°C derecede 3 000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı yeni tüpe alındı. Nükleik asit varlığını araştırmak üzere 250 µl’si alınarak steril yeni 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı. Geriye kalan sıvı ise -80°C derecede saklandı.

2.2.2. Moleküler Genetik İdentifikasyon

BCoV varlığının araştırılması ve saptanan coronavirusların S proteinini kodlayan gen bölgesinin karakterizasyonunda moleküler virolojik yöntemler kullanıldı. Bu amaçla yapılan çalışmalar şöyledir:

2.2.2.1. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

BCoV'ların RNA'sını elde etmek amacıyla ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon işleminde TRIzol[®] LS Reagent (Thermo Fisher Scientific, Katalog Numarası: 10296-028) kullanıldı. Protokol aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır:

1. Tanı örneğinin PBS ile 1/10 sulandırılmasından oluşan 250 µl üzerine, 750 µl TRIzol[®] LS Reagent solüsyonu eklendi ve oda ısısında 5 dakika beklendi.
2. Bekleme süresinin bitiminde tüpe 200 µl kloroform eklenerek, şiddetli şekilde elde yaklaşık olarak 15 saniye çalkalandı. Takiben 5 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı.
3. Ardından örnekler +4°C derecede 12 000 g kuvvetinde (G Force: g) 15 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj işlemi sonucunda meydana gelen süpernatant kısımdan yaklaşık 500 µl yeni bir steril 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 500 µl %100'lük isopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı.
5. Ardından örnekler +4°C derecede 12 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj işlemini takiben tüpün içindeki isopropanol ortamdan uzaklaştırıldı. Tüpün içinde yalnızca pelet bırakıldı.
7. Üzerine -20°C derecede soğutulmuş 1 000 µl %75'lik ethanol eklendi ve vortekslendi.
8. Ardından örnekler +4°C derecede 7 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası tüpün içerisindeki ethanol, tüpün içerisinde sadece pelet kalacak şekilde tamamen uzaklaştırıldı ve pelet kurumaya bırakıldı.
10. Pelet kuruduktan sonra üzerine 50 µl nükleaz ari su eklenerek resüspanse edildi. Isı bloğunda 56°C'de 10 dakika ve ardından oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.

11. İşlemi biten tüpler PCR uygulamalarında kullanılmak üzere -20°C derecelik derin dondurucuya kaldırıldı.

2.2.2.2. BCoV Tanısı için RT-Nested PCR Tekniği

2.2.2.2.1. Viral RNA'nın Revers Transkripsiyonu

Ekstraksiyon sonunda elde edilen RNA, komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezinde kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla Geneall® HyperScript™ First Strand Synthesis Kit (Katalog Numarası: 601-005) kullanıldı. Bu kit; iki farklı karışımın birbirini takip eden iki reaksiyonu ile cDNA sentezini elde edilmesini sağlar.

1. Bu amaçla ilk olarak örnek başına steril bir tüpe; 0,5 µl random hexamer [50 nanogram (ng)/µl], 0,5 µl 10 milimolar (mM) dNTPs mix ve 4 µl nükleaz ari su konarak birinci karışım hazırlandı.
2. Toplamda 5 µl olan bu karışıma 2 µl hazırlanmış olan ekstrakt eklendi.
3. Takiben 65°C derecede 5 dakika, 4°C derecede 1 dakikalık ısı döngüsü uygulandı. Isı döngü cihazı olarak Biometra (Almanya) kullanıldı.
4. Bu sırada ikinci karışım hazırlandı. Steril bir tüpe örnek başı; 1 µl 10X RTase reaction buffer, 1 µl 0,1 molar (M) DTT, 0,5 µl HyperScript™ Reverse Transcriptase (200 U/µl) ve 0,5 µl ZymAll™ RNase inhibitor (40 U/µl) konuldu.
5. Isı döngüsü cihazında işi biten tüplere örnek başı ikinci karışımdan 3 µl eklendi.
6. Takiben 25°C derecede 5 dakika, 55°C derecede 45 dakika ve 85°C derecede 5 dakikalık ısı döngüsü uygulandı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. RT-PCR karışım bileşenleri ve protokolü.

Karışım 1		Karışım 2	
Bileşenler	Miktar (µl)	Bileşenler	Miktar (µl)
Random hexamer (50 ng/µl)	0,5 µl	10X RTase reaction buffer	1 µl
10 mM dNTPs mix	0,5 µl	0,1 M DTT	1 µl
Nükleaz Ari Su	4 µl	HyperScript™Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5 µl
RNA ekstratı	2 µl	ZymAll™ RNase inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Toplam Hacim	7 µl	Toplam hacim	3 µl
Program 2 den sonra toplam hacim 10 µl			
Program 1		Program 2	
65°C derecede 5 dakika		25°C derecede 5 dakika	
4°C derecede 1 dakika		55°C derecede 45 dakika	
		85°C derecede 5 dakika	

2.2.2.2.2. BCoV Tanısı için Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Nested PCR) Tekniği

cDNA eldesinin ardından BCoV tanısı amacıyla, N proteinini kodlayan N gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak nested-PCR tekniği uygulandı. Nested PCR’da ilk turda 730 baz çifti (base pair: bp) ve daha sonra ilk turun hedef aldığı bölgeninde içinde yer alan 407 baz çiftlik bölgenin çoğaltılması hedeflendi. N gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin dizinleri, yerleşimleri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri Çizelge 2.4’te sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Nested-PCR’da kullanılan N gen bölgesinin çoğaltılması amacına yönelik primerlerin dizinleri, yerleşim yerleri ve elde edilen ürün büyüklükleri.

Primer Adı	Baz Dizisi (5'→3')	Yer	Hedef Bölge	Ürün	Kaynak
BCoV N-F	GCAATCCAGTAGTAGAGCGT	21-40	N Gen	730 bp	Cho ve ark., 2001
BCoV N-R	CTTAGTGGCATCCTTGCCAA	731-750			
nBCoV N-F	GCCGATCAGTCCGACCAATG	79-98	N Gen	407 bp	
nBCoV N-R	AGAATGTCAGCCGGGGTAG	467-485			

Nested-PCR'lar Thermo Scientific DreamTaq DNA Polimeraz (#EP0702) kullanılarak yapıldı.

1. PCR karışımının içine örnek başı; 10X DreamTaq bufferdan 2,5 µl, 10 mM dNTP mixden 0,5 µl, primerlerden 1'er µl, DreamTaq DNA polimerazdan (5 U/µl) 0,25 µl ve nükleaz ari sudan 17,25 µl konuldu.
2. Hazırlanan karışıma 2,5 µl cDNA eklendi.
3. İlk tura hazırlanan PCR tüpleri ısı döngü cihazına konuldu. İlk tura uygulanan ısı döngüsü; başlangıç denatürasyon aşaması 95°C derecede 3 dakika, denatürasyon aşaması 95°C derecede 30 saniye, bağlanma aşaması 50°C derecede 30 saniye, uzama aşaması 72°C derecede 1 dakika ve son uzama aşaması 72°C derecede 10 dakika olarak, her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu.
4. İkinci tur için PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımının içine örnek başı; 10X DreamTaq bufferdan 2,5 µl, 10 mM dNTP mixden 0,5 µl, primerlerden 1'er µl, DreamTaq DNA polimerazdan (5 U/µl) 0,25 µl ve nükleaz ari sudan 17,25 µl konuldu.
5. Hazırlanan karışıma 2,5 µl ilk turun ürününden eklendi.
6. İkinci tura hazırlanan PCR tüpleri ısı döngü cihazına konuldu. İkinci tura uygulanan ısı döngüsü; başlangıç denatürasyon aşaması 95°C derecede 3 dakika, denatürasyon aşaması 95°C derecede 30 saniye, bağlanma aşaması 58°C derecede 30 saniye, uzama aşaması 72°C derecede 1 dakika ve son uzama aşaması 72°C derecede 10 dakika olarak, her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu (Çizelge 2.5). Isı döngü cihazı olarak Biometra (Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.5. Nested-PCR karışım bileşenleri ve protokolü.

Karışım Bileşeni	Miktar (µl)	Program
Dream Taq DNA polimeraz	0,25 µl	İlk tur 95°C'de 3 dakika 95°C'de 30 saniye 50°C'de 30 saniye 72°C'de 1 dakika 72°C'de 10 dakika 35 siklus
10X Dream Taq buffer	2,5 µl	
10 mM dNTP mix	0,5 µl	
Primer (BCoV N-F) [10 pikomol (pmol)/µl]	1 µl	
Primer (BCoV N-R) (10 pmol/µl)	1 µl	
Nükleaz Ari Su	17,25 µl	
cDNA	2,5 µl	
Toplam	25 µl	

Çizelge 2.5. Devam.

Karışım Bileşeni	Miktar (µl)	Program
Dream Taq DNA polimeraz	0,25 µl	İkinci tur 95°C'de 3 dakika 95°C'de 30 saniye 58°C'de 30 saniye 72°C'de 1 dakika 72°C'de 10 dakika 35 siklus
10X Dream Taq buffer	2,5 µl	
10 mM dNTP mix	0,5 µl	
Primer (nBCoV N-F) (10 pmol/µl)	1 µl	
Primer (nBCoV N-R) (10 pmol/µl)	1 µl	
Nükleaz Ari Su	17,25 µl	
İlk turun ürünü	2,5 µl	
Toplam	25 µl	

2.2.2.3. BCoV S Gen Bölgesinin Reverz Transkripsiyon – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR) Tekniği ile Çoğaltılması

2.2.2.3.1. Ekstraksiyon ve Viral RNA'nın Revers Transkripsiyonu

N gen bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan RT-PCR için kullanılan RNA ve cDNA'lar ile gerektiğinde 2.2.2.1 ve 2.2.2.2.1'de bildirilen prosedürlere göre tanı örneklerinden yeniden hazırlanan RNA ve cDNA kullanıldı.

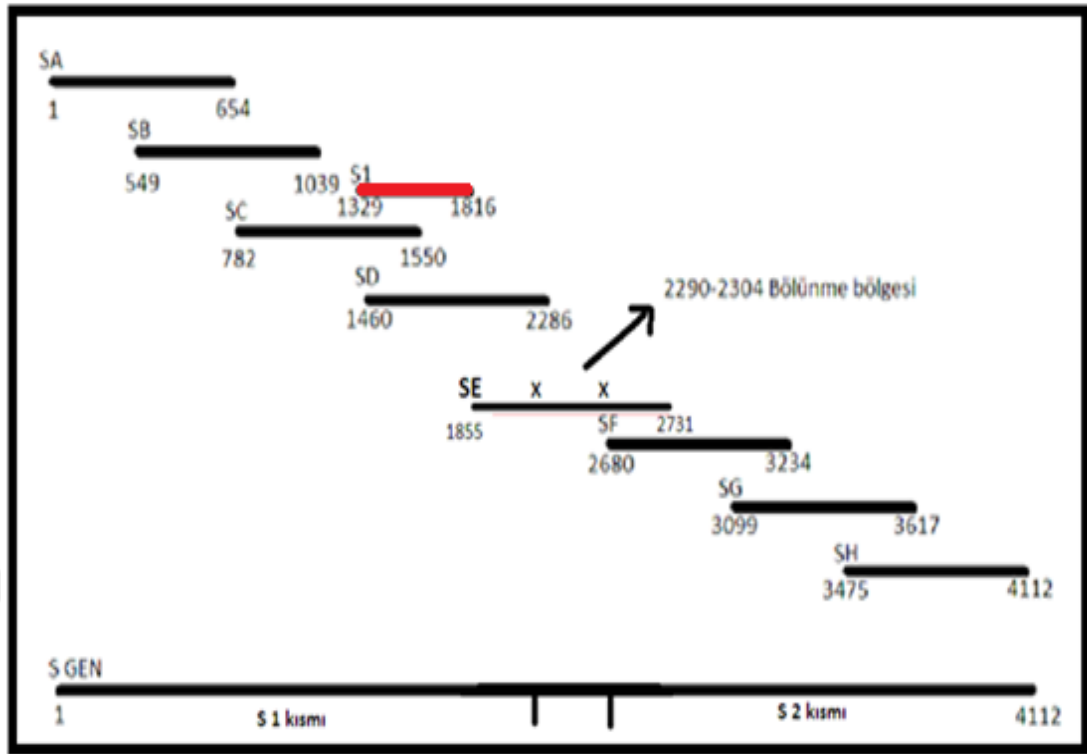
2.2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tekniği

Nested-PCR pozitif tespit edilen örnekler, BCoV S gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak RT-PCR tekniğine tabi tutuldu. Bu amaçla S gen bölgesi 4112 bp uzunluğunda olduğundan, birbirine eklemeli olacak şekilde tasarlanmış sekiz adet primer çifti kullanıldı. Ayrıca çalışma süresince söz konusu primerlerle hedeflenen bölgelerin çoğaltılmasındaki sıkıntılar nedeniyle, tüm S1 gen bölgesinin dizinleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz ile yüksek benzerlikte sonuç verdiği literatürde (Brandao ve ark., 2006) bildirilen bir başka primer çifti de (S1) bu çalışmada kullanıldı. S gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin dizinleri, yerleşimleri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri Çizelge 2.6; çalışma kullanılan

primer çiftleri ile elde edilmesi hedeflenen dizinlerin S gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 2.1’de sunuldu.

Çizelge 2.6. Kullanılan primerlerin dizinleri, lokasyonu ve amplikon büyüklükleri.

Primer Çiftleri	Baz Dizisi (5'→3')	Lokasyon	Hedef Bölge	Amplikon	Kaynak
S-AF	ATGTTTTTGATACTTTTAATT	1-21	S-1	655bp	Hasöksüz ve ark., (2002)
S-AR	AGTACCACCTTCTTGATAAA	654-635			
S-BF	ATGGCATTGGGATACAG	549-565	S-1	490 bp	
S-BR	TAATGGAGAGGGCACCGACTT	1039-1018			
S-CF	GGGTTACACCTCTCACTTCT	782-801	S-1	769bp	
S-CR	GCAGGACAAGTGCCTATACC	1550-1531			
S-DF	GTCCGTGTAAATTGGATGGG	1460-1479	S-1	827bp	
S-DR	TGTAGAGTAATCCACACAGT	2286-2267			
S-EF	TTACAAAAATCAAACACAGACAT	1855-1877	S-1 S-2	877bp	
S-ER	AAACTTTATTACAATCGCTTCC	2731-2710			
S-FF	TCAATTTTCCCCTGTATTAGG	2680-2702	S-2	555 bp	Martinez ve ark., (2012)
S-FR	CMAGTCTRGATAGAATTTCTTGTA	3234-3209			
S-GF	GCTACCAATTCTGCTTTAGTTA	3099-3121	S-2	519 bp	
S-GR	GTAGTAATAACCACTACCAGTG	3617-3595			
S-HF	TTTAGCTATGTCCCTACTAAGTA	3475-3498	S-2	637 bp	
S-HR	CCAATAAATCAAAGACGAACCTTA	4112-4089			
S-1F	GTTTCTGTAGCAGGTTTAA	1329-1348	S-1	488 bp	Brando ve ark., (2006)
S-1R	ATATTACACCTATCCCCTTG	1797-1816			



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ile elde edilmesi hedeflenen dizinlerin S gen bölgesindeki yerleşimi.

S gen bölgesinin eldesi amacıyla yapılan PCR'lar Thermo Scientific DreamTaq DNA Polimeraz (#EP0702) kullanılarak yapıldı.

1. PCR karışımının içine; 10X DreamTaq buffer 2,5 µl, 10 mM dNTP mix 0,5 µl, primerlerden 1'er µl, Dream Taq DNA polimerazdan (5 U/µl) 0,25 µl ve nükleaz ari sudan 17,25 µl konuldu.
2. Hazırlanan karışımın içine 2,5 µl cDNA eklendi.
3. PCR karışımının bulunduğu tüpler, ısı döngü cihazına yerleştirildi. Çalışmada kullanılan dokuz farklı primer çifti olması sebebiyle bağlanma aşaması ısı dereceleri farklılık göstermektedir. PCR'larda uygulanan ısı döngüsü; başlangıç denatürasyon aşaması 95°C derecede 3 dakika, denatürasyon aşaması 95°C derecede 30 saniye, bağlanma aşaması 30 saniye, uzama aşaması 72°C derecede 1 dakika ve son uzama aşaması 72°C derecede 10 dakika olarak, her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu (Çizelge 2.7). Isı döngü cihazı olarak Biometra (Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.7. S gen bölgesinin eldesi amacıyla uygulanan PCR karışım bileşenleri ve programları.

Karışım Bileşeni	Miktar (µl)	Program
Dream Taq DNA polimeraz	0,25 µl	95°C'de 3 dakika 95°C'de 30 saniye **°C'de 30 saniye 72°C'de 1 dakika 72°C'de 10 dakika 35 siklus
10X Dream Taq buffer	2,5 µl	
10 mM dNTP mix	0,5 µl	
Primer F* (10 pmol/µl)	1 µl	
Primer R* (10 pmol/µl)	1 µl	
Nükleaz Ari Su	17,25 µl	
cDNA	2,5 µl	
Toplam	25 µl	

*: Farklı hedef bölgeler için kullanılan primer çifti

***: Her primer çifti için farklı ısı derecesi (SA için 51°C; SC 58°C; SH 58°C ve diğer primer çiftleri için 55°C'de).

2.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi

PCR sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi amacıyla %1'lik agaroz jel (Prona, EU) kullanıldı. Jelin hazırlanması esnasında Safeview™ Classic (Cat G108) boyası ilave edildi. Agaroz jelin hazırlanmasında ve tank solüsyonu olarak 0,5 X TAE (Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) kullanıldı. 0,5 X TAE solüsyonu içerisinde ısı yardımıyla (mikro dalga fırın) çözülen agaroz 50 – 55°C'ye soğutulduktan sonra içine Safeview™ Classic (Katalog Numarası: G108) boyası eklendi ve jel taraklarının yerleştirilmiş olduğu jel taşıyıcısına döküldü. Agarozun donması için yaklaşık 15 dakika beklendi. Daha sonra jel tarakları jel taşıyıcısından dikkatli bir şekilde sökülerek, donan jel elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünleri yükleme boyası (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) ile bir birim boyaya üç birim PCR ürünü olmak üzere karıştırılarak tarakların çıkartılmasıyla oluşan çukurlara konuldu. Ürün büyüklüğünün belirlenebilmesi için 100 bp'lik marker (Fermentas, Litvanya) solüsyonundan (bir birim stok marker + bir birim yükleme boyası + dört birim nükleaz ari su) en baştaki ve en sondaki çukura 1 µl konuldu. Yüklenen jele 8 volt/santimetre (cm) elektrik akımı uygulanarak yaklaşık 30 dakika süreyle PCR ürünlerinin göçü sağlandı. Takiben jel, jel görüntüleme sisteminde

(Kodak, Gel Logic 100, ABD) görüntülendi. PCR sonucu oluşan bantların görüntüleri elde edildi.

2.2.4. Dizin Analizi

PCR ürünlerinin dizin analizleri ticari bir firma tarafından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

2.2.5. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Analiz sonunda elde edilen dizinler, Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information: NCBI) tarafından sağlanan Basit Lokal Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool: BLAST) web sayfası kullanılarak tanımlandı. Dizinler genel amaçlı çoklu hizalama programı olan Aliview (Larsson,2014) yazılımından yararlanılarak, Gen Bankasından elde edilen referans viruslarla ve kendi aralarında hizalandı. Elde edilen nükleotit dizinlerinin kodladığı amino asit dizinleri ve amino asit dizin tabloları MEGA X ve Aliview yazılımları kullanılarak hazırlandı. Elde edilen dizinler Bankit web sayfası kullanılarak accession numaraları alındı. Nükleik asit benzerlik tabloları SIAS web sayfası kullanılarak oluşturuldu.

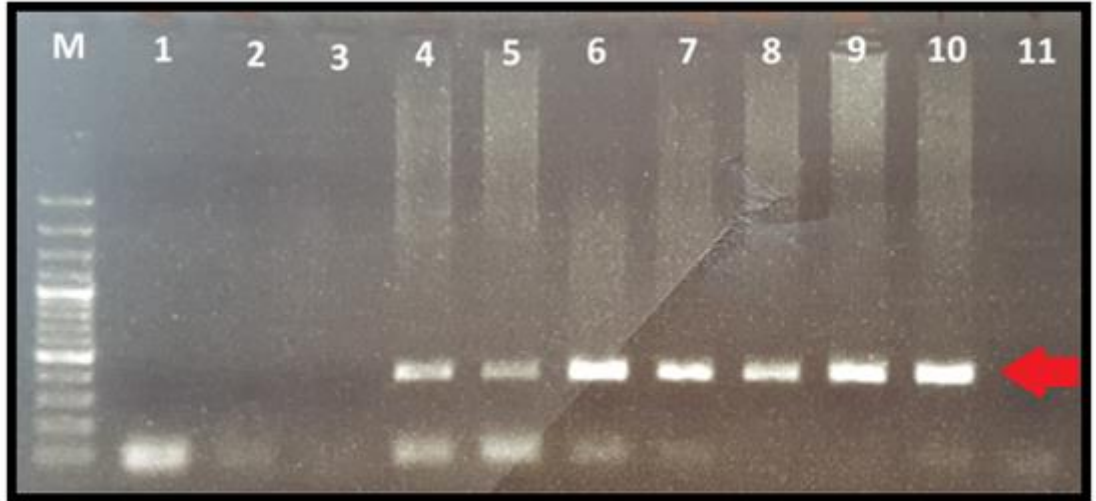
2.2.6. Filogenetik Analiz

Elde edilen yerel suşların dizinleri ile Gen Bankasındaki diğer coronavirus dizinleri arasındaki genetik yakınlığın ortaya konulması amacıyla, filogenetik analiz MEGA X programı ile yapıldı. Tüm verilere Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1 000 replika) ve p-distance parametresi uygulandı.

3. BULGULAR

3.1. BCoV Tanısı İçin RT-Nested PCR ve Filogenetik Analiz

Bu çalışmada sindirim sistemi enfeksiyonu klinik bulguları gösteren 41 hayvandan alınan gaita ve solunum sistemi enfeksiyonu klinik bulguları gösteren 78 hayvandan alınan nazal akıntı örnekleri olmak üzere toplam 119 tanı materyali RT-Nested PCR ile BCoV varlığı bakımından test edildi. Beklenen büyüklüklerde amplicon oluşumuna (407 bp) dayanılarak (Şekil 3.1), 9 gaita ve 26 nazal akıntı örneğinde BCoV varlığı saptandı (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. BCoV Nested-RT-PCR 2. tur sonucu jel görüntüsü [M: DNA merdiveni (100 bp), 1-9: Örnekler, 10: Pozitif Kontrol (407 bp), 11: Negatif Kontrol].

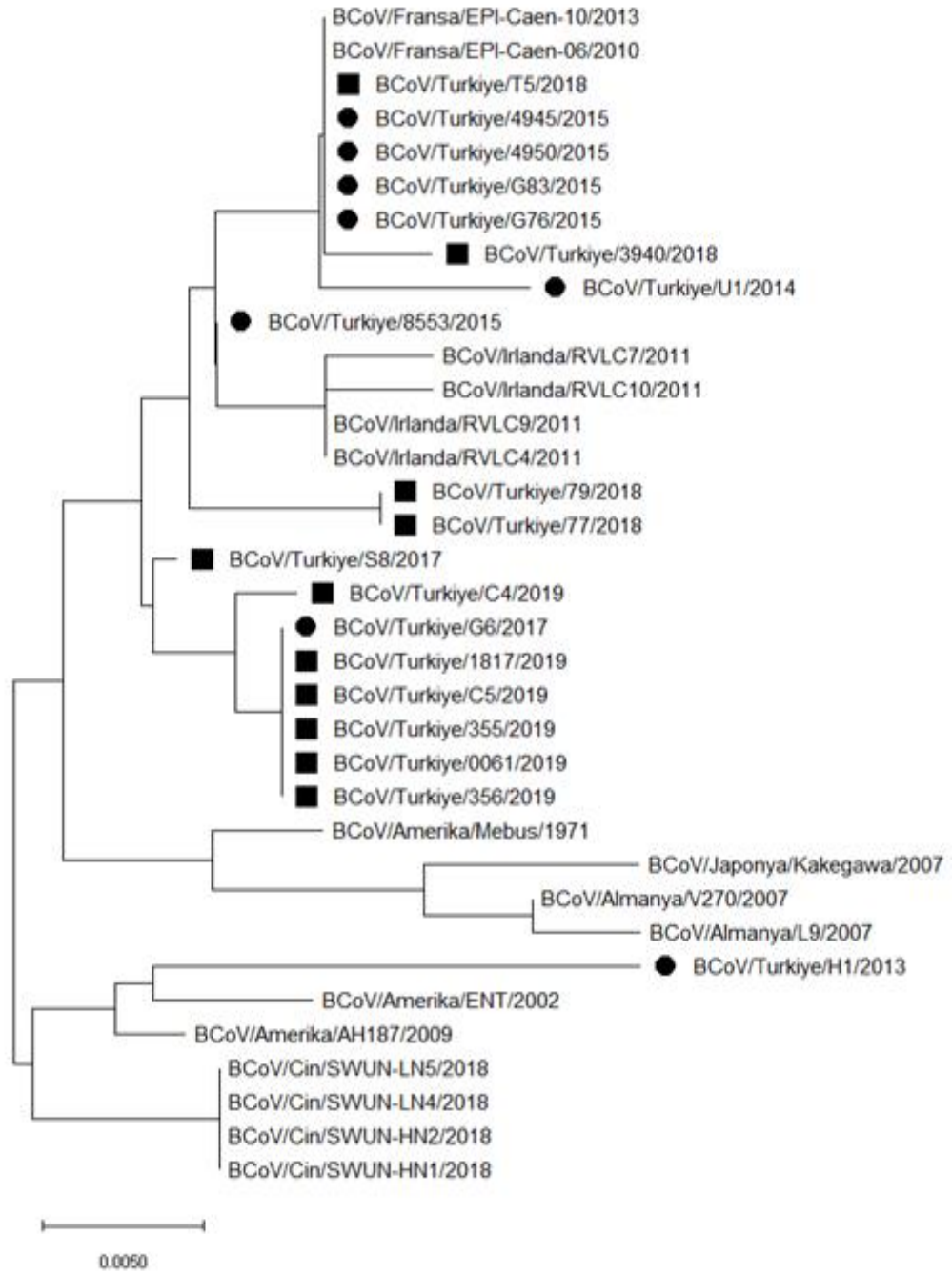
Elde edilen ampliconlardan, pozitif örneklerin işletmelere göre dağılımı, örnekleme zamanı vb. dikkate alınarak seçilen 19 amplicon kullanılarak, hizmet alımı ile dizin bilgileri elde edildi. Söz konusu dizinlere dayanılarak, BCoV tanısı teyidi yapıldı ve N gen dizinleri için Gen Bankası accession numaraları alındı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. BCoV saptanan tanı materyallerine ilgili bilgiler ve N gen gen bankası kayıt no.

Sıra No	Örneğin Adı	Örnek Türü	Geldiği Yer	Hayvanın Yaşı	Gen Bankası Kayıt No
1	H 1	Gaita	İzmir	14 gün	MK787439
2	D.H.9.7.14	Gaita	Ankara	7 gün	
3	U 1	Gaita	Urfa	10 gün	MK787438
4	8553	Gaita	Urfa	8 gün	MK787435
5	G76	Gaita	Amasya	4 gün	MK787436
6	G83	Gaita	Amasya	4 gün	MK787437
7	4950	Gaita	İzmir	15 gün	MK787434
8	4945	Gaita	İzmir	15 gün	MK787433
9	G 6	Gaita	Denizli	1 ay	MK787432
10	S 8	Nazal Akıntı	Denizli	9 gün	MK787431
11	3940	Nazal Akıntı	Ankara	15 gün	MK787429
12	77	Nazal Akıntı	Ankara	8 ay	MK787427
13	79	Nazal Akıntı	Ankara	8 ay	MK787428
14	T 5	Nazal Akıntı	Tokat	15 gün	MK787430
15	C 4	Nazal Akıntı	Ankara		MK787414
16	C 5	Nazal Akıntı	Ankara		MK787415
17	355	Nazal Akıntı	Hatay		MK787416
18	356	Nazal Akıntı	Hatay		MK787417
19	0061	Nazal Akıntı	Hatay		MK787419
20	1817	Nazal Akıntı	Hatay		MK787418
21	8280	Nazal Akıntı	Ankara	15 gün	
22	8324	Nazal Akıntı	Ankara	15 gün	
23	8298	Nazal Akıntı	Ankara	15 gün	
24	8328	Nazal Akıntı	Ankara	15 gün	
25	1 N	Nazal Akıntı	Burdur	2 ay	
26	2 N	Nazal Akıntı	Burdur	1,5 ay	
27	3 N	Nazal Akıntı	Burdur	7 ay	
28	4 N	Nazal Akıntı	Burdur	9 ay	
29	1 N13	Nazal Akıntı	Burdur	1,5 yaş	
30	3 N13	Nazal Akıntı	Burdur	1,5 yaş	
31	6291	Nazal Akıntı	Tokat	60 gün	
32	9641	Nazal Akıntı	Tokat	90 gün	
33	350	Nazal Akıntı	Tokat	60 gün	
34	6292	Nazal Akıntı	Tokat	60 gün	
35	204	Nazal Akıntı	Tokat	50 gün	

Bu çalışmada elde edilen 19 BCoV N gen dizini, kendi aralarında ve sırasıyla gaita ve nazal akıntı orijinli referans viruslar olan Mebus ve LSU ile nükleik asit benzerlik yönünden incelendi. Yerel virusların Mebus ile %96,32 - 98,99 oranlarında, LSU ile ise %96,98 - 98,99 oranlarında benzerliği görüldü. Yerel virusların kendi aralarında benzerlik oranları %96,98 - 100 olarak saptandı. Gaita orijinli ve nazal akıntı orijinli yerel viruslar arasındaki benzerlik oranları sırasıyla %96,98 - 100 ve %98,66 - 100 olarak belirlendi.

Yerel suşlarının N gen dizinleri ile Gen Bankasındaki diğer coronavirus dizinleri (Çizelge 3.2) Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1 000 replika) ve p-distance parametresi uygulanarak analiz edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. BCoV'ların nükleik asitleri ile N gen filogenetik analizi.
 Yerel BCoV: ●: Gaita örnekleri ■: Nazal akıntı örnekleri

Çizelge 3.2. N gen bölgesi dizinleri Gen Bankasına kaydedilen yerel BCoV suşları ve filogenetik analiz için kullanılan Gen Bankası veri tabanında kayıtlı diğer coronavirus suşlarına ilgili bilgiler.

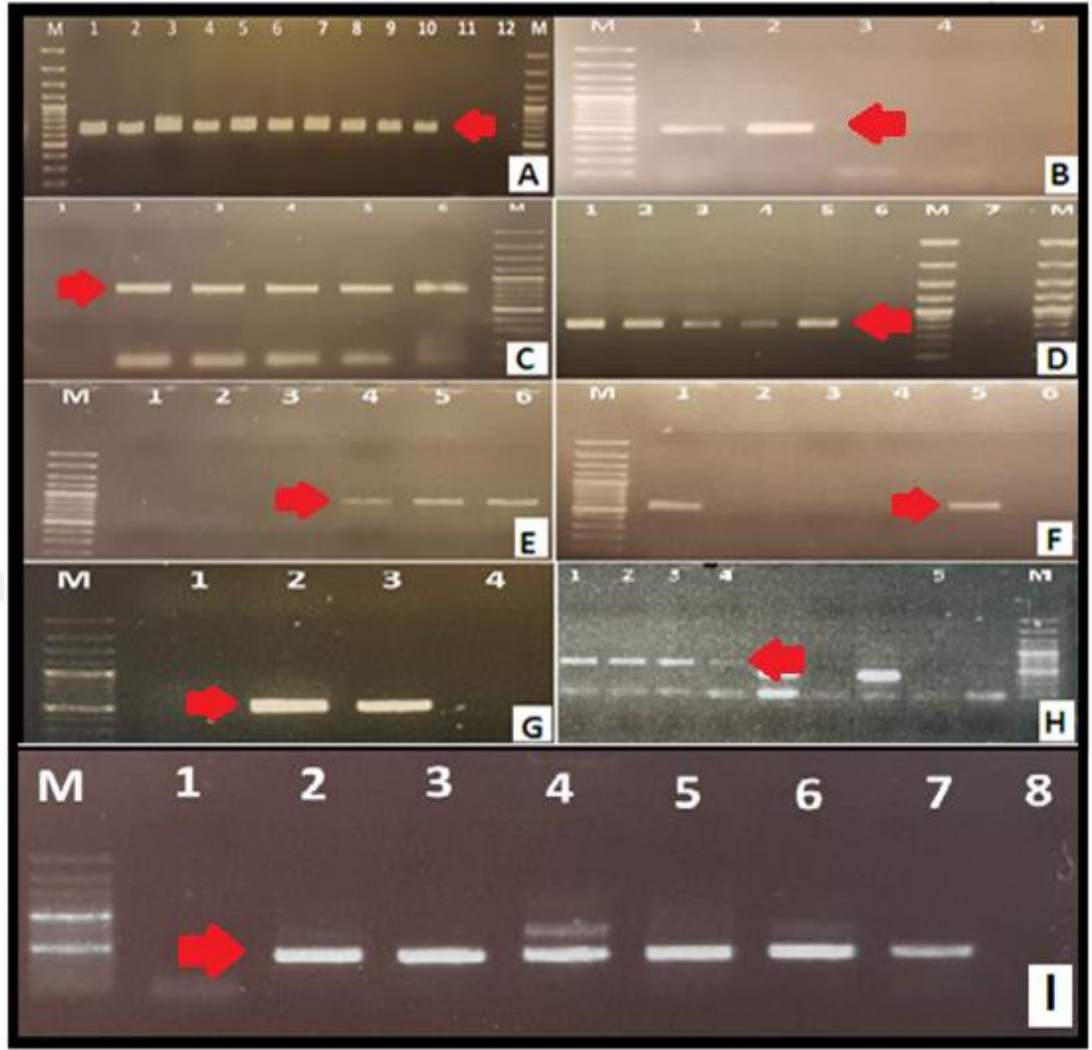
BCoV Adı *	Örnek Türü	Gen Bankası Accession No	Kaynak
BCoV/Türkiye/H1/2013	Gaita	MK787439	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/U1/2014	Gaita	MK787438	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/4950/2015	Gaita	MK787434	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/4945/2015	Gaita	MK787433	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/G76/2015	Gaita	MK787436	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/G83/2015	Gaita	MK787437	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/8553/2015	Gaita	MK787435	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/G6/2017	Gaita	MK787432	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/S8/2017	Nazal Akıntı	MK787431	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/T5/2018	Nazal Akıntı	MK787430	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/79/2018	Nazal Akıntı	MK787428	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/77/2018	Nazal Akıntı	MK787427	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/3940/2018	Nazal Akıntı	MK787429	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/C4/2019	Nazal Akıntı	MK989614	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/C5/2019	Nazal Akıntı	MK989615	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/355/2019	Nazal Akıntı	MK989616	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/356/2019	Nazal Akıntı	MK989617	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/1817/2019	Nazal Akıntı	MK989618	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/0061/2019	Nazal Akıntı	MK989619	Bu çalışma
BCoV/Amerika/Mebu/1971	Gaita	U00735	Mebus ve ark., 1972
BCoV/Amerika/ENT/2002	Gaita	AF391541	Chouljenko ve ark., 2001
BCoV/Amerika/AH187/2009	Nazal Akıntı	FJ938065	NCBI
BCoV/Cin/SWUN-LN4/2018	Gaita	MK095169	NCBI
BCoV/Cin/SWUN-LN5/2018	Gaita	MK095170	NCBI
BCoV/Cin/SWUN-HN1/2018	Gaita	MK095171	NCBI
BCoV/Cin/SWUN-HN2/2018	Gaita	MK095172	NCBI
BCoV/Japonya/Kakegawa/2007	Hücre	AB354579	Kanno ve ark., 2007
BCoV/İrlanda/RVLC4/2011	Gaita	KF272909	NCBI
BCoV/İrlanda/RVLC7/2011	Gaita	KF272911	NCBI
BCoV/İrlanda/RVLC9/2011	Gaita	KF272913	NCBI
BCoV/İrlanda/RVLC10/2011	Gaita	KF272915	NCBI
BCoV/Almanya/L9/2007	Hücre	EF193073	NCBI
BCoV/Almanya/V270/2007	Gaita	EF193074	NCBI
BCoV/Fransa/EPI-Caen-06/2010	Gaita	KT318088	Kin ve ark., 2016
BCoV/Fransa/EPI-Caen-10/2010	Gaita	KT318092	Kin ve ark., 2016

*: BCoV adlandırması “BCoV / Ülke/Örnek Adı / Örnekleme Yılı” sıralamasını içermektedir.

3.2. BCoV'ların S Gen Bölgesi Moleküler Analizi

3.2.1 RT-PCR ve Dizin Analizi Sonuçları

N gen bölgesinin çoğaltılmasını hedefleyen PCR sonucunda BCoV varlığı tespit edilen 35 örnek, Çizelge 2.6'da bildirilen birbirine eklemeli olacak şekilde tasarlanmış sekiz adet primer çifti (SA-SH) kullanılarak, 4112 bp uzunluğundaki S gen bölgesi dizinlerinin elde edilmesi amacıyla test edildi. RT-PCR sonucunda elde edilen beklenen büyüklüklerdeki (Şekil 3.3), dizin analizi için kullanılabilir nitelikte olan ampliconların hizmet alımı ile sağlanan dizin bilgileri değerlendirildiğinde, bu çalışma kapsamında yerel BCoV'lardan sadece 5'i için tüm S gen bölgesi dizinleri elde edilirken, diğer örneklerden dört tanesi için en az 3 primer çifti ile çoğaltılması hedeflenen kısmi S gen bölgesi bilgileri sağlandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan BCoV Mebus suşu içinde tüm primer çiftleri ile beklenen büyüklükte amplicon elde edildi. Çok sayıda optimizasyon çalışmasına karşı birçok örnekte hedeflenen ürünlerin çoğaltılmasındaki sıkıntılar nedeniyle, tüm S1 gen bölgesinin dizinleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz ile yüksek benzerlikte sonuç verdiği literatürde (Brandao ve ark., 2006) bildirilen bir başka primer çifti de (S1) bu çalışmada kullanıldı ve iki BCoV için daha kısmi S gen dizin bilgileri sağlandı (Çizelge 3.3; Şekil 3.3).



Şekil 3.3. BCoV kısmi S gen bölgesi çoğaltılması için farklı primerlerle yapılan RT-PCR jel görüntüleri (M: DNA merdiveni, 100 bp).

- A. Primer SA: [2-11: Örnekler, 1: Pozitif Kontrol (655 bp), 12: Negatif Kontrol]
B. Primer SB: [2-4: Örnekler, 1: Pozitif Kontrol (490 bp), 5: Negatif Kontrol]
C. Primer SC: [2-5: Örnekler, 6: Pozitif Kontrol (769 bp), 1: Negatif Kontrol]
D. Primer SD: [2-6: Örnekler, 1: Pozitif Kontrol (827 bp), 7: Negatif Kontrol]
E. Primer SE: [2-5: Örnekler, 6: Pozitif Kontrol (877 bp), 1: Negatif Kontrol]
F. Primer SF: [2-5: Örnekler, 1: Pozitif Kontrol (555 bp), 6: Negatif Kontrol]
G. Primer SG: [1-2: Örnekler, 3: Pozitif Kontrol (519 bp), 4: Negatif Kontrol]
H. Primer SH: [2-4: Örnekler, 1: Pozitif Kontrol (637 bp), 5: Negatif Kontrol]
I. Primer S1: [1-6: Örnekler, 7: Pozitif Kontrol (488 bp), 8: Negatif Kontrol]

Çizelge 3.3. Farklı primer çiftleri ile kısmi /tüm S gen bölgesi dizinleri sağlanan BCoV’larla ilgili Gen Bankası numaraları.

BCoV Adı *	Primer Çifti								
	SA	SB	SC	SD	SE	SF	SG	SH	S1
BCoV/Türkiye/4950/2015	MK989620								+
BCoV/Türkiye/4945/2015	MK989621								+
BCoV/Türkiye/U1/2014	MK989622								+
BCoV/Türkiye/S8/2017	MK989624								+
BCoV/Türkiye/T5/2018	MK989623								+
BCoV/Türkiye/G76/2015	MK989628				-	MK989629			+
BCoV/Türkiye/G83/2015	MK989630	MK989631		-	-	MK989632			+
BCoV/Türkiye/H1/2013	-	-	MK989633	-	-	-	MK989634		+
BCoV/Türkiye/79/2018	MK989627			-	-	-	-	-	+
BCoV/Türkiye/8553/2015	-	-	-	-	-	-	-	-	MK989626
BCoV/Türkiye/1N/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	MK989625

*: BCoV adlandırması “BCoV / Ülke / Örnek Adı / Örnekleme yılı” sıralamasını içermektedir.

(-): Amplikon elde edilemedi ya da dizin bilgisi elde edilemedi

(+): S1 primerleri ile ürün elde edilmiştir. Ancak ilgili dizinler Gen Bankası No alınan kısmi/tüm S gen bölgesi dizinleri içerisinde yer aldığından, ayrıca Gen Bankası No alınmamıştır.

Hizmet alımı ile dizin bilgileri sağlanan virusların dizinleri NCBI tarafından sağlanan BLAST web sayfası kullanılarak Gen Bankasında yer alan diğer BCoV’ların S gen bölgesiyle eşleştigi gözlemlendi. Elde edilen dizinlerin Gen Bankasına kaydı yapılarak “accession” numaraları alındı (Çizelge 3.3).

3.2.2. Filogenetik Analiz Sonuçları

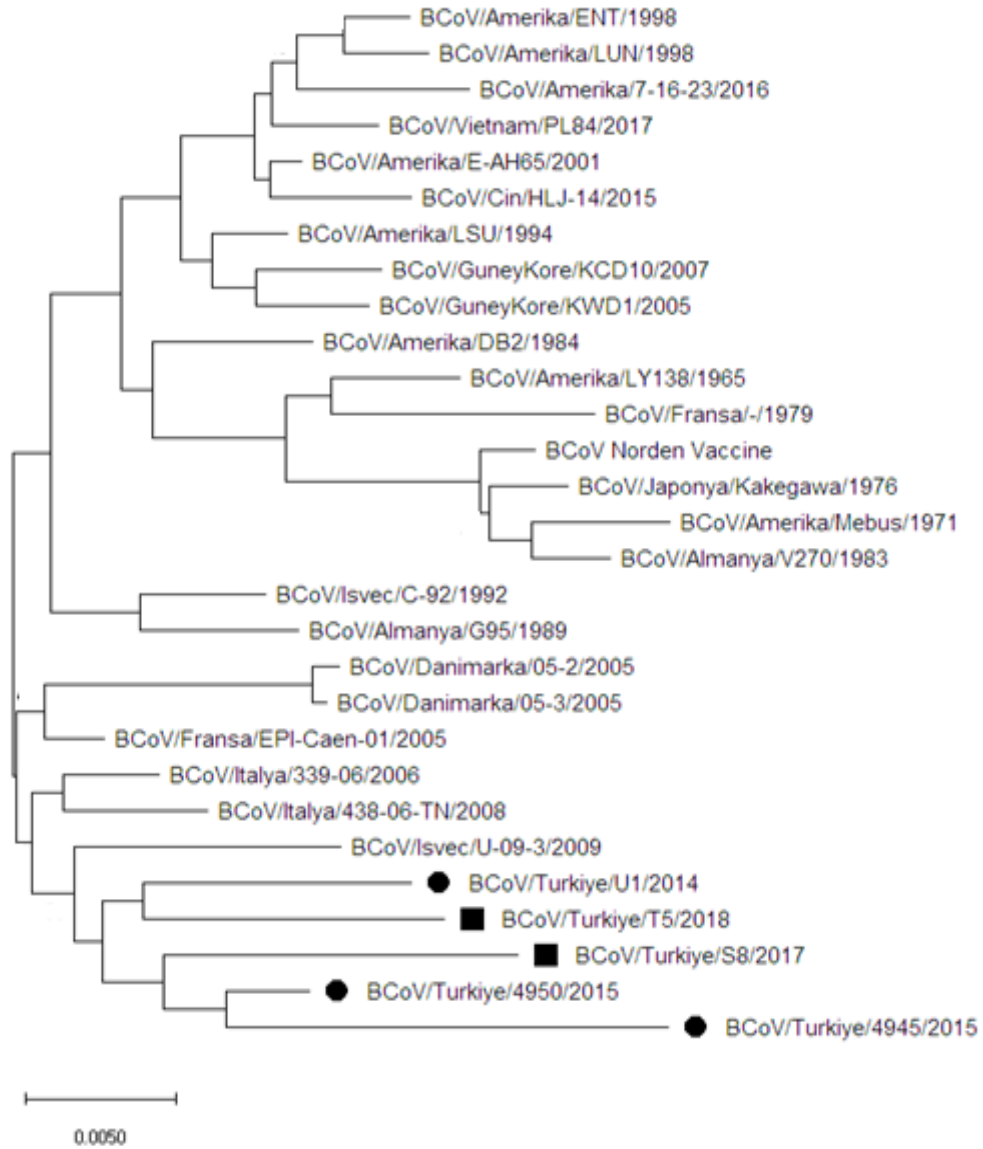
Yerel suşlarının tüm S gen dizinleri ve S1 primer çifti kullanılarak elde edilen dizinleri Gen Bankasındaki diğer coronavirus dizinleri (Çizelge 3.4) ile Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1 000 replika) ve p-distance parametresi uygulanarak ayrı ayrı analiz edildi. Tüm S gen bölgesi için nükleik asit ve amino asit düzeyinde elde edilen dizinlere ilgili filogenetik ağaçlar Şekil 3.4 ve Şekil 3.5; S1 primerleri için hazırlanan filogenetik ağaçlar Şekil 3.6 ve Şekil 3.7 ‘da sunuldu.

Çizelge 3.4. S gen bölgesi dizinleri Gen Bankası veri tabanında kayıtlı ve yerel BCoV suşları S filogenetik analiz için kullanılan Gen Bankası veri tabanında kayıtlı diğer coronavirus suşlarına ilgili bilgiler.

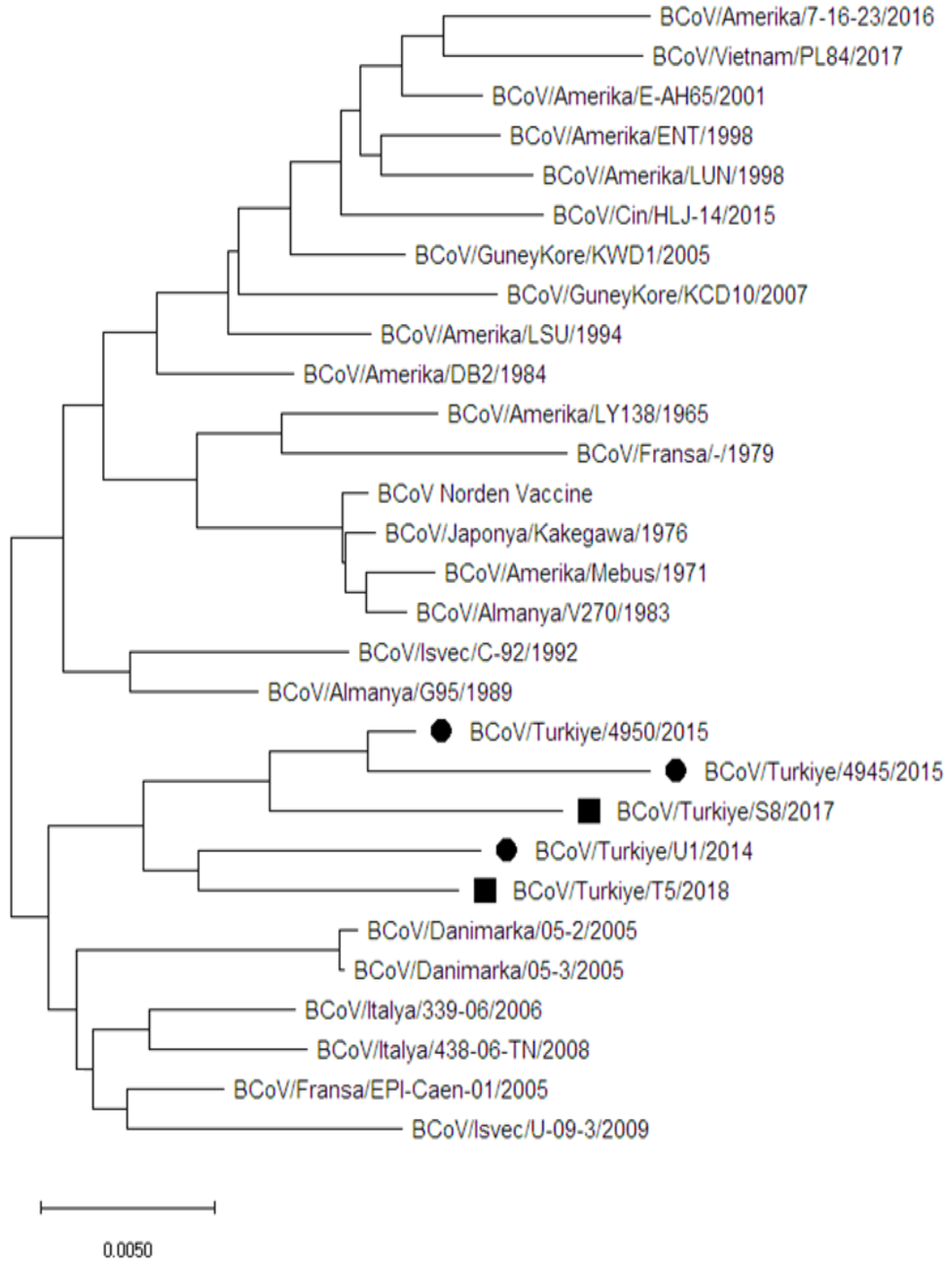
BCoV Adı *	Örnek Türü	Gen Bankası Accession No	Kaynak
BCoV/Türkiye/H1/2013	Gaita	MK989633-34	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/U1/2014	Gaita	MK989622	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/4950/2015	Gaita	MK989620	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/4945/2015	Gaita	MK989621	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/G76/2015	Gaita	MK989628-29	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/G83/2015	Gaita	MK989630-32	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/8553/2015	Gaita	MK989626	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/S8/2017	Nazal Akıntı	MK989624	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/T5/2018	Nazal Akıntı	MK989623	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/79/2018	Nazal Akıntı	MK989627	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/1N/2019	Nazal Akıntı	MK989625	Bu çalışma
BCoV/Türkiye/AN4/2005	Gaita	GQ259978	Alkan ve ark., 2011
BCoV/Türkiye/AN11/2005	Gaita	GQ259979	Alkan ve ark., 2011
BCoV/Amerika/LY138/1965	Gaita	AF058942 (LY138)	Chouljenko ve ark., 1998
BCoV/Amerika/Mebus/1971	Gaita	U00735 (Mebus)	Mebus ve ark., 1972
BCoV/Amerika/ENT/1998	Gaita	AF391541	Chouljenko ve ark., 2001
BCoV/Amerika/E-AH65/2001	Gaita	EF424615	Zhang ve ark., 2007
BCoV/Amerika/7-16-23/2016	Gaita	MH043955	Byukusenge ve ark., 2018
BCoV/Cin/HLJ-14/2015	Gaita	KM985631	NCBI
BCoV/Danimarka/05-2/2005	Gaita	KF169917	Bidokhti ve ark., 2013
BCoV/Fransa/-/1979	Gaita	D00731	Boireau ve ark., 1990
BCoV/Güney Kore/KCD10/2007	Gaita	DQ389641	Park ve ark., 2007b
BCoV/İsveç/C-92/1992	Gaita	KF169908	Bidokhti ve ark., 2013
BCoV/İtalya/339-06/2006	Gaita	EF445634	Decaro ve ark., 2008b
BCoV/Japonya/ Kakegawa/1976	Gaita	AB354579	Kanno ve ark., 2007
BCoV/Vietnam/PL84/2017	Gaita	MH197037	Shin ve ark., 2019
BCoV/Almanya/G95/1989	Nazal Akıntı	M80844	Zhang ve ark., 1994
BCoV/Amerika/LSU/1994	Nazal Akıntı	AF058943	Chouljenko ve ark., 1998
BCoV/Amerika/LUN/1998	Nazal Akıntı	AF391542	Chouljenko ve ark., 2001
BCoV/Danimarka/05-3/2005	Nazal Akıntı	KF169918	Bidokhti ve ark., 2013
BCoV/Fransa/EPI-Caen-01/2005	Nazal Akıntı	KT318111	Kin ve ark., 2016
BCoV/Güney Kore/KWD1/2005	Nazal Akıntı	AY935637	Jeong ve ark., 2005
BCoV/İsveç/U-09-3/2009	Nazal Akıntı	KF169936	Bidokhti ve ark., 2013
BCoV/İtalya/438-06-TN/2008	Nazal Akıntı	EU814647	NCBI
BCoV/Almanya/V270/1983	-	EF193075	NCBI
BCoV/Amerika/DB2/1984	-	DQ811784	NCBI
BCoV Norden Vaccine	Aşı suşu	M64668	Zhang ve ark., 1991

*: BCoV adlandırması “BCoV / Ülke / Örnek Adı / Örnekleme Yılı” sıralamasını içermektedir.

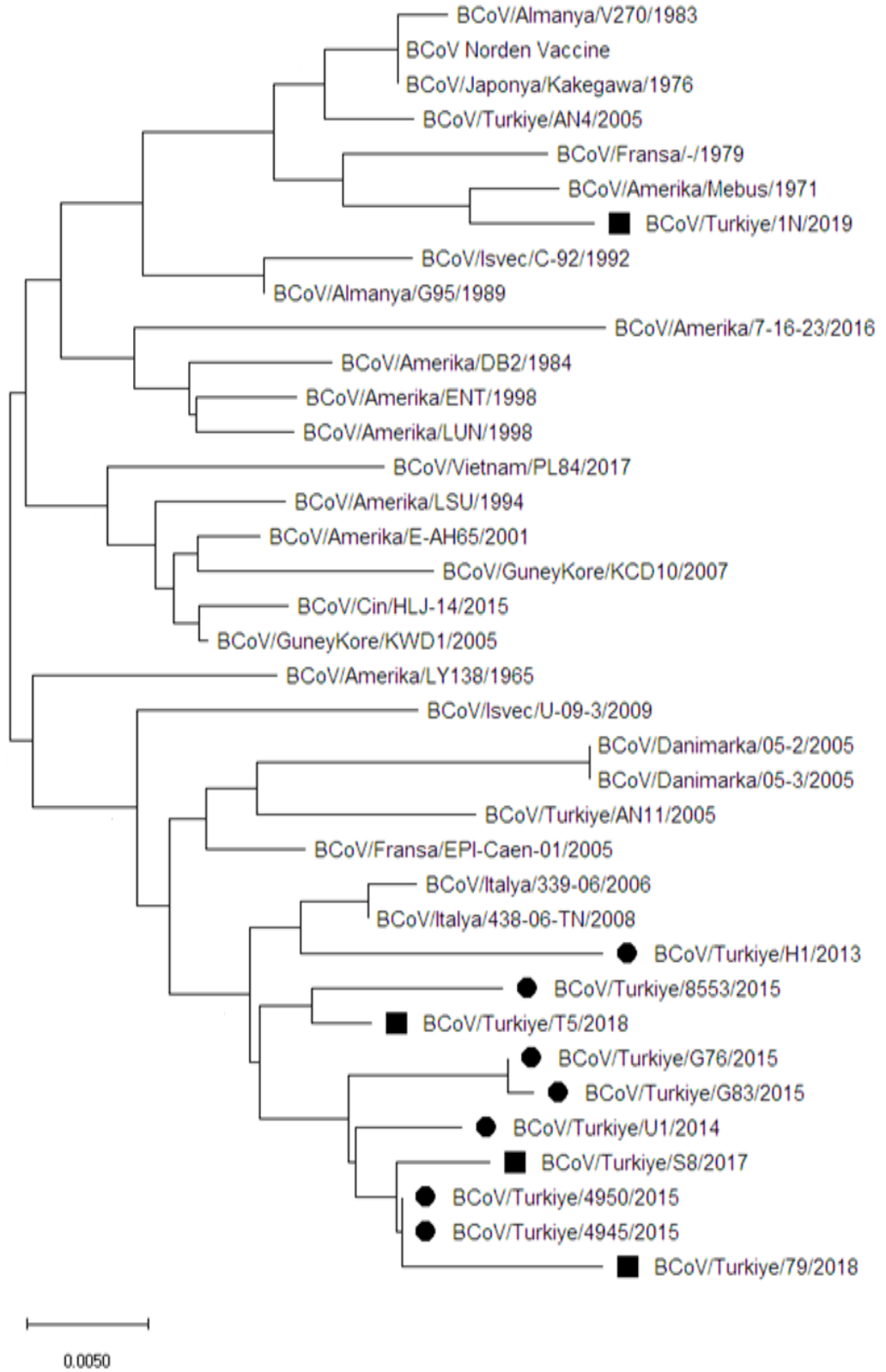
BCoV S geninde çok değişken bölgeyi hedef alan S1 primerleri kullanılarak elde edilen 11 örneğin dizinleri, daha önce ülkemizde bildirilen kısmi S gen bölgesi yerel suşları dizinleri (BCoV/Türkiye/AN4/2011 ve BCoV/Türkiye/AN11/2011) ve aynı bölgeyi içeren Gen Bankasından elde edilen çeşitli ülkelerdeki dizinler filogenetik analize tabi tutuldu. Analiz sonucunda; 1N adlı örneğin dışındaki örneklerin daha yakın kümelerde yer aldığı, sözkonusu örneğin (1N) ise BCoV referans suşu olan Mebus ile aynı kümede yerleşim gösterdiği görüldü.



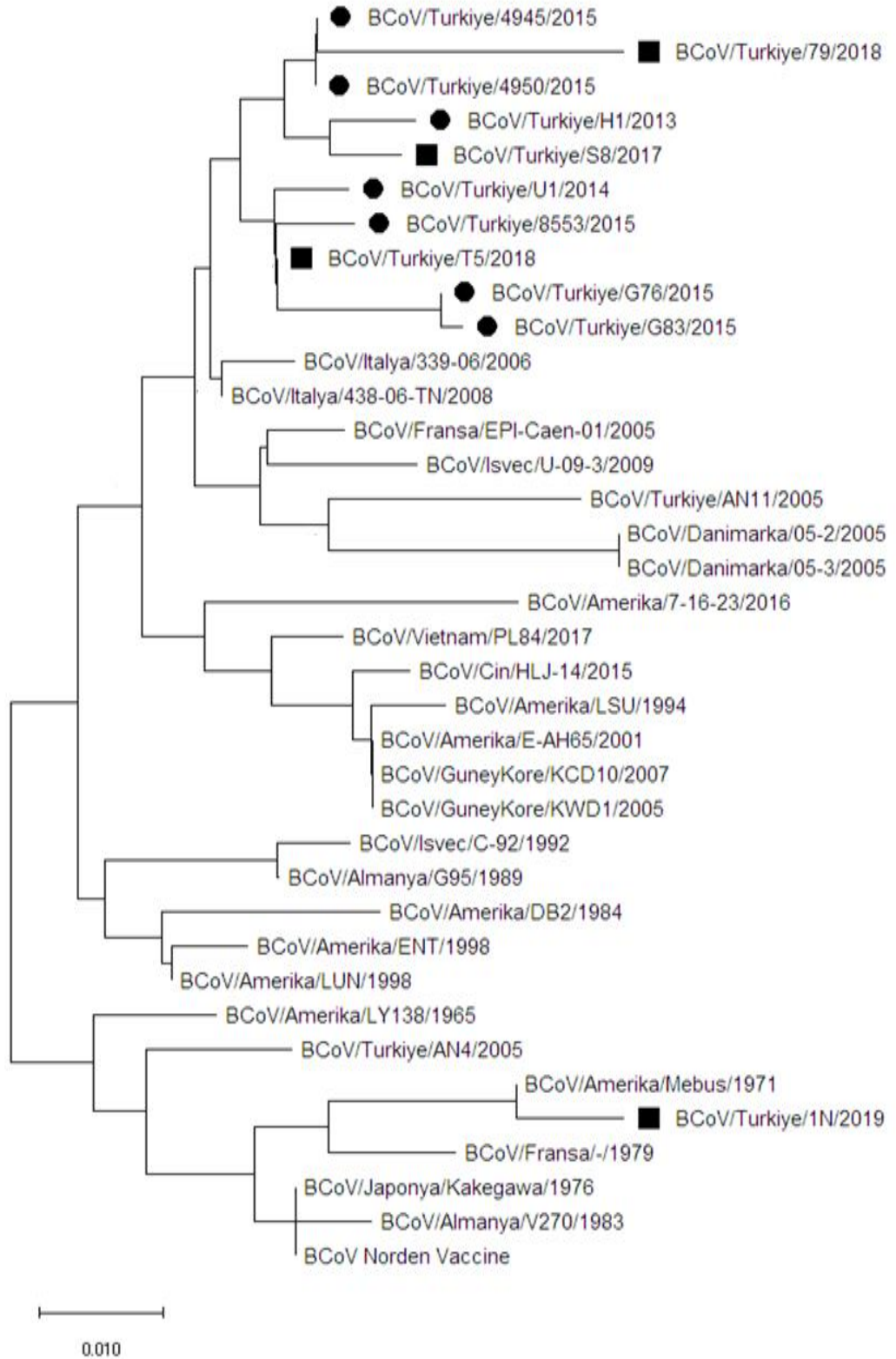
Şekil 3.4. BCoV amino asitleri ile S gen filogenetik analizi.
Yerel BCoV: ●: Gaita örnekleri ■: Nazal akıntı örnekleri.



Şekil 3.5. BCoV nükleik asitleri ile S gen filogenetik analizi.
Yerel BCoV: ●: Gaita örnekleri ■: Nazal akıntı örnekleri.



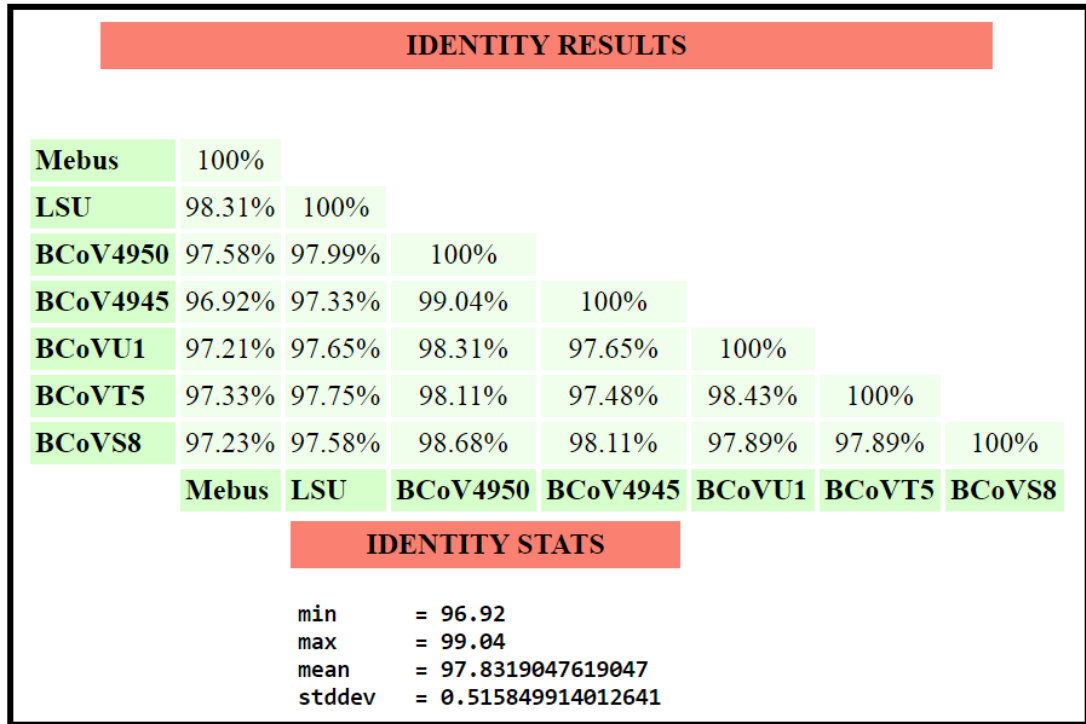
Şekil 3.6. BCoV nükleik asitleri ile çok değişken bölge (S1) filogenetik analizi.
Yerel BCoV: ●: Gaita örnekleri ■: Nazal akıntı örnekleri.



Şekil 3.7. BCoV amino asitleri ile çok değişken bölge (S1) filogenetik analizi.
Yerel BCoV: ●: Gaita örnekleri ■: Nazal akıntı örnekleri.

3.2.3. Nükleik Asit Benzerlik Sonuçları

Bu çalışmada elde edilen beş BCoV tüm S gen dizini, kendi aralarında ve sırasıyla gaita ve nazal akıntı orijinli referans viruslar olan Mebus ve LSU ile nükleik asit benzerlik yönünden incelendi (Şekil 3.8). Yerel virusların Mebus için %96,92 - 97,58 oranlarında, LSU ile ise %97,33 - 97,99 oranlarında benzerliği görüldü. Yerel virusların kendi aralarında benzerlik oranları %97,48 - 99,04 olarak saptandı. Gaita orijinli ve nazal akıntı orijinli yerel viruslar arasındaki benzerlik oranları sırasıyla %97,65 - 99,04 ve %97,89 olarak belirlendi.



Şekil 3.8. Tüm BCoV S geni dizinlerinin benzerlik oranları.

Bu çalışmada tüm S gen dizinleri elde edilen beş BCoV yanısıra, altı BCoV için kısmi gen dizinleri elde edilmiştir. S proteininin geniş reseptör bağlama alanını oluşturarak hücre reseptörlerine tutunmada görevli olan S1 gen bölgesi dizin analizi ve filogenetik analizinin, farklı sistemlerde- ve hatta türlerde- enfeksiyon oluşumunda rolünün değerlendirilmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Bu bağlamda tüm S1 gen bölgesinin dizinleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz ile yüksek benzerlikte sonuç verdiği bildirilen (Brandao ve ark., 2006) bir başka primer çifti de

(S1) bu çalışmada kullanılmıştır. Çizelge 2.6 'da görüldüğü üzere bu çalışmada toplam 11 örnek için söz konusu primerler ile elde edilen ürünlerin dizinleri vardır. Bu dizinler kendi aralarında ve sırasıyla gaita ve nazal akıntı orijinli referans viruslar olan Mebus ve LSU ile nükleik asit benzerlik yönünden incelendi (Şekil 3.9). Yerel virusların Mebus için %94,78 - 99,11 oranlarında, LSU ile ise %96,23 - 97,72 oranlarında benzerliği görüldü. Yerel virusların kendi aralarında benzerlik oranları %90,92 - 100 olarak saptandı. Gaita orijinli ve nazal akıntı orijinli yerel viruslar arasındaki benzerlik oranları sırasıyla %90,92 - 100 ve %95,13 – 98,75 olarak belirlendi (Şekil 3.9).

3.2.4. S Gen Bölgesi Amino Asit Dizin Sonuçları

Bu çalışmada saptanan yerel BCoV suşlarının S gen kısmi/tüm amino asit dizinleri, Gen Bankasında kayıtlı diğer BCoV suşlarının tüm S gen dizinleri de kullanılarak EK 2'de sunuldu. Söz konusu dizinler BCoV referans suşu Mebus ile karşılaştırıldığında, yerel virusların S gen dizinlerinde bir çoğu yerel suş spesifik amino asit değişimine yol açan spontan mutasyonların yanı sıra birçok yerel virus için ısrarcı amino asit değişikliklerinin olduğu görüldü (EK 2). Ayrıca S geninin S1 alt ünitesinde bulunan bazı önemli bölgelerde dikkate alınarak, Ek 2'de verilen dizin bilgilerinden özetle çıkarılan, yerel viruslar ve farklı ülkelerde saptanan BCoV suşlarına ilgili, amino asit değişimleri Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de sunuldu.

IDENTITY RESULTS	
LSU	100%
Mebus	96.48% 100%
BCoV4950	97.1% 96.07% 100%
BCoV4945	97.1% 96.07% 100%
BCoVU1	96.9% 95.45% 99.38% 99.38% 100%
BCoVG76	97.1% 95.24% 99.17% 99.17% 100%
BCoVG83	96.82% 94.78% 99.09% 99.09% 100%
BCoVH1	96.31% 95.22% 98.04% 98.04% 97.39% 97.18% 95.91% 100%
BCoV8553	97.09% 95.64% 98.34% 98.34% 98.13% 98.34% 98.18% 97.18% 100%
BCoVT5	97.72% 96.28% 98.96% 98.96% 98.76% 98.55% 98.41% 97.83% 98.96% 100%
BCoVS8	97.1% 96.07% 99.58% 99.58% 98.96% 98.76% 98.63% 98.04% 97.92% 98.55% 100%
BCoV79	96.27% 95.23% 99.17% 99.17% 98.55% 98.34% 98.18% 97.18% 98.13% 98.75% 100%
BCoVIN	96.23% 99.11% 96.23% 96.23% 95.57% 95.35% 94.1% 90.92% 95.79% 96.46% 96.23% 95.13% 100%
LSU	Mebus BCoV4950 BCoV4945 BCoVU1 BCoVG76 BCoVG83 BCoVH1 BCoV8553 BCoVT5 BCoVS8 BCoV79 BCoVIN
IDENTITY STATS	
min	= 90.92
max	= 100
mean	= 97.4715384615384
stddev	= 1.60638715271822

Şekil 3.9. BCoV kısmi S1 dizinlerinin benzerlik oranları.

S geninin S1 alt ünitesinde bulunan bazı önemli bölgeler için amino asit değişimleri detaylı olarak incelendi (Şekil.3.10). Mebus rehberliğinde, literatürde (Chouljenko ve ark. 1998; Martinez ve ark. 2012; Millet ve Whittaker, 2015) solunum sistemine ve sindirim sistemine tropizmde etkili olduğu bildirilen bazı amino asit değişimleri değerlendirildi.

M11T değişimi; dört gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve üç nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

K115N değişimi beş gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve üç nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

H173N değişimi beş gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve üç nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

K179Q değişimi beş gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve iki nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/79/2018),

N531D değişimi yedi gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015 BCoV/Turkiye/H1/2013, BCoV/Turkiye/8553/2015) ve üç nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

S543A değişimi yedi gaita rneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015, BCoV/Turkiye/H1/2013, BCoV/Turkiye/8553/2015) ve  nazal akıntı rneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

D1026G değişimi beş gaita rneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve iki nazal akıntı rneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017) saptandı.

Virulans faktörleri ile ilgili olduğu bildirilen bazı aminoasit değişimleri ise şöyledir:

A33V değişimi beş gaita rneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve  nazal akıntı rneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

I40T değişimi beş gaita rneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve  nazal akıntı rneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

L248M değişimi beş gaita rneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve  nazal akıntı rneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

H470D değişimi yedi gaita rneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015, BCoV/Turkiye/H1/2013, BCoV/Turkiye/8553/2015) ve

üç nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018),

V965E değişimi beş gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015) ve iki nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017),

H1241P değişimi altı gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015, BCoV/Turkiye/H1/2013) ve iki nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017),

I1341K değişimi altı gaita örneğinde (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015, BCoV/Turkiye/H1/2013) ve iki nazal akıntı örneğinde (BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017) saptandı.

Bu bölgelerin haricinde de birçok amino asit değişimine yol açan mutasyonların (Şekil. 3.10, EK 2) varlığı saptandı. Bildirilen değişimler genel olarak incelendiğinde; solunum ya da sindirim sistemi orijinli materyallerde saptanan yerel BCoV'larda varlıkları yönünden önemli bir farklılık ortaya koymadıkları; farklı ülkelerde saptanan BCoV'larda da benzer değişimlerin bulunduğu (Şekil 3.11) görülmüş olup, bu değişimlerin sözkonusu sistemlere tropizmi net olarak ortaya koyabilecek değişimler olarak değerlendirilmedi.

[illegible]

Amino Asit Dizini (Mebus: U00735)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
BCoV Adı	1	3	4	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Signal peptid alanı
SLA olarak tanımlanan immünoreaktif alan
Çok değişken bölge
Hydrofobik bölge
Heriad tekrar dizisi

Şekil 3.11. Farklı ülkelerde bildirilen BCoV'ların karşılaştırmalı amino asit değişimi tablosu.

4. TARTIŞMA

Coronavirüsler özellikle yenidoğan buzağılarda şiddetli ishal ile seyreden enfeksiyonlara bağlı olarak, sığır yetiştiriciliği işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Her ne kadar ülkemizde yapılan çalışmalar ve farklı ülkelerle ilgili bildirimlerde coronavirusun buzağı ishalleri ile ilişkisi daha sıklıkla tanımlanmış ise de, coronavirusların farklı yaş gruplarındaki sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonuna da neden olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinde bulunan küçük aile işletmesi ya da organize işletmelerde yetiştirilen, klinik bulguları ile BCoV şüphesi oluşturan (Çizelge 2.1) 119 hayvandan sağlanan tanı materyalleri, BCoV yönünden test edilmiştir. Nazal akıntı örnekleri %33,33 (26/78) oranında ve gaita örnekleri %21,95 (9/41) oranında pozitif bulunmuştur. Gaita örneklerinin önemli bir kısmı (n=28), 2001-2015 yılları arasında sağlanmış olup, daha önce yürütülen iki proje kapsamında kullanılan ve -hatta önemli bir kısmı- BCoV yönünden pozitif bulunmuş örneklerdir. Bu örneklerden 20'si muhtemelen aradan geçen zaman ve saklama koşullarına bağlı nükleik asit kaybı nedeniyle, bu çalışmada BCoV yönünden negatif bulunmuşlardır. Bu örnekler hariç tutulduğunda, ishalleri hayvanlarda saptanan pozitiflik oranı ise (%7.6, 1/13) olarak belirlenmiştir. Nazal akıntı örneklerinin birisi hariç tümü bu çalışma süresince toplanmış ve örneklemeyi takiben test edilmiş olup, belirlenen oranın (%33.33), solunum sistemi olgularında coronavirusun rolüne işaret eden önemli bir veri olduğu değerlendirilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda buzağı ishal olgularında, diğer birçok enteropatojen yanı sıra, BCoV'ların önemli oranlarda saptandığı bildirilmiştir (Alkan, 1998; Çabalar ve ark., 2007; Erdoğan ve ark., 2003; Gümüşova ark., 2007; Hasırcıoğlu, 2005; Kozat ve Tuncay, 2018; Yavru ve ark., 2016). Erişkin sığırlarla ilgili serolojik çalışmalarda (Alkan ve ark., 2011; Hasırcıoğlu, 2005; Hasöksüz ve ark., 2005; Saklı, 2017; Tokgöz ve ark., 2013; Yavru ve ark., 2016; Yıldırım ve ark., 2008) enfeksiyonun yaygınlığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada ishalleri

hayvanlardan sağlanan gaita örneklerinde tespit edilen BCoV oranının (%21.95), kullanılan örneklerin önemli bir kısmının BCoV varlığı daha önce saptanmış örneklerden oluşması ve bu çalışma süresince sağlanan örneklerde saptanan oranın (%7.6) ise sınırlı sayıda tanı materyali kullanımı sonucu elde edilmiş olması nedeniyle, ishal olgularında BCoV'un prevalansına ilgili bir veri olarak değerlendirilmesinden daha çok, BCoV'ların tek başına ya da diğler enteropatojenler ile birlikte sözkonu olgulardan sorumlu olabileceğini gösterir bir veri olarak ele alınması doğru olacaktır. Nitekim birçok Avrupa ülkesi (Bidokhti ve ark., 2013; Boireau ve ark., 1990; Decaro ve ark., 2008a; Gunn ve ark., 2015; Kin ve ark., 2017), Güney Kore (Park ve ark., 2007a), Amerika Birleşik Devletleri (Beuttemmuller ve ark., 2017; Chouljenko ve ark., 2001; Fernandes ve ark., 2018) ve uzak doğu ülkelerinden Vietnam (Shin ve ark., 2019) gibi birçok ülkedeki bildirimlere de benzer olarak, BCoV'un sindirim sistemi enfeksiyonlarında, özellikle yenidoğan buzağı ishallerinde, değişen oranlardaki rolüne dikkat çekilmiştir. Solunum sistemi enfeksiyonlarının etiyolojik ajanı olarak coronavirusların sorgulandığı çalışmaların sayısı ise hem ülkemizde hem de diğler ülkelere ait literatürde oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada farklı işletmelerde yetiştirilen, solunum sistemi enfeksiyonu bulgulu hayvanlardan alınan örneklerde saptanan BCoV pozitiflik oranı (%33.33), daha önce bildirilen serolojik çalışmalar ve etiyolojik ajanın saptandığı çalışmalara katkı sağlamakta ve ülkemizde gerek buzağı ve gerekse yetişkin sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarında tek başlarına ya da olası diğler etkenler ile birlikte oluşun hastalık nedeniyle önemli ölçüde ekonomik kayıpların oluşumuna katkı sağlayan etkenlerden olduğu sonucuna varılmıştır.

Tanı materyallerinde RT-nested PCR ile saptanan yerel BCoV'lardan seçilen bir kısmının (n=19) N gen dizinlerinin temini hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Bu virusların Gen Bankasında yeralan bazı dizinlerde kullanılarak hazırlanan nükleik asit ve amino asit dizinlerine dayalı filogenetik analiz incelendiğinde, birbirlerine oldukça yakın ilişkili olduğu ve yerel virusların kendi aralarındaki benzerlik oranlarının %96,98 - 100 olduğu görülmüştür. Viral replikasyon sırasında büyük miktarlarda ifade edilen, yüksek oranda korunmuş N proteinini kodlayan bu gen bölgesinin oldukça korunaklı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tanı materyallerinin

sağlandığı klinik olgunun niteliği, bireysel veriler (yaş, işletme, vb) ve saptanan yerel BCoV N gen dizinleri değerlendirildiğinde, enfeksiyonun patogeneze yönelik bir değerlendirme yapmanın olası olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte tanısı anlamda N gen temelli PCR tekniğinin duyarlı bir yöntem olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2011; Fernandes ve ark., 2018; Saif, 2010; Tsunemitsu ve ark., 1999). Bu bağlamda, bu çalışmada tanı materyalinde BCoV varlığını saptamak amacıyla duyarlı bir yöntem olması nedeniyle kullanılan N gen hedef alınarak yapılan RT-PCR ve takiben dizin analizi sonucunda elde edilen, N gen dizinleri ile de Gen Bankası verilerine bilimsel veri kazandırılmıştır.

Coronavirus S glikoproteini viral giriş ve patogeneze önem arz etmektedir. Bu nedenle doku tropizmi ve hatta coronavirusların konak aralığındaki değişiklikler büyük ölçüde S glikoproteinindeki varyasyonlara atfedilmiştir (Gallagher ve Buchmeier, 2001). Bu nedenle, solunum sistemi enfeksiyonu ve enterik enfeksiyonlarda sağlanan BCoV suşlarının biyolojik, antijenik ve genetik özelliklerini tanımlamak için kısmi ya da tam S gen sekanslarına dayanan çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Brandao ve ark., 2006; Decaro ve ark., 2008b; Hasoksuz ve ark., 2002; Kanno ve ark., 2007; Liu ve ark., 2006). Bu çalışmada her ne kadar farklı klinik olgularda coronavirusların yaygınlığı konusunda bilgiler edinilmiş ise de, farklı sistemlere (solunum ve sindirim sistemi) ilgili klinik bulgularına sahip hayvanlardan materyal teminindeki temel amaç, bildirilen sistemlerden orijin alan BCoV'ların kazanılması ve S gen bölgesi benzerlik/farklılıkları incelenerek, enfeksiyonun patogenezi ile S gen bölgesi arasındaki olası ilişkinin sorgulanmasıdır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar sonucunda, üç gaita (BCoV/Türkiye/4950/2015, BCoV/Türkiye/4945/2015, BCoV/Türkiye/U1/2014) ve iki nazal akıntı (BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/S8/2017) olmak üzere beş tanı materyalinde saptanan BCoV S gen bölgesi dizinleri tüm olarak elde edilmiştir. Bu beş örnek dışında altı örneğin (BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015, BCoV/Türkiye/H1/2013, BCoV/Türkiye/8553/2015, BCoV/Türkiye/79/2018, BCoV/Türkiye/1N/2019) kısmi BCoV S gen bölgesi dizinlerinin de elde edilebilmiş olması ve elde edilen kısmi dizinlerin bu noktada yapılabilecek değerlendirmelere olanak sağlıyor olması önemlidir. Çünkü kısmi dizinler kullanılarak, S gen bölgesi

tarafından kodlanan, virionun yüzeyinde taç yaprağı şeklinde çıkıntılar şeklinde olan S glikoprotein, iki alt ünitesinden (Abraham ve ark., 1990) birisi olan S1 (N terminus) alt ünitesine ait amino asit bilgileri elde edilebilmiştir. Bu bölge (S1 alt ünitesi), virusun konak hücre reseptörlerine bağlanmasında, nötralizan antikor sentezinin uyarılmasında, hemagglütinin aktivitesinden sorumludur (Kubo ve ark., 1994; Schultze ve ark., 1991; Yoo ve Dereg, 2001). Bu bölge mutasyona açıktır ve burada gerçekleşen mutasyonlar, antijenite ve viral patojenite değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir (Ballesteros ve ark., 1997). S proteininin diğer alt ünitesi olan S2 (C terminus) (Abraham ve ark., 1990) ise transmembran alt ünitesidir. Viral ve hücrel membranların füzyonunda aracılık etmektedir (Luo ve Weiss, 1998).

Çalışmada elde edilen BCoV S gen bölgesi kısmi/tüm dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaçlar ve amino asit benzerlik oranları incelendiğinde; yerel suşların kendi aralarında ve referans suşlar ile yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9), solunum ya da sindirim sistemi orijinli olmalarının filogenetik ağaç yerleşimi ve benzerlik oranlarında önemli bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte hem farklı sistemlerle ilgili enfeksiyon oluşumunda S gen bölgesinin rolünün daha detaylı incelenmesi hem de enfeksiyonla ilgili biyolojik ürünlerin tercihi ya da geliştirilmesi konusunda bilgi edinebilmek amacıyla, bu çalışmanın yerel virusları ve gen Bankasında dizinleri bulunan Türkiye ve farklı ülkelerde saptanan bazı BCoV asit dizinleri değerlendirilmiştir.

Bilindiği üzere enfeksiyon etkenlerinin doğada varlıklarını sürdürebilmesinde mutasyonlar önemli katkı sağlamaktadır. Virusun yapısında önemli bir farklılaşmaya neden olmayacak değişimlerin oluşumunun yanı sıra, türler arası geçişe bile neden olabilecek bazı mutasyonların oluşumu da mümkündür. Bu çalışmada yerel BCoV S gen amino asit dizinlerinde, çok sayıda değişiklik gözlenmiştir. Bununla birlikte referans suş Mebus kullanılarak hazırlanan değişim tablosunda (EK 2) görüleceği üzere, bu çalışmada saptanan yerel virusların ülkemizde daha önce bildirilen iki yerel virus (BCoV/Türkiye/AN4/2011 ve BCoV/Türkiye/AN11/2011) ve Gen Bankasında yer alan farklı ülkelerde saptanan BCoV'lara benzer şekilde bazı ısrarcı değişimlerinin olduğu görülmüştür.

Martinez ve ark. (2012), Brezilya’da solunum ve sindirim sistemi orijinli BCoV S gen bölgesi üzerine yaptıkları çalışmada, referans virus Mebus dizini (U00735) ile karşılaştırıldığında, 10 farklı amino asitteki değişiminin (M11T; K115D, K115N ya da K115G; H173N; K179Q ya da K179R; S510T; N531D; S543A; T578S; A769S; D1026G) solunum sistemi tropizmi ve bir amino asitin (L154F) değişiminin enterik sisteme tropizm açısından farklılık gösterdiğini ve bu değişimlerin farklı sistemlere duyarlılıkta önemli olabileceğini bildirmişlerdir. Şekil 3.10 incelendiğinde, bu çalışmada değerlendirilen gaita ya da nazal akıntı örneklerinde saptanan yerel virusların hiç birisinde Martinez ve ark. (2012), tarafından sindirim sistemine tropizm ile ilişkili olabileceği bildirilen L154F değişiminin ya da solunum sistemine tropizm ile ilişkili olabileceği bildirilen S510T, T578S ve A769S değişiminin olmadığı görülmüştür. Buna karşın bildirilen diğer amino asit değişimleri bu çalışmada saptanan yerel viruslarda da sıklıkla tanımlanmıştır (Şekil 3.10). Bu değişimler genel olarak değerlendirildiğinde, M11T değişiminin, dört gaita (BCoV/Türkiye/4945/2015, BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015) ve üç nazal akıntı (BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/S8/2017, BCoV/Türkiye/79/2018) orijinli yerel virusta; H173N değişimi beş gaita (BCoV/Türkiye/4950/2015, BCoV/Türkiye/4945/2015, BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015) ve üç nazal akıntı (BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/S8/2017, BCoV/Türkiye/79/2018) orijinli yerel virusta; S543A değişimi yedi gaita (BCoV/Türkiye/4950/2015, BCoV/Türkiye/4945/2015, BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015, BCoV/Türkiye/H1/2013, BCoV/Türkiye/8553/2015) ve üç nazal akıntı (BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/S8/2017, BCoV/Türkiye/79/2018) orijinli yerel virusta; D1026G değişimi beş gaita (BCoV/Türkiye/4950/2015, BCoV/Türkiye/4945/2015, BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015) ve iki nazal akıntı (BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/S8/2017) orijinli yerel virusta olduğu görülmüştür. Martinez ve ark. (2012), tarafından bildirilen diğer bazı amino asitlerdeki (K115N; K179Q ve N531D) değişimler yanısıra bazı farklı amino asit değişimleri de, solunum ya da sindirim sistemi orijinli bazı yerel viruslarda saptanmıştır.

Brezilya’da yapılan bir diğer çalışmada (Takiuchi ve ark., 2008) ise, Brezilya orijinli yerel BCoV’lardan elde edilen dizinlerin Mebus dizinleri ile karşılaştırılması sonrasında sadece üç amino asit değişimi (Q141L; S510I ve R767S) bildirilmiştir. Bu çalışmada gaita örneklerinden sadece birinde (BCoV/Turkiye/4945/2015) saptanan R767S değişimi hariç, bildirilen diğer değişimler görülmemiştir.

Lee ve ark. (2010), tarafından bildirilen bir diğer çalışmada, Kore orijinli BCoV’ların S geninin, Mebus ile karşılaştırıldığında 27 amino asitte değişim olduğu bildirilmiştir. Bu değişimlerden 21 tanesi (M11T; A33V; I40T; R88T; I100T; K115N ; L147F; H169N; H173N; K179Q; L248M; S253N; M256L; V465A; H470D; N499S; P501S; S543A; V965E; D1026G; H1241P), bildirilen her bir amino asit için 5-10 arasında değişen sayıda yerel virusta olmakta üzere, bu çalışmada kullanılan yerel viruslarda da saptanmıştır (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).

Gunn ve ark. (2015), da İrlanda suşlarının S gen bölgesi analizine dayanarak, Mebus suşuna göre, daha önce literatürde bildirilmemiş olan üç amino asit değişimini (P21L; P60S ve D149E) rapor etmişlerdir. Bildirilen değişimler bu çalışmada saptanan nazal akıntı ya da gaita orijinli hiçbir yerel BCoV’da saptanmamıştır.

Hasöksüz ve ark. (2002), tarafından bildirilen bir diğer çalışmada ise, Amerika’da gaita ve nazal akıntı örneklerinden saptanan BCoV’ların dizinleri Mebus dizini rehberliğinde incelendiğinde, birçok amino asit değişiminin olduğu görülmüştür. Bu değişimlerden S1 alt ünitesinin; H169N ve H173N değişimleri bu çalışmada belirlenen BCoV’lardan elde edilebilen sekiz dizinde de (BCoV/Turkiye/4950/2015, BCoV/Turkiye/4945/2015, BCoV/Turkiye/U1/2014, BCoV/Turkiye/G76/2015, BCoV/Turkiye/G83/2015, BCoV/Turkiye/T5/2018, BCoV/Turkiye/S8/2017, BCoV/Turkiye/79/2018) saptanırken, V465A; H470D; S484T; N499S ve P501S değişimlerinin yerel izolatlardan birisi hariç (BCoV/Turkiye/1N/2019) tümünde görüldüğü tespit edilmiştir. Bunların dışında araştırmacıların bildirdiği birçok değişimin (I40T, R88T, I100T, K115D, K179Q, L248M, S253N, M256L, F458S, N509T, N531D, S543A, Y571H, T778N) bu

çalışmadaki birçok yerel BCoV dizininde bulunduğu saptanmıştır. Hasöksüz ve ark. (2002), tarafından bildirilen I113V değişiminin ise bu çalışmada belirlenen bir örnekte (BCoV/Türkiye/T5/2018) I113T şeklinde; M118K değişiminin ise bu çalışmada belirlenen bir örnekte (BCoV/Türkiye/S8/2017) M118I şeklinde olduğu görülmüştür. Sözkonusu araştırmada bildirilen T49I, N146I, D148G, L154F, N175T, N204S, D225H, S365F, T447I, S510T, T578S, T716I, S743I, S754N, A769S değişimleri ise bu çalışmada S gen dizin bilgileri sağlanan virusların hiçbirisinde görülmemiştir.

Workman ve ark. (2019), 817 tane buzağıda solunum sistemi enfeksiyonları ile ilgili olarak nazal akıntı ve kan örnekleri üzerine çalışmışlardır. Çalışmada elde edilen 15 BCoV S1 çok değişken bölgesine ilgili amino asit dizinlerinde, Mebus dizininden farklı aminoasitlerin varlığını bildirmişlerdir. Bu değişimlerden yedisi (V465A, H470D, S484T, H525Y ve N531D, S543A, Y571H) bir BCoV (BCoV/Türkiye/1N/2019) haricinde tüm yerel BCoV'larda saptanırken, F458S değişimi, beş yerel virusta (BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015, BCoV/Türkiye/8553/2015, BCoV/Türkiye/T5/2018); P546S değişimini ise P546L şeklinde iki yerel virusta (BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015); N509T değişimi sekiz yerel virusta (BCoV/Türkiye/4950/2015, BCoV/Türkiye/4945/2015 BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015, BCoV/Türkiye/8553/2015, BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/79/2018) görülmüştür. Araştırmacıların bildirdiği diğer değişimler (A476V, D492G, S510T, T535I, T578S, L628F) ise, bu çalışmanın yerel viruslarında saptanmamıştır.

Bu çalışmada saptanan yerel virusların dizinleri, Türkiye'de daha önce yapılan bir çalışma (Alkan ve ark., 2011) kapsamında ishali buzağılardan saptanan ve S genin çok değişken bölgesi dizinleri gen bankasında yer alan iki yerel BCoV (BCoV/Türkiye/AN4/2011 ve BCoV/Türkiye/AN11/2011) dizini ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, bir nazal akıntı örneğinde saptanan BCoV (BCoV/Türkiye/IN/2019) dışındaki tüm virusların hem filogenetik ağaçtaki yerleşimleri hem de benzerlik oranlarının yüksek oluşu önemlidir. Bununla birlikte

BCoV/Türkiye/IN/2019 kodlu virusun referans virus Mebus ile aminoasit benzerlik düzeyi ve filogenetik ağaçtaki yerleşimi dikkat çekici bulunmuştur (Şekil 3.6; Şekil 3.7; Şekil 3.9). Bu çalışmanın diğer yerel viruslarının çok sayıda işletme, farklı yıllar ve farklı klinik olgulardan alınmış materyallerden elde edilmiş olmalarına rağmen, yüksek oranda benzerlik gösterdiğinin saptanmış olması, nazal akıntı orijinli söz konusu yerel suşun (BCoV/Türkiye/IN/2019) farklı gen bölgeleri dizinleri/ tüm dizinin elde edilmesi yönündeki çalışmalara düşünsel kaynak oluşturur niteliktedir. Bu durumun olası nedenlerinden birisinin, örneklemeden kısa bir süre önce aşı uygulaması olabileceği düşünülebilirse de, bu konuda bilgi edinilemediğinden herhangi bir değerlendirme yapmak mümkün olamamıştır.

BCoV'ların sindirim ya da solunum sisteminde oluşturdukları enfeksiyonlara ilgili çalışmalar sıklıkla bu olgulardan saptanan virusların analizi üzerinedir (Alkan ve ark., 2011; Hasöksüz ve ark., 2002; Martinez ve ark., 2012). Bu durum virusun farklı sistemlere tropizminin değerlendirilmesinde bazı soru işaretlerine yol açmakta olup, deneysel çalışmalar ile de konu sorgulanmaktadır. Park ve ark. (2007a), kış dizanterisi geçirmekte olan yetişkin sığırın gaitasından HRT-18 hücre hattında altı defa pasajı takiben izole edilen kış dizanteri suşunu (KWD3) oral yolla verdikleri bir buzağının hem sindirim sisteminin hem de solunum sisteminin coronavirustan etkilendiğini bildirmişlerdir. Beuttemmuller ve ark. (2017), ise son yıllarda Brezilya'da elde edilen yerel suşlarının genetik farklılıklarını dikkate alarak, Güney Amerika'da BCoV'unun enterik suşlarının yaygın olarak görülmesi ve respiratorik suşlarla olan ilişkisini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, Güney Brezilya'daki bir besi çiftliğinde ortaya çıkan solunum sistemi enfeksiyonu salgınından elde edilen respiratorik suş olan BR UEL11'i (KP208779) kullanmışlardır. Bu virusun (BR UEL11) S gen dizinleri ile Gen Bankasından temin ettikleri Mebus, NVSL, LY138, LYVB gibi referans virusların yanı sıra başka BCoV virusları ile nükleik asit benzerlik oranları karşılaştırıldığında, BR UEL11 virusunun ata viruslar olan referans viruslardan farklılaştığını ve bu farklılaşma esnasında sindirim sisteminin yanı sıra solunum sistemini de etkileyebilen virusa dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan yerel virusların filogenetik analizi, nükleik asit, amino asit benzerlik oranları ve amino asit dizinleri incelendiğinde, ülkemizdeki BCoV'ların en azından S gen bölgesi bakımından çok önemli bir değişime işaret etmediği ve yerel suşların hem solunum hem de sindirim sistemi enfeksiyonu oluşturma potansiyelleri bakımından muhtemelen oldukça benzer risk oluşturdıkları sonucuna varılmıştır. Daha çok sayıda yerel virüs kullanılarak, S gen yanısıra farklı gen bölgeler (özellikle HE) ve –hatta tüm gen analizi- üzerine yapılacak çalışmalar bu noktada değer taşıyacaktır.

Coronavirüsler büyük RNA genoma sahiptir ve quasispecies olarak bulunur. Bu durum coronaviruslarda adaptif mutasyon ve türler arası geçiş ihtimalini arttırmakta olup (Alekseev ve ark., 2008; Hasöksüz ve ark., 2007), özellikle de SARS salgını, coronavirus biyolojik çeşitliliği ve genomik araştırmalara olan ilgiyi arttırmıştır. Nitekim 2003 yılından önce, tüm genomun elde edildiği sadece 10 coronavirus literatür bilgisi bulunmaktayken, SARS salgınından sonra farklı türlere ait birçok tüm genom coronavirus dizini Gen Bankasına eklenmiştir. Bunlar arasında iki insan coronavirusu (NL63 ve HKU1), farklı memeli hayvan türlerine ait coronaviruslar [(yarasa SARS coronavirus, yarasa coronavirus HKU2, HK4, HKU5, HKU8, HKU9, 512/2005 ve 1A), at coronavirusu ve beluga balina coronavirusu] ve kanatlı coronavirusları (hindi coronavirus, bülbül coronavirus HKU11, pamukçuk coronavirus HKU12 ve munia coronavirus HKU13) bulunmaktadır. RNA bağımlı RNA polimerazın dublikasyonu, yüksek homolog RNA rekombinasyon sıklığının ve coronavirusların büyük genomlarının bir sonucu olarak ortaya çıkan coronavirusların çeşitliliğinin, artan sayıda coronavirusla birlikte, türler arası geçişler sonucunda zoonotik hastalıklara (SARS, MERS coronavirus enfeksiyonu) neden olarak felaketlerle sonuçlanabileceği gözlenmiştir (Woo ve ark., 2009). 2002'den 2010'a kadar İsveç ve Danimarka'da meydana gelen salgınlar sırasında süt ve besi çiftliklerinden toplanan 33 BCoV suşunun S geni üzerine yapılan analiz sonucunda; elde edilen suşların İtalyan BCoV suşları ile birlikte bir dal oluşturduğu ve insan enterik coronavirus HECV 4408/US/94 suşu ile oldukça benzer olduğu bildirilmiştir. BCoV, köpek solunum coronavirus ve insan coronavirus OC43 arasında yüksek bir benzerlik gözlenmiştir. BCoV ile köpek solunum coronavirus viruslarının 1951'de,

BCoV ve insan coronavirus OC43 viruslarının 1899'da ortak ataları olan viruslardan ayrıldıkları tahmin edilmektedir (Bidokhti ve ark., 2013). Brandao ve ark. (2006), Brezilya BCoV suşlarının 526.,527.,528.,529.,530. ve 531. amino asitlerinin delesyona uğramış hali ile insan coronavirusu OC43 suşunun aynı olduğunu; altı amino asidin delesyonu ile zoonotik önem kazanmasının oldukça dikkat çekici olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmadan elde edilen yerel BCoV dizinlerinde (EK 2) herhangi bir insersiyon ya da delesyon saptanmamıştır.

Enfeksiyonlardan korunmada aşılama önemli yer tutmaktadır. Buzağı ishallerinden korunma amacıyla diğer bazı enterik ajanlar yanı sıra BCoV'a karşı da korunma sağlamayı hedefleyen ticari aşılar bulunmaktadır. Türkiye'de de özellikle süt sığırı yetiştiriciliği işletmelerinde yeni doğan buzağuları maternal antikorlar aracılığıyla korumayı hedefleyen, BCoV referans virusu Mebus içeren aşılar yaygın olarak kullanılmaktadır. Aşı başarısını etkileyen faktörler içinde aşı suşu ve yerel suşlar arasındaki antijenik yakınlık düzeyi en önemli faktörlerdendir. Antijenik farklılığın artması serotip farklılıkları, spontan mutasyonlar sonucu oluşan varyasyonlar, vb. nedeniyle oluşabilmektedir. Nitekim Yoo ve Deregt (2001) tek bir amino asit değişikliğinin (A528V) BCoV'un nötralizasyona karşı direnç geliştirmesine sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada yerel BCoV'ların hiç birisinde, söz konusu araştırmacılar tarafından bildirilen değişim (A528V) görülmemiştir. Yerel virusların antijenik domain de oluşan bazı amino asit değişimlerinin bir direnç gelişimine neden olup olmayacağı da bilinmemektedir. Bununla birlikte bugüne dek yapılan çalışmalar ve Veteriner hekimler ile kişisel görüşmelerimizdeki bildirimlere dayanılarak, Türkiye'de ticari olarak var olan aşılardan enfeksiyondan korunmada kullanılabileceği, bununla birlikte yerel suşları ile söz konusu aşılara ait suşlarının antijenik yakınlıklarının sorgulanması yönündeki çalışmaların, diğer bir çok etiyolojik ajan için de olduğu gibi, sürdürülmesine ihtiyaç duyulduğu kanaatine varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında; farklı illerde (Ankara, Denizli, Erzurum, İzmir, Tokat, Hatay) yetiştirilen ve coronavirus klinik bulguları gösteren 119 hayvandan alınan materyaller (41 gaita ve 78 nazal akıntı) kullanılmıştır. BCoV, solunum ve sindirim sistemleri enfeksiyonlarıyla seyrederek sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışma ile BCoV'un S glikoproteini kodlayan genin kısmi analizi (S1 gen bölgesi) / tüm analizi yapılarak S gen identifikasyonu; S genin değişken bölgesi dizinlerinin belirlenmesi; mutasyonların sorgulanması ve Gen Bankasında yer alan farklı ülkelerin izolatları / aşı suşları ile karşılaştırılmalı filogenetik analizinin yapılması, nükleik asit ve amino asit benzerliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda yapılan tez çalışmasında elde edilen verilere dayanılarak;

1. BCoV varlığının tespit edilmesi amacıyla N gen bölgesini hedef alan RT-PCR ile 119 örneğin 35'i (9 gaita, 26 nazal akıntı) pozitif olarak belirlenmiştir.
2. BCoV varlığı saptanan 35 BCoV S gen bölgesinin çoğaltılmasına yönelik RT-PCR'lar sonucunda elde edilen beklenen büyüklüklerdeki ampliconlar kullanılarak, hizmet alımı yoluyla dizin bilgileri edinilmiştir.
3. Dizin analizi sonucunda tüm S geni elde edilmiş beş örneğin dizini, kendi aralarında ve sırasıyla gaita ve nazal akıntı orijinli referans viruslar olan Mebus ve LSU ile nükleik asit benzerlik yönünden incelenmiştir. Yerel virusların Mebus için %96,92 - 97,58 oranlarında, LSU ile ise %97,33 - 97,99 oranlarında benzerliği görülmüştür. Yerel virusların kendi aralarında benzerlik oranları %97,48 - 99,04 olarak saptanmıştır. Gaita orijinli ve nazal akıntı orijinli yerel viruslar arasındaki benzerlik oranları sırasıyla %97,65 - 99,04 ve %97,89 olarak belirlenmiştir.
4. S1 adlı primerler kullanılarak elde edilen 11 örneğin (BCoV/Türkiye/4950/2015, BCoV/Türkiye/4945/2015, BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015, BCoV/Türkiye/H1/2013, BCoV/Türkiye/8553/2015, BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/S8/2017, BCoV/Türkiye/79/2018, BCoV/Türkiye/1N/2019) dizinleri kendi aralarında ve sırasıyla gaita ve nazal akıntı orijinli referans viruslar olan Mebus ve LSU ile nükleik asit benzerlik

yönünden incelenmiştir. Yerel virusların Mebus ile %94,78 - 99,11 oranlarında, LSU ile ise %96,23 - 97,72 oranlarında benzerliği görülmüştür. Yerel virusların kendi aralarında benzerlik oranları %90,92 - 100 olarak saptanmıştır. Gaita orijinli ve nazal akıntı orijinli yerel viruslar arasındaki benzerlik oranları sırasıyla %90,92 - 100 ve %95,13 - 98,75 olarak belirlenmiştir.

5. Ülkemizde daha önce saptanan iki BCoV (BCoV/TürkiyeAN4/2011 ve BCoV/Türkiye/AN11/2011) kısmi S gen bölgesi ile bu çalışmada S1 primerleriyle elde edilen 11 örneğin (BCoV/Türkiye/4950/2015, BCoV/Türkiye/4945/2015, BCoV/Türkiye/U1/2014, BCoV/Türkiye/G76/2015, BCoV/Türkiye/G83/2015, BCoV/Türkiye/H1/2013, BCoV/Türkiye/8553/2015, BCoV/Türkiye/T5/2018, BCoV/Türkiye/S8/2017, BCoV/Türkiye/79/2018, BCoV/Türkiye/1N/2019) nükleik asit benzerliği incelendiğinde, BCoV/Türkiye/AN4/2011 ile %90,64 - 97,1 ve BCoV/Türkiye/AN11/2011 ile %95,57 - 98,14 oranında benzerlikleri olduğu tespit edilmiştir.
6. Yerel virusların S gen amino asit verileri incelendiğinde, farklı araştırmalarda sindirim ya da solunum sistemi tropizmine yol açtığı bildirilen bazı amino asit değişimleri yanısıra ısrarcı amino asit değişimlerinin de olduğu görülmüştür. Bununla birlikte bu değişimlerin, yerel virusların farklı sistemlerde (solunum ya da sindirim) enfeksiyon oluşturmadaki olası rollerinin değerlendirilmesi için ileri araştırmaların (deneysel çalışma,vb) gerekli olduğu kanaatine varıldı.
7. BCoV nedenli ekonomik kayıpların boyutu, zoonotik potansiyeli, vb. dikkate alınarak, bilimsel verilerin elde edilmesi ve bu veriler kullanılarak özellikle aşı kullanımını içeren kontrol çalışmalarının yapılabilmesi için, prevalans çalışmaları yanı sıra moleküler analiz çalışmalarının geniş örneklem kullanılarak sürdürülmesine ihtiyaç duyulduğu kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Sığır Coronavirusların S Gen Bölgesi Moleküler Analizi

Bu çalışmada; farklı illerde (Ankara, Denizli, Burdur, Erzurum, İzmir, Tokat, Hatay) yerleşik sığır yetiştiriciliği işletmelerinde bulunan, solunum ya da sindirim sistemi enfeksiyonu klinik bulgularını gösteren 119 buzağı/erişkin sığırdan sağlanan tanı materyalleri (41 gaita ve 78 nazal akıntı) BCoV varlığı yönünden sorgulanmış; ardından saptanan yerel BCoV'ların (n=11) S glikoproteini kodlayan genin kısmi analizi (S1 gen bölgesi) / tüm analizi yapılmıştır. Elde edilen nükleik asit ve amino asit dizinleri, klinik materyalin türü ve yerel viruslarda saptanan mutasyonlar incelenerek, S genin farklı sistemlere tropizm oluşumundaki olası önemi üzerine değerlendirmeler yapılmıştır.

N gen bölgesine yönelik RT-Nested PCR yöntemi ile test edilen örneklerden, 35'i (9 gaita ve 26 nazal akıntı) BCoV yönünden pozitif bulunmuştur. Bu yerel virusların (n=35) tüm S gen bölgesinin elde edilmesini hedefleyen RT-PCR'lar sonrasında, 11 örnek için yerel BCoV kısmi/tüm S gen bölgesi dizinleri elde edilmiştir. Bu dizinlerin Türkiye'de daha önce bildirilen dizinler, farklı ülkelerde saptanan BCoV suşları ve referans viruslar (enterik orijinli Mebus ve solunum sistemi orijinli LSU) ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada buzağı ishallerdeki önemi iyi bilinen BCoV'ların solunum sistemi enfeksiyonlarına da önemli oranla katılımının olduğu, yerel suşların pek çok farklı amino asit değişimi göstermelerine karşın önemli ölçüde birbirine benzer olduğu, nazal akıntı yada gaita orijinli bazı yerel viruslarda ısrarcı değişimlerin varlığı tespit edildi. Farklı sistemlere tropizm yönünden yerel BCoV S gen bölgesi amino asit dizinleri incelendiğinde, literatürde daha önce tropizm ile ilişkilendirilen bazı değişimlerin bir kısmının yerel viruslarda da bulunduğu görüldü. Bu çalışmada Türkiye'de BCoV S gen bölgesinin tüm gen analizinin bildirildiği ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: Bovine Coronavirus, Filogenetik Analiz, Moleküler Karakterizasyon, Nested-RT-PCR, S Gen.

SUMMARY

Molecular Analysis of S gene of Bovine Coronaviruses

In this study; diagnostic materials collected from the breeding establishments located in different provinces (Ankara, Denizli, Burdur, Erzurum, Izmir, Tokat, Hatay). 119 calves and adult cattle were sampled (41 feces and 78 nasal discharge) which presents clinical findings of respiratory or digestive tract infection for the BCoV existence. After detection of the local BCoVs (n=11), partial analysis (S1 gene region) / whole analysis of the gene encoding the S glycoprotein. With the obtained nucleic acid and amino acid sequences, the type of clinical material and mutations detected in local viruses were examined and evaluations were made on the possible importance of S gene in the formation of tropism in different systems.

Samples tested for the N gene region by RT-Nested PCR method, 35 (9 feces and 26 nasal discharge) were positive for BCoV. After RT-PCRs aimed to acquire the whole S gene region of these local viruses (n=35), partial / whole S gene region sequences were obtained for 11 samples. These sequences investigated and compared with the previously reported BCoV strains in Turkey and different countries and reference viruses (enteric origin Mebus and respiratory system origin LSU).

In conclusion, it was determined that BCoVs, which are well known for their importance in calf diarrhea, also had a significant contribution to respiratory system infections, although local strains showed many different amino acid changes those are significantly similar to each other, and there were persistent changes in some local viruses of nasal discharge or feces origin. When the local BCoV S gene region amino acid sequences were examined in terms of tropism in different systems, some of the previously reported tropism-related changes were found in local viruses. This study is the very first for the BCoV whole S gene analyzes reported in Turkey.

Keywords: Bovine Coronavirus, Molecular Characterization, Nested-RT-PCR, Phylogenetic Analysis, S Gene.

KAYNAKLAR

- ABRAHAM S, KIENZLE TE, LAPPS W, BRIAN DA (1990). Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology*. **176(1)**: 296-301.
- AL M, BALIKÇI E (2012). Neonatal ishali buzağlarda rotavirus, coronavirus, E. coli K99 ve Cryptosporidium parvum'un hızlı test kitleri ile teşhisi ve enteropatojen ile maternal immünite ilişkisi. *Fırat Üniv. Sağ. Bil. Vet. Derg.* **26(2)**: 73-78.
- ALEKSEEV KP, VLASOVA AN, JUNG K, HASÖKSÜZ M, ZHANG X, HALPIN R, WANG S, GHEDIN E, SPIRO D, SAIF LJ (2008). Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *J. Virol.* **82(24)**: 12422-12431.
- ALKAN F (1998). Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* **45**: 29-37.
- ALKAN F, ÖZKUL A, BİLGE-DAĞALP S, KARAOĞLU T, OĞUZOĞLU TC, ÇALIŞKAN E, BURGU İ (2011). The Detection and Genetic Characterization Based on the S1 Gene Region of BCoV from Respiratory and Enteric Infections in Turkey. *Transbound. Emerg. Dis.* **58(2)**: 179-185.
- ANTHONY SJ, JOHNSON CK, GREIG DJ, KRAMER S, CHE X, WELLS H, HICKS AL, JOLY DO, WOLFE ND, DASZAK P, KARESH W, LIPKIN WI, MORSE SS, PREDICT CONSORTIUM, MAZET JAK, GOLSTEIN T (2017). Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evol.* **3(1)**: 1-15.
- ARAKI K, GANGAPPA S, DILLEHAY DL, ROUSE BT, LARSEN CP, AHMED R (2010). Pathogenic virus-specific T cells cause disease during treatment with the calcineurin inhibitor FK506: implications for transplantation. *J. Exp. Med.* **207(11)**: 2355-2367.
- BALLESTEROS ML, SANCHEZ CM, ENJUANES L (1997). Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropizm. *Virology* **227**: 378-388.
- BARANOV PV, HENDERSON CM, ANDERSON CB, GESTELAND RF, ATKINS JF, HOWARD MT (2005). Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology*. **332(2)**: 498-510.
- BELOUZARD S, MILLET JK, LICITRA BN, WHITTAKER GR (2012). Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses*. **4(6)**: 1011-1033.
- BENFIELD DA, SAIF LJ (1990). Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J. Clin. Microbiol.* **28(6)**: 1454-1457.
- BENIAC DR, ANDONOV A, GRUDESKI E, BOOTH TF (2006). Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13(8)**: 751-752.

- BENTLEY K, KEEP SM, ARMESTO M, BRITTON P (2013). Identification of a noncanonically transcribed subgenomic mRNA of infectious bronchitis virus and other gammacoronaviruses. *J. Virol.* **87(4)**: 2128-2136.
- BEUTTEMULLER EA, ALFIERI AF, HEADLEY SA, ALFIERI AA (2017). Brazilian strain of bovine respiratory coronavirus is derived from dual enteric and respiratory tropizm. *Genet. Mol. Res.* **16(2)**: 1-7.
- BIDOKHTI MR, TRAVEN M, KRISHNA NK, MUNIR M, BELAK S, ALENIUS S, CORTEY M (2013). Evolutionary dynamics of bovine coronaviruses: natural selection pattern of the spike gene implies adaptive evolution of the strains. *J. Gen. Virol.* **94(9)**: 2036-2049.
- BOILEAU MJ, KAPIL S (2010). Bovine coronavirus associated syndromes. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **26(1)**: 123-146.
- BOIREAU P, CRUCIERE C, LAPORTE J (1990). Nucleotide sequence of the glycoprotein S gene of bovine enteric coronavirus and comparison with the S proteins of two mouse hepatitis virus strains. *J. Gen. Virol.* **71(2)**: 487-492.
- BOK M, ALASSIA M, FRANK F, VEGA CG, WIGDOROVITZ A, PARRENO V (2018). Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **50(1)**: 23-30.
- BOS EC, LUYTJES W, VAN DER MEULEN HV, KOERTEN HK, SPAAN WJM (1996). The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology.* **218**: 52-60.
- BRANDAO PE, GREGORI F, RICHTZENHAIN LJ, ROSALES CAR, VILLARREAL LYB, JEREZ JA (2006). Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. *Arch Virol* **151**: 1735-1748.
- BRIAN DA, BARIC RS (2005). Coronavirus Genome Structure And Replication. ENJUANES L. *Springer*. P: 1-30.
- BRIERLEY I, DIGARD P, INGLIS SC (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell.* **57(4)**: 537-547.
- BULGIN MS, WARD ACS, BARRETT DP, LANE VM (1989). Detection of rotavirus and coronavirus shedding in two beef cow herds in Idaho. *Can. Vet. J.* **30(3)**: 235-239.
- BYUKUSENGE M, NISSLY RH, KASIBHATLA SM, LI L, RUSSELL R, SPRINGER H, BARRY R, SAUN R, WOLFGANG D, HOVINGH E, KULKARNI-KALE U, KUCHIPUDI SV (2018). Complete Genome Sequences of Four Bovine Coronavirus Isolates from Pennsylvania. *Genome Announc.* **6(22)**: e00467-18.
- CABI (2019). Invasive Species Compendium. Erişim Adresi: [<https://www.cabi.org/isc/data-sheet/91704#3905043A-3AA9-4017-B8E8AC3C5484A3C8>]. Erişim Tarihi: 28/03/2019.

- CHANG CK, SUE SC, YU TH, HSIEH CM, TSAI CK, CHIANG YC, LEE SJ, HSIAO HH, WU WJ, CHANG WL, LIN CH, HUANG TH (2006). Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J. Biomed. Sci.* **13(1)**: 59-72.
- CHO KO, HASÖKSÜZ M, NIELSEN PR, CHANG KO, LATHROP S, SAIF LJ (2001). Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch. Virol.* **146**: 2401-2419.
- CHOULJENKO VN, KOUSOULAS KG, LIN X, STORZ J (1998). Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. *Virus Genes* **17(1)**: 33-42.
- CHOULJENKO VN, LIN XQ, STORZ J, KOUSOULAS KG, GORBALENYA AE (2001). Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. *J. Gen. Virol.* **82(12)**: 2927-2933.
- CLARK MA (1993). Bovine coronavirus. *Br. Vet. J.* **149(1)**: 51-70.
- COLLINS JK, RIEGEL CA, OLSON JD, FOUNTAIN A (1987). Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. *Am. J. Vet. Res.* **48(3)**: 361-365.
- CORNELISSEN LA, WIERDA CM, VAN DER MEER FJ, HERREWEGH AA, HORZINEK MC, EGBERINK HF, DE GROOT RJ (1997). Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus. *J. Virol.* **71(7)**: 5277-5286.
- CROUCH CF, BIELEFELDT OHMANN H, WATTS TC, BABIUK LA (1985). Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. *J. Gen. Virol.* **66**: 1489-1500.
- CROUCH CF, OLIVER S, HEARLE DC, BUCKLEY A, CHAPMAN AJ, FRANCIS MJ (2001). Lactogenic immunity following vaccination of cattle with bovine coronavirus. *Vaccine.* **19(2-3)**: 189-196.
- ÇABALAR M, KAYA A, ARSLAN S (2007). Yeni doğan buzağların ishal olgularında rotavirus ve coronavirus araştırılması. *Vet. Bil. Derg.* **23(3-4)**: 103-106.
- DE GROOT RJ, LUYTJES W, HORZINEK MC, VAN DER ZEIJST BA, SPAAN WJ, LENSTRA JA (1987). Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J. Mol. Biol.* **196(4)**: 963-966.
- DE HAAN CA, ROTTIER PJ (2005). Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **64**: 165-230.
- DECARO N, ELIA G, CAMPOLO M, DESARIO C, MARI V, RADOGNA A, COLAIANNI ML, CIRONE F, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C (2008a). Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based realtime RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* **151**: 167-171.

- DECARO N, MARI V, DESARIO C, CAMPOLO M, ELIA G, MARTELLA V, GRECO G, CIRONE F, COLAIANNI ML, CORDIOLI P, BUONAVOGLIA C (2008b). Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet. Microbiol.* **126(1-3)**: 30-39.
- DELMAS B, LAUDE H (1990). Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol* **64(11)**: 5367-5375.
- ERDOĞAN HM, ÜNVER A, GÜNEŞ V, ÇİTİL M (2003). Frequency of rotavirus and coronavirus in neonatal calves in Kars district. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **9(1)**: 65-68.
- ERLES K, SHIU KB, BROWNLIE J (2007). Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus. *Virus Res.* **124(1-2)**: 78-87.
- FEHR AR, PERLMAN S (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* **1282**: 1-23.
- FERNANDES AM, BRANDAO PE, LIMA MS, MARTINS MSN, SILVA TG, PINTO VSC, PAULA LT, VICENTE MES, OKUDA LH, PITUCO EM (2018). Genetic diversity of BCoV in Brazilian cattle herds. *Vet. Med. Sci.* **4**: 183-189.
- FHO (2019). Farm Health Online. Erişim Adresi: [<https://www.farmhealthonline.com/US/disease-management/cattle-diseases/rotavirus-andcoronavirus/>]. Erişim Tarihi: 28/03/2019.
- FULTON RW, RIDPATH JF, BURGE LJ (2013). Bovine coronaviruses from the respiratory tract: antigenic and genetic diversity. *Vaccine.* **31(6)**: 886-892.
- GALLAGHER TM, BUCHMEIER MJ (2001). Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology.* **279**: 371-374.
- GELINAS AM, BOUTIN M, SASSEVILLE AM, DEA S (2001). Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. *Virus Res.* **76(1)**: 43-57.
- GODET M, L'HARIDON R, VAUTHEROT JF, LAUDE H (1992). TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology.* **188(2)**: 666-675.
- GUNN L, COLLINS PJ, O'CONNELL MJ, O'SHEA H (2015). Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Ir. Vet. J.* **68(31)**: 1-7.
- GÜL Y (1999). Yeni doğan buzağlarda ishal ile seyreden enfeksiyöz hastalıklar. *Veteriner.* 48-54.
- GÜMÜŞOVA SO, YAZICI Z, ALBAYRAK H, MERAL Y (2007). Rotavirus and coronavirus prevalence in healthy calves and calves with diarrhea. *Medycyna Wet.* **63**: 62-64.
- HAN MG, CHEON DS, ZHANG X, SAIF LJ (2006). Cross-protection against a human enteric coronavirus and a virulent bovine enteric coronavirus in gnotobiotic calves. *J. Virol.* **80(24)**: 12350-12356.

- HANSA A, RAI RB, WANI MY, DHAMA K (2012). Pathology and diagnosis of corona virus infection in bovine. *Indian J. Vet. Pathol.* **36(2)**: 129-135.
- HASIRCIOĞLU S (2005). Buzağlarda enterik BCoV enfeksiyonlarının araştırılması ve epidemiyolojide klinik olarak sağlıklı sığırların rolü. Erişim Adresi: [http://acikerisim.selcuk.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5050/163292.pdf?sequence=1&isAllowed=y]. Erişim Tarihi: 31/03/2019.
- HASÖKSÜZ M, ALEKSEEV K, VLASOVA A, ZHANG X, SPIRO D, HALPIN R, WANG S, GHEDIN E, SAIF LJ (2007). Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *J. Virol.* **81(10)**: 4981-4990.
- HASÖKSÜZ M, KAYAR A, DODURKA T, ILGAZ A (2005). Detection Of Respiratory And Enteric Shedding Of Bovine Coronaviruses In Cattle In Northwestern Turkey. *Acta Vet. Hung.* **53**: 137-146.
- HASÖKSÜZ M, SREEVATSAN S, CHO KO, HOET AE, SAIF LJ (2002). Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Res.* **84**: 101-109.
- HASÖKSÜZ M, VLASOVA A, SAIF LJ (2008). Detection of group 2a coronaviruses with emphasis on bovine and wild ruminant strains. Virus isolation and detection of antibody, antigen, and nucleic acid. *Methods Mol. Biol.* **454**: 43-59.
- HECKERT RA, SAIF LJ, MYERS GW, AGNES AG (1991). Epidemiologic factors and isotype-specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. *Am. J. Vet. Res.* **52(6)**: 845-851.
- HUANG C, LOKUGAMAGE KG, ROZOVICS JM, NARAYANAN K, SEMLER BL, MAKINO S (2011). Alphacoronavirus transmissible gastroenteritis virus nsp1 protein suppresses protein translation in mammalian cells and in cell-free HeLa cell extracts but not in rabbit reticulocyte lysate. *J. Virol.* 2011; **85(1)**: 638-643.
- HURST KR, KOETZNER CA, MASTERS PS (2009). Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *J. Virol.* **83(14)**: 7221-7234.
- ICTV (2016). International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim Adresi: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/]. Erişim Tarihi: 05/06/2018.
- IKEMORI Y, OHTA M, UMEDA K, ICATLO FC JR, KUROKI M, YOKOYAMA H, KODAMA Y (1997). Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet. Microbiol.* **58(2-4)**: 105-111.
- JEONG JH, KIM GY, YOON SS, PARK SJ, KIM YJ, SUNG CM, SHIN SS, LEE BJ, KANG MI, PARK NY, KOH HB, CHO KO (2005). Molecular analysis of S gene of spike glycoprotein of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. *Virus Res.* **108(1-2)**: 207-212.
- JEREZ JA, GREGORI F, BRANDAO PE, RODRIGUEZ CAR, ITO FM, BUZINARO MDG, SAKAI T (2005). Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in monolayers of HmLu-1 cells. *Braz. J. Microbiol.* **36(3)**: 207-210.

- KAMITANI W, HUANG C, NARAYANAN K, LOKUGAMAGE KG, MAKINO S (2009). A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16(11)**: 1134-1140.
- KAMITANI W, NARAYANAN K, HUANG C, LOKUGAMAGE K, IKEGAMI T, ITO N, KUBO H, MAKINO S (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103(34)**: 12885-12890.
- KANNO T, HATAMA S, ISHIHARA R, UCHIDA I (2007). Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* **88(4)**: 1218-1224.
- KAPIL S, TRENT AM, GOYAL SM (1990). Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Arch. of Virol.* **115(1-2)**: 127-132.
- KAYA U, COŞKUN A (2018). Tokat Bölgesindeki Neonatal Buzağı İshallerinin Etiyolojisinin Belirlenmesi. *Manas J. Agr. Vet. Life Sci.* **8(1)**: 75-80.
- KIM Y, SON K, KIM YS, LEE SY, JHEONG W, OEM JK (2019) Complete genome analysis of a SARS-like bat coronavirus identified in the Republic of Korea. *Virus Genes* :1-5.
- KIN N, GUERARD P, DIANCOURT L, CARO V, VABRET A, GOUILH MA (2017). First complete genome sequence of a French bovine coronavirus strain. *Genome Announc.* **5(21)**: e00319-17.
- KIN N, MISZCZAK F, DIANCOURT L, CARO V, MOUTOU F, VABRET A, GOUILH MA (2016). Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. *Infect. Genet. Evol.* **40**: 186-191.
- KLAUSEGGER A, STROBL B, REGL G, KASER A, LUYTJES W, VLASAK R (1999). Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus. *J. Virol.* **73(5)**: 3737-3743.
- KOHARA J, HIRAI T, MORI K, ISHIZAKI H, TSUNEMITSU H (1997). Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.* **59(11)**: 1023-1025.
- KOZAT S, TUNCAY İ (2018). Prevalance of Rotavirus, Coronavirus, Cryptosporidium spp., Escherichia coli K 99, and Giardia lamblia pathogens in neonatal calves with diarrheic in Siirt Region. *Van Vet. J.* **29(1)**: 17-22.
- KRIJNSE-LOCKER J, ERICSSON M, ROTTIER PJM, GRIFFITHS G (1994). Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: Evidence that transport from the RER to the golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell Biol.* **124**: 55-70.
- KUBO H, YAMADA YK, TAGUCHI F (1994). Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* **68(9)**: 5403-5410.

- LAI MMC (1990). Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 303-333.
- LARSSON A (2014). Aliview: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* **30**: 3276-3278.
- LEE G, SONG JY, CHO IS, YOON S (2010). Cross-reactivity of Vaccine and Fields Strains of Bovine Coronaviruses in Korea. *J. Bacteriol. Virol.* **40(1)**: 49-58.
- LIN XQ, OE KL, STORZ J, PURDY CW, LOAN RW (2000). Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. *Arch. Virol.* **145**:2335-2349.
- LISSENBERG A, VROLIJK MM, VAN VLIET AL, LANGEREIS MA, DE GROOT-MIJNES JD, ROTTIER PJ, DE GROOT RJ (2005). Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *J Virol.* **79(24)**: 15054-15063.
- LIU DX, YUAN Q, LIAO Y (2007). Coronavirus envelope protein: A small membrane protein with multiple functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **64(16)**: 2043-2048.
- LIU L, HAGGLUND S, HAKHVERDYAN M, ALENIUS S, LARSEN LE, BELAK S (2006). Molecular Epidemiology of Bovine Coronavirus on the Basis of Comparative Analyses of the S Gene. *J. Clin. Microbiol.* **44(3)**: 957-960.
- LUO Z, WEISS S (1998). Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. *Virology* **244**: 483-494.
- LUYTJES W, STURMAN LS, BREDENBEEK PJ, CHARITE J, VAN DER ZEIJST BA, HORZINEK MC, SPAAN WJ (1987). Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. *Virology.* **161(2)**: 479-487.
- MACLACHLAN NJ, DUBOVI EJ (2017). *Fenner's Veterinary Virology*. FENNER F. 5th Ed. Elsevier. P.: 79-444.
- MARTINEZ N, BRANDAO PE, SOUZA SP, BARRERA M, SANTANA N, ARCE HD, PEREZ LJ (2012). Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. *Infect. Genet. Evol.* **12**: 1870-1878.
- MASTERS PS, PERLMAN S (2013). *Fields Virology*. 6th Ed. KNIPE DM, HOWLEY PM. Lippincott Williams & Wilkins. P.: 825-858.
- MEBUS CA, STAIR EL, RHODES MB, TWIEHAUS MJ (1973). Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Vet. Pathol.* **10(1)**: 45-64.
- MEBUS CA, WHITE RG, STAIR EL, RHODES MB, TWIEHAUS MJ (1972). Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **67**: 173-178.

- MILLET JK, WHITTAKER GR (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* **202**: 120-134.
- MURPHY FA, GIBBS EPJ, HORZINEK MC, STUDDERT MJ (1999). *Veterinary Virology*. 3th Ed. Elsevier. P: 495-508.
- NIETO-TORRES JL, DEDIEGO ML, VERDÍA-BAGUENA C, JIMENEZ-GUARDENO JM, REGLA-NAVA JA, FERNANDEZ-DELGADO R, CASTANO-RODRIGUEZ C, ALCARAZ A, TORRES J, AGUILELLA VM, ENJUANES L (2014). Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10(5)**: 1004077.
- OHLSON A (2010). Bovine Coronavirus and Bovine Respiratory Syncytial Virus Infections in Dairy Herds, Prospects for Control. *Acta Uni. Agric. Suec.* **51**: 1-60.
- OMA VS, TRAVEN M, ALENÍUS S, MYRMEL M, STOKSTAD M (2016). Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virol J.* **13**:100.
- PARK SJ, KIM GY, CHOY HE, HONG YJ, SAIF LJ, JEONG JH, PARK SI, KIM HH, KIM SK, SHIN SS, KANG MI, CHO KO (2007a). Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch. Virol.* **152(10)**: 1885-900.
- PARK SJ, LIM GK, PARK SI, KIM HH, KOH HB, CHO KO (2007b). Detection and molecular characterization of calf diarrhoea bovine coronaviruses circulating in South Korea during 2004-2005. *Zoonoses Public Hlth.* **54(6-7)**: 223-230.
- POPOVA R, ZHANG X (2002). The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology.* **294(1)**: 222-326.
- ROTTIER P, BRANDERBERG D, ARMSTRONG J, VAN DER ZEIJST B, WARREN G (1984). Assembly in vitro of a spanning membrane protein of the endoplasmic reticulum: The E1 glycoprotein of coronavirus Mouse hepatitis virus A59. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81(5)**: 1421-1425.
- SAEKI KN, OHTSUKA N, TAGUCHI F (1997). Identification of spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. *J. Virol.* **71(12)**: 9024-9031.
- SAIF LJ (2010). Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* **26(2)**: 349-364.
- SAIF LJ, BROCK KV, REDMAN DR, KOHLER EM (1991). Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.* **128(19)**: 447-449.
- SAKLI GU (2017). İshalli buzağı dışkılarında sığır coronavirusu ve sığır rotavirusunun hızlı tanı kiti ve rt-pcr ile araştırılması. Erişim Adresi: [<http://acikerisim.selcuk.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/10176/462482.pdf?sequence=1&isAllowed=y>]. Erişim Tarihi: 31/03/2019.

- SAWICKI SG, SAWICKI DL, SIDDELL SG (2007). A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**(1): 20-29.
- SCHOENTHALER SL, KAPIL S (1999). Development and Applications of a Bovine Coronavirus Antigen Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**(1): 130-132.
- SCHULTZE B, GROSS HJ, BROSSMER R, HERRLER G (1991). The spike protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J. Virol.* **65**: 6232-6237.
- SETHNA PB, HOFMANN MA, BRIAN DA (1991). Minus-strand copies of replicating coronavirus mRNAs contain antileaders. *J. Virol.* **65**(1): 320-325.
- SHIN J, TARK D, LE VP, CHOE S, CHA RM, PARK GN, CHO IS, NGA BTT, LAN NT, AN DJ (2019). Genetic characterization of bovine coronavirus in Vietnam. *Virus Genes*. Accepted Article.
- SIMMONS G, REEVES JD, RENNEKAMP AJ, AMBERG SM, PIEFER AJ, BATES P (2004). Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**(12): 4240-4245.
- SIU YL, TEOH KT, LO J, CHAN CM, KIEN F, ESCRIOU N, TSAO SW, NICHOLLS JM, ALTMAYER R, PEIRIS JS, BRUZZONE R, NAL B (2008). The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J. Virol.* **82**(22): 11318-11330.
- SNIJDER EJ, BREDENBEEK PJ, DOBBE JC, THIEL V, ZIEBUHR J, POON LL, GUAN Y, ROZANOV M, SPAAN WJ, GORBALENYA AE (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**(5): 991-1004.
- STORZ J, PURDY CW, LIN X, BURRELL M, TRUAX RE, BRIGGS RE, FRANK GH, LOAN RW (2000). Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytocidal viruses, and *Pasteurella* spp. from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **216**: 1599-1604.
- STORZ J, ROTT R, KALUZA G (1981). Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infect. Immun.* **31**(3): 1214-1222.
- SYMES SJ, ALLEN JL, MANSELL PD, WOODWARD KL, BAILEY KE, GILKERSON JR, BROWNING GF (2018). First detection of bovine noroviruses and detection of bovine coronavirus in Australian dairy cattle. *Aust. Vet. J.* **96**(6): 203-208.
- TAKIUCHI E, ALFIERI AF, ALFIERI AA (2008). Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **41**: 277-282.
- TANAKA T, KAMITANI W, DEDIEGO ML, ENJUANES L, MATSUURA Y (2012). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. *J. Virol.* **86**(20): 11128-11137.

- THOMAS LH, GOURLAY RN, STOTT EJ, HOWARD CJ, BRIDGER JC (1982). A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.* **33**: 170-182.
- TİMURKAN MÖ, AYDIN H, BELEN S (2015). Erzurum Bölgesinde Sığırlarda Respiratorik Coronavirus Enfeksiyonunun RT-PCR ile Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu. *Atatürk Üni. Vet. Bil. Derg.* **10(3)**: 186-192.
- TOFTAKER I, HOLMOY I, NODTVEDT A, OSTERAS O, STOKSTAD M (2017). A cohort study of the effect of winter dysentery on herd-level milk production. *J. Dairy Sci.* **100(8)**: 6483-6493.
- TOKGÖZ BS, ÖZDEMİR R, TURUT N, MİRİOĞLU M (2013). Adana Bölgesinde Görülen Neonatal Buzağı Enfeksiyonlarının Morbidite ve Mortaliteli ve Risk Faktörlerinin Belirlenmesi. *AVKAE Derg.* **3(1)**: 7-14.
- TOOZE J, TOOZE S, WARREN G (1984). Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell Biol.* **33(2)**: 281-293.
- TRAVEN M, NASLUND K, LINDE N, LINDE B, SILVAN A, FOSSUM C, HEDLUND KO, LARSSON B (2001). Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV -- comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet. Microbiol.* **81(2)**: 127-151.
- TSUNEMITSU H., SMITH DR, SAIF LJ (1999). Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch Virol.* **144(1)**: 167-75.
- TYRRELL DAJ, ALMEIDA JD, BERRY DM, CUNNINGHAM CH, HAMRE D, HOLFSTED MS, MALLUCCI L, MCINTOSH K (1968). Coronaviruses. *Nature.* **220**: 650.
- VALARCHER JF, HAGGLUND S (2010). *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. LEFEVRE PC, BLANCOU J, CHERMETTE R, UILENBERG G. 1st Ed. *Lavoisier*. P.: 545-552.
- VAN KRUININGEN HJ, KHAIRALLAH LH, SASSEVILLE VG, WYAND MS, POST JE (1987). Calfhood coronavirus enterocolitis: a clue to the etiology of winter dysentery. *Vet. Pathol.* **24(6)**: 564-567.
- VENNEMA H, GODEKE GJ, ROSSEN JWA, VOORHOUT WF, HORZINEK MC, OPSTELTEN DJE, ROTTIER PJM (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* **15(8)**: 2020-2028.
- VIJAYKRISHNA D, SMITH GJ, ZHANG JX, PEIRIS JS, CHEN H, GUAN Y (2007). Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* **81(15)**: 4012-4020.
- WANG L, ZHANG Y (2016). *Animal coronaviruses*. 1th Ed. Humana Press. P.:3-15.
- WEISS SR, NAVAS-MARTIN S (2005). Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69(4)**: 635-664.

- WOO PC, LAU SK, HUANG Y, YUEN KY (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* **234(10)**: 1117-1127.
- WOO PC, LAU SK, LAM CS, LAU CC, TSANG AK, LAU JH, BAI R, TENG JL, TSANG CC, WANG M, ZHENG BJ, CHAN KH, YUEN KY (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* **86(7)**: 3995-4008.
- WORKMAN AM, KUEHN LA, MCDANELD TG, CLAWSON ML, LOY JD (2019). Longitudinal study of humoral immunity to bovine coronavirus, virus shedding, and treatment for bovine respiratory disease in pre-weaned beef calves. *BMC Vet Res.* **15(1)**:161.
- YANG D, LEIBOWITZ JL (2015). The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res.* **(206)**: 120-133.
- YAVRU S, YAPICI O, KALE M, SAHINDURAN S, PEHLIVANOGLU F, ALBAY MK, AVCI O (2016). Bovine coronavirus (BoCV) infection in calves with diarrhoea and their dams. *Acta Sci. Vet.* **44**: 1-7.
- YILDIRIM Y, DAGALP SB, TAN MT, KALAYCIOGLU AT (2008). Seroprevalence of the Rotavirus and Coronavirus infections in cattle. *J. Anim. Vet. Advances.* **7**: 1320-1323.
- YOO D, DEREGT D (2001). A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 297-302.
- YOO DW, PARKER MD, BABIUK LA (1991). The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology.* **180(1)**: 395-399.
- ZHANG X, HASÖKSÜZ M, SPIRO D, HALPIN R, WANG S, VLASOVA A, JANIES D, JONES LR, GHEDIN E, SAIF LJ (2007). Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology.* **363(1)**: 1-10.
- ZHANG X, HERBST W, KOUSOULAS KG, STORZ J (1994). Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. *Arch. Virol.* **134(3-4)**: 421-426.
- ZHANG XM, KOUSOULAS KG, STORZ J (1991). Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. *Virology.* **183(1)**: 397-404.
- ZHAO L, JHA BK, WU A, ELLIOTT R, ZIEBUHR J, GORBALENYA AE, SILVERMAN RH, WEISS SR (2012). Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell. Host. Microbe.* **11(6)**: 607-616.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENİYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 19/07/2017
TOPLANTI NO : 2017-15
DOSYA NO : 2017-89
KARAR NO : 2017-15-127

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Feray Alkan'ın yaptığı; araştırmacı olarak doktora öğrencisi Seçil Sevinç'in katıldığı "Sığır coronavirusların S Gen Bölgesi Moleküler Analizi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenerek Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 7. maddesinin (h) fıkrası kapsamında ele alınmış olup çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Önvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	—
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	—
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	—
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADİR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	<i>[Signature]</i>
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	<i>[Signature]</i>
Dr.Vet.Hek.Gülbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	<i>[Signature]</i>
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	<i>[Signature]</i>
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	<i>[Signature]</i>

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks : 0 (312) 212 60 49

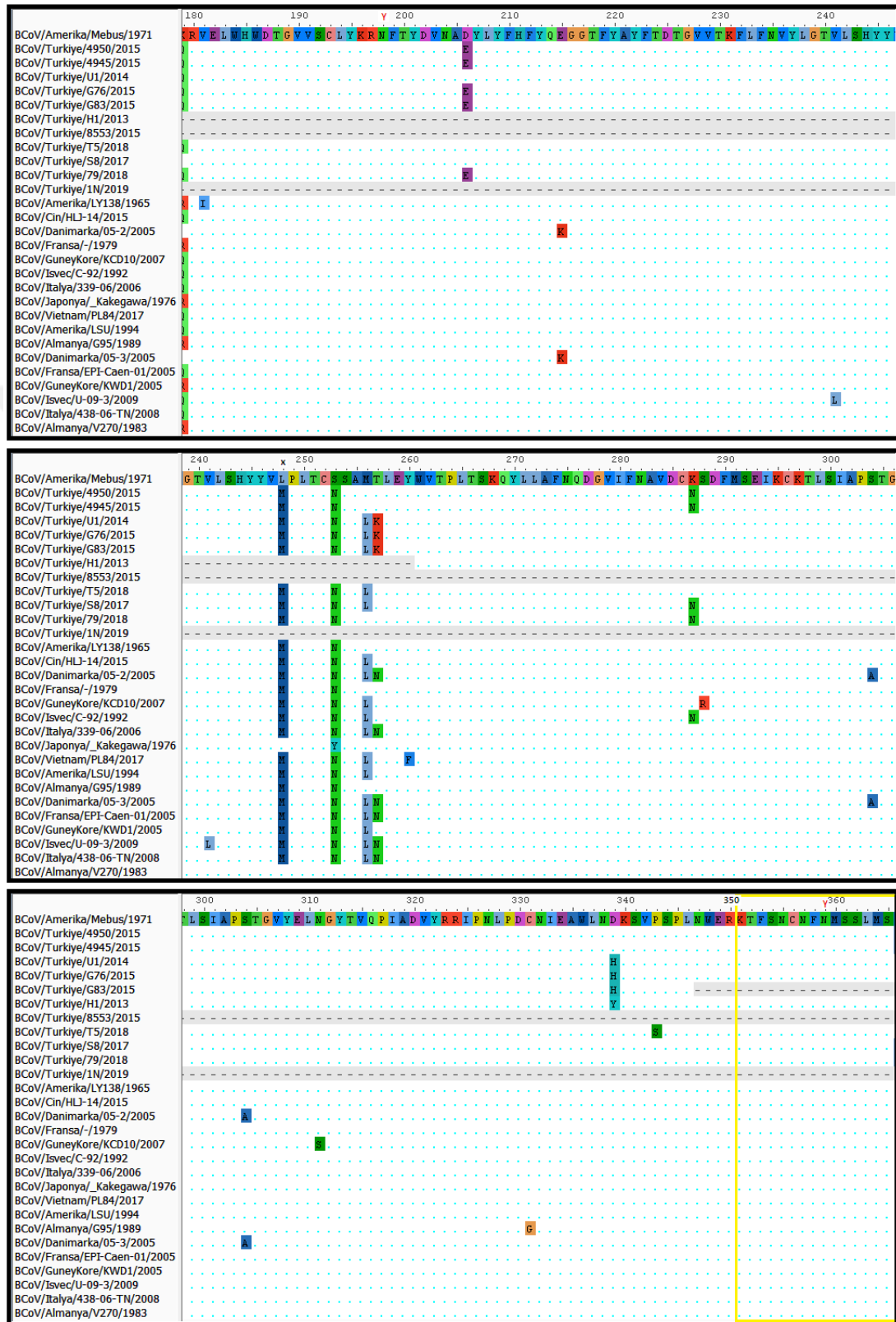
Ek 2. BCoV S Gen Bölgesi Amino Asit Dizin Tablosu

	10	20	30	40	50	60
BCoV/Amerika/Mebus/1971	MFLILLISLPMAFAVIG	DLKCTTVSINDVDTGAP	SIITD	IVDVTNGLGTYYYL	DRVYLN	TLLLLNGYY
BCoV/Türkiye/4950/2015				V		
BCoV/Türkiye/4945/2015				V		
BCoV/Türkiye/U1/2014				V		
BCoV/Türkiye/G76/2015				V		
BCoV/Türkiye/G83/2015				V		
BCoV/Türkiye/H1/2013				V		
BCoV/Türkiye/8553/2015						
BCoV/Türkiye/T5/2018				V		
BCoV/Türkiye/S8/2017				V		
BCoV/Türkiye/79/2018				V		
BCoV/Türkiye/1N/2019						
BCoV/Amerika/LY138/1965				V		
BCoV/Cin/HLJ-14/2015				V		
BCoV/Danimarka/05-2/2005				V		
BCoV/Fransa/-/1979				V		
BCoV/GüneyKore/KCD10/2007				V		
BCoV/İsvec/C-92/1992				V		
BCoV/İtalya/339-06/2006				V		
BCoV/Japonya/_Kakegawa/1976				V		
BCoV/Vietnam/PL84/2017				V		
BCoV/Amerika/LSU/1994				V		
BCoV/Almanya/G95/1989				V		
BCoV/Danimarka/05-3/2005				V		
BCoV/Fransa/EPI-Caen-01/2005				V		
BCoV/GüneyKore/KWD1/2005				V		
BCoV/İsvec/U-09-3/2009				V		
BCoV/İtalya/438-06-TN/2008				V		
BCoV/Almanya/V270/1983				V		

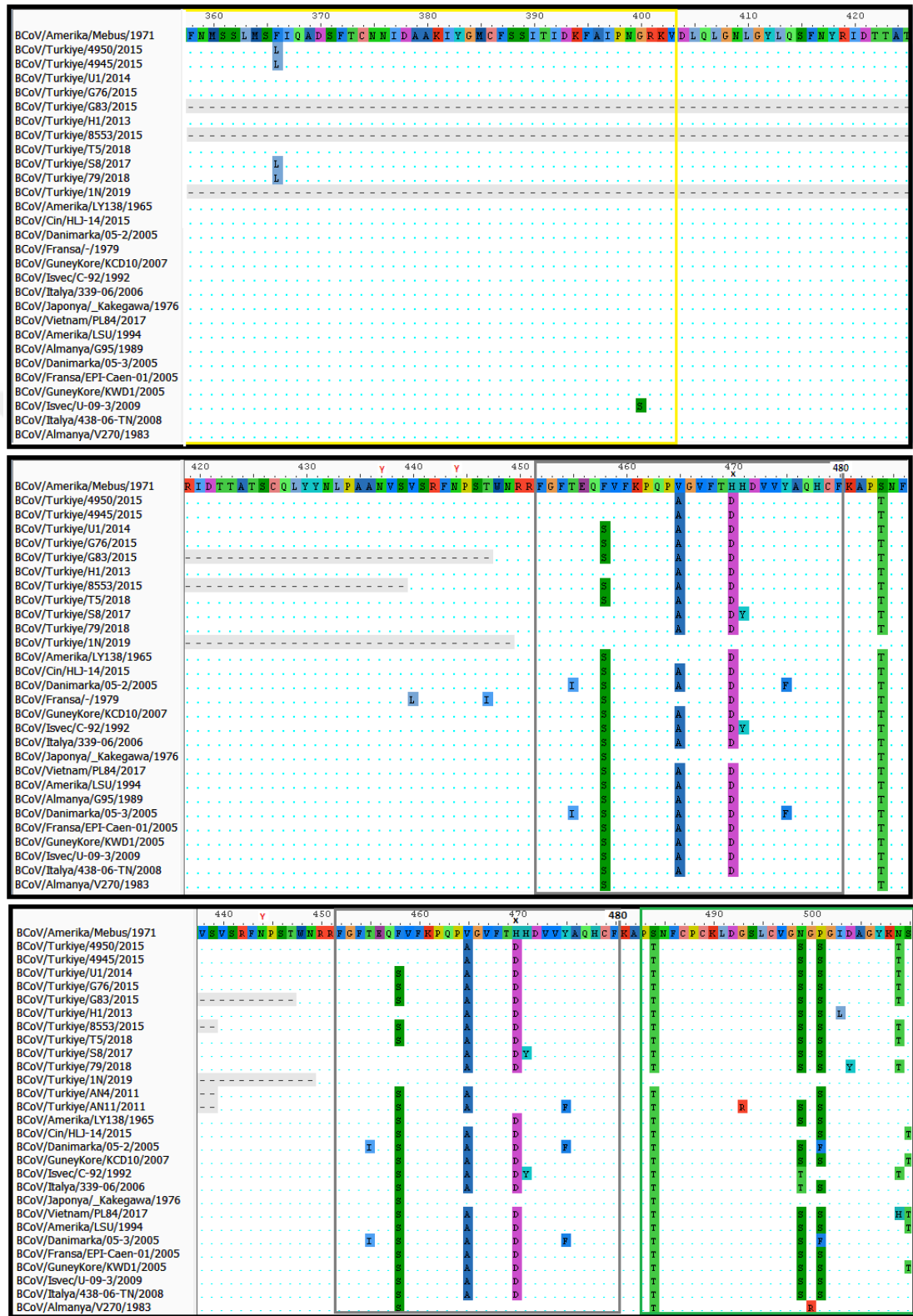
	60	70	80	90	100	110	120
BCoV/Amerika/Mebus/1971	NTTLLLLNGYYPTSG	TYRNMAIKG	TLLLR	LMPKPPFL	DFIN	GIFAKVKNTR	KVIRKGGVMYSEFP
BCoV/Türkiye/4950/2015							
BCoV/Türkiye/4945/2015							
BCoV/Türkiye/U1/2014							
BCoV/Türkiye/G76/2015							
BCoV/Türkiye/G83/2015							
BCoV/Türkiye/H1/2013							
BCoV/Türkiye/8553/2015							
BCoV/Türkiye/T5/2018							
BCoV/Türkiye/S8/2017							
BCoV/Türkiye/79/2018							
BCoV/Türkiye/1N/2019							
BCoV/Amerika/LY138/1965							
BCoV/Cin/HLJ-14/2015							
BCoV/Danimarka/05-2/2005							
BCoV/Fransa/-/1979							
BCoV/GüneyKore/KCD10/2007							
BCoV/İsvec/C-92/1992							
BCoV/İtalya/339-06/2006							
BCoV/Japonya/_Kakegawa/1976							
BCoV/Vietnam/PL84/2017							
BCoV/Amerika/LSU/1994							
BCoV/Almanya/G95/1989							
BCoV/Danimarka/05-3/2005							
BCoV/Fransa/EPI-Caen-01/2005							
BCoV/GüneyKore/KWD1/2005							
BCoV/İsvec/U-09-3/2009							
BCoV/İtalya/438-06-TN/2008							
BCoV/Almanya/V270/1983							

	120	130	140	150	160	170	180
BCoV/Amerika/Mebus/1971	YSEFP	AITIG	TFVMTYS	VVQPH	TNLDK	LQGLE	ISVCQYTMCEYP
BCoV/Türkiye/4950/2015							
BCoV/Türkiye/4945/2015							
BCoV/Türkiye/U1/2014							
BCoV/Türkiye/G76/2015							
BCoV/Türkiye/G83/2015							
BCoV/Türkiye/H1/2013							
BCoV/Türkiye/8553/2015							
BCoV/Türkiye/T5/2018							
BCoV/Türkiye/S8/2017							
BCoV/Türkiye/79/2018							
BCoV/Türkiye/1N/2019							
BCoV/Amerika/LY138/1965							
BCoV/Cin/HLJ-14/2015							
BCoV/Danimarka/05-2/2005							
BCoV/Fransa/-/1979							
BCoV/GüneyKore/KCD10/2007							
BCoV/İsvec/C-92/1992							
BCoV/İtalya/339-06/2006							
BCoV/Japonya/_Kakegawa/1976							
BCoV/Vietnam/PL84/2017							
BCoV/Amerika/LSU/1994							
BCoV/Almanya/G95/1989							
BCoV/Danimarka/05-3/2005							
BCoV/Fransa/EPI-Caen-01/2005							
BCoV/GüneyKore/KWD1/2005							
BCoV/İsvec/U-09-3/2009							
BCoV/İtalya/438-06-TN/2008							
BCoV/Almanya/V270/1983							

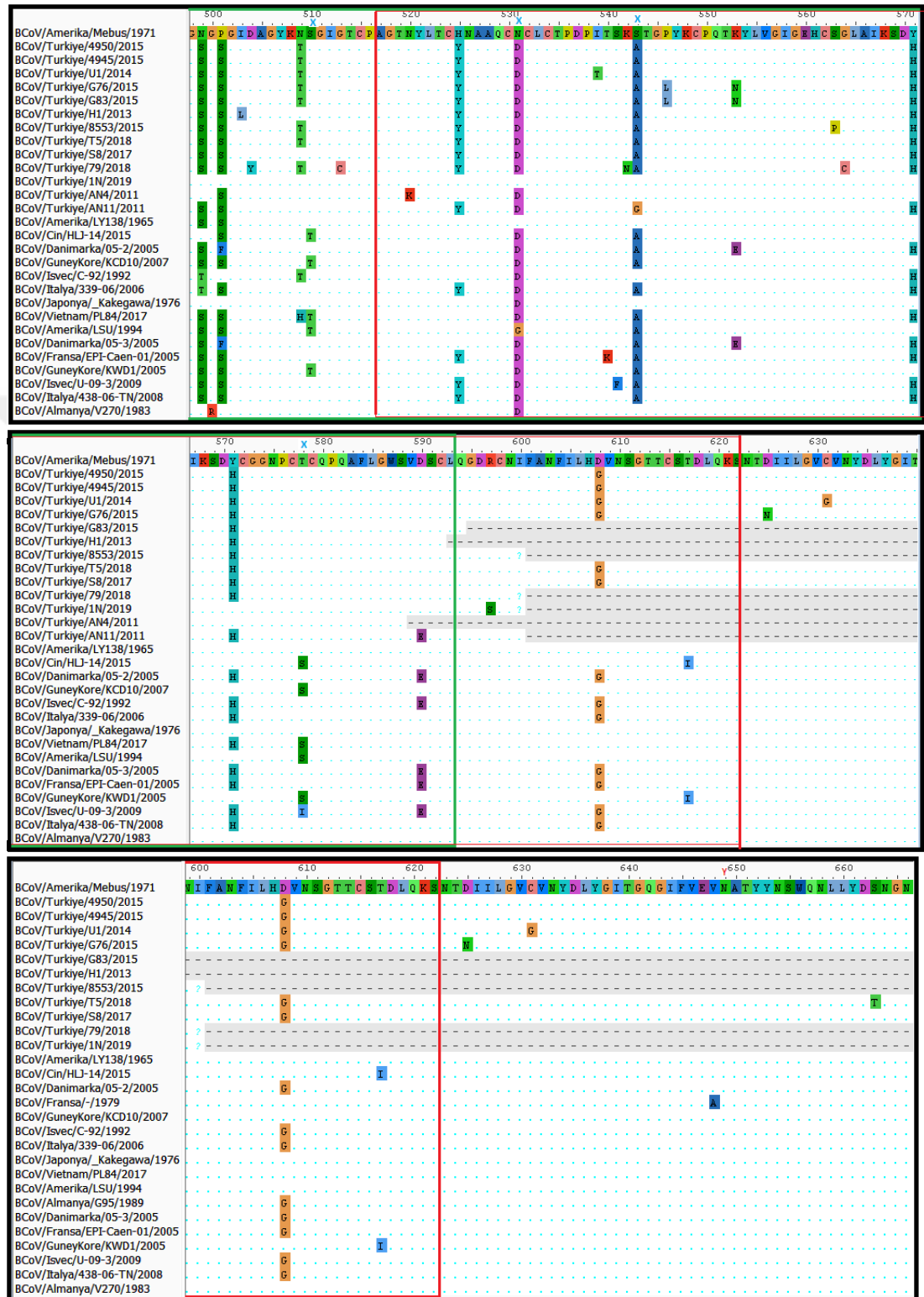
Ek 2. Devam



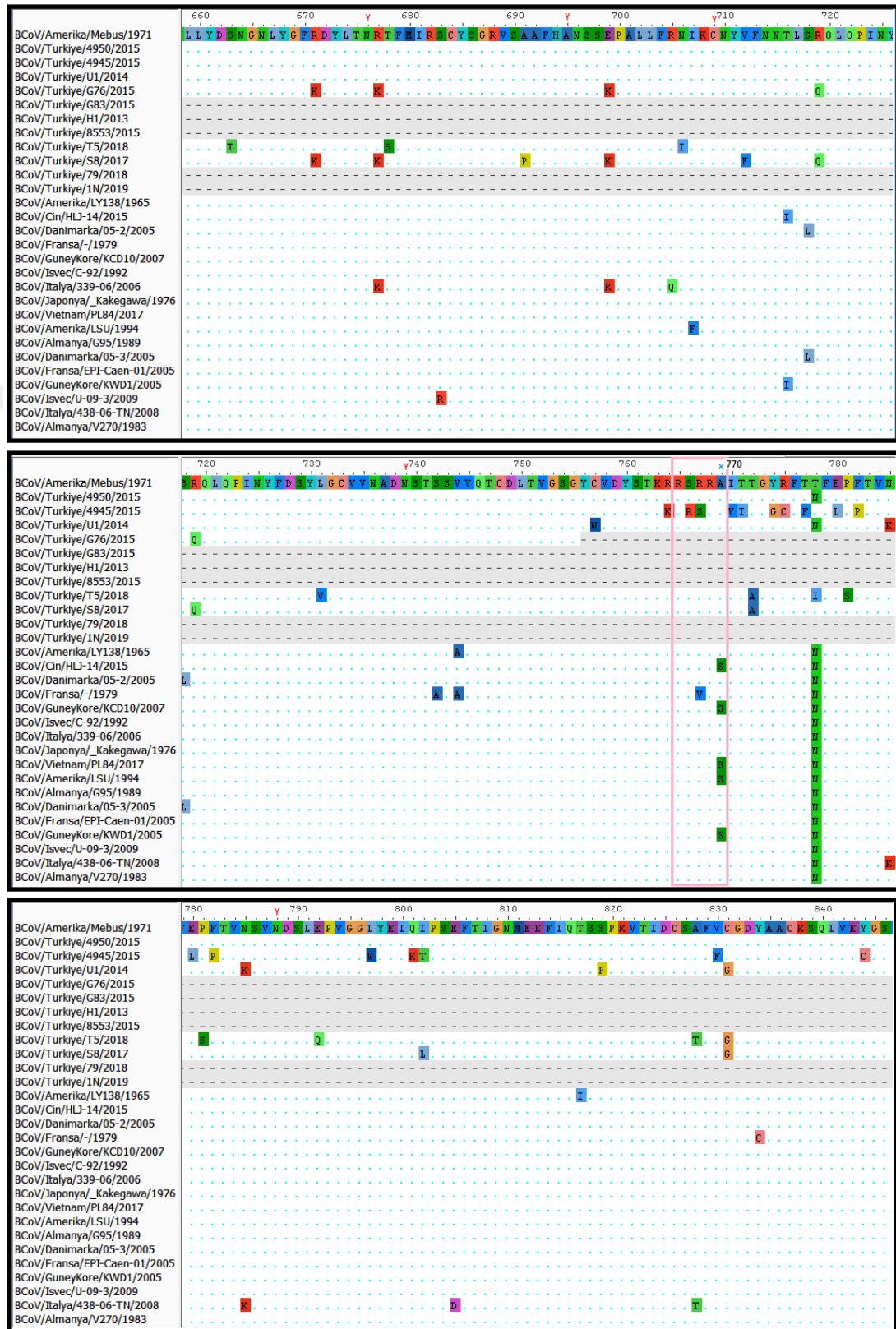
Ek 2. Devam



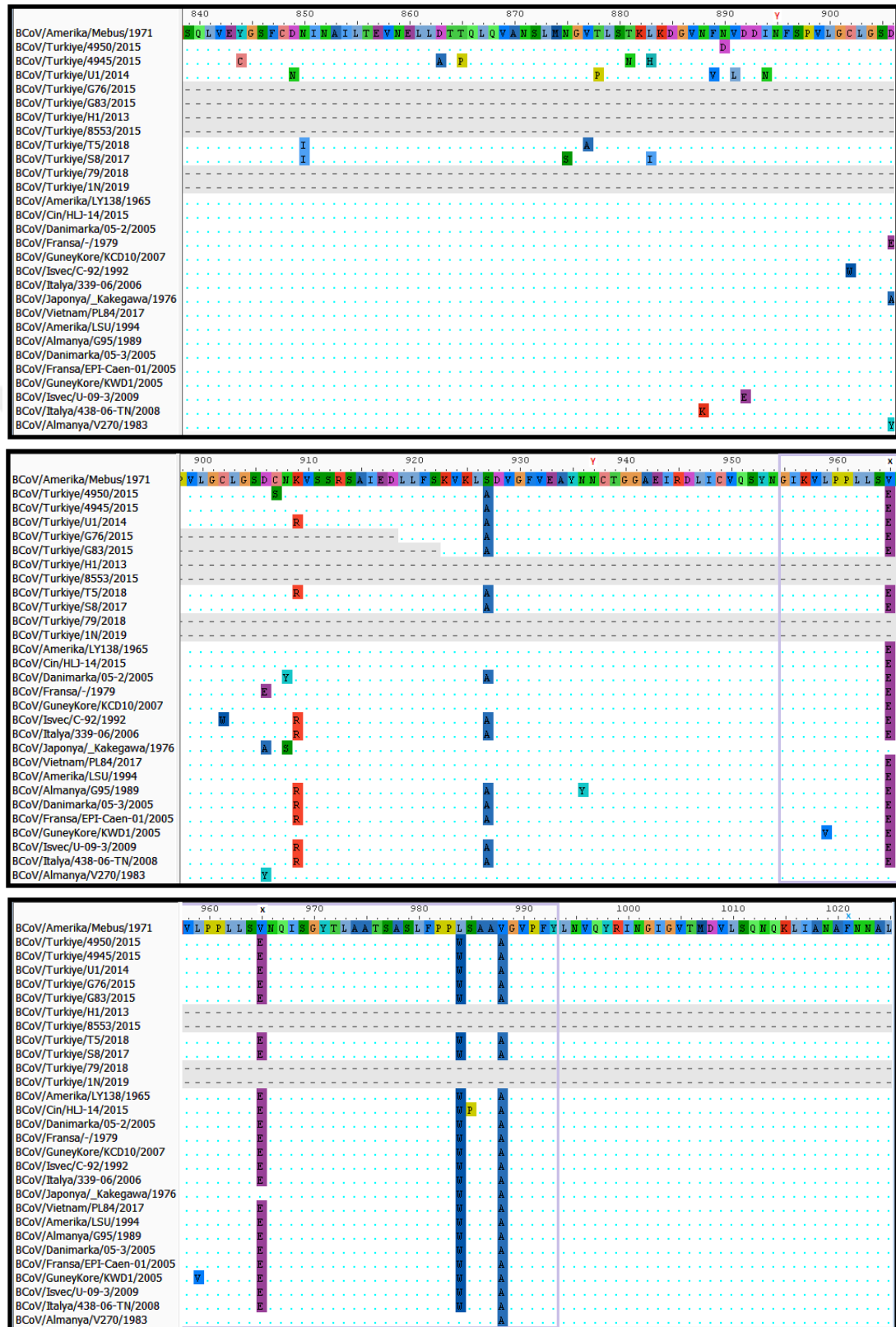
Ek 2. Devam



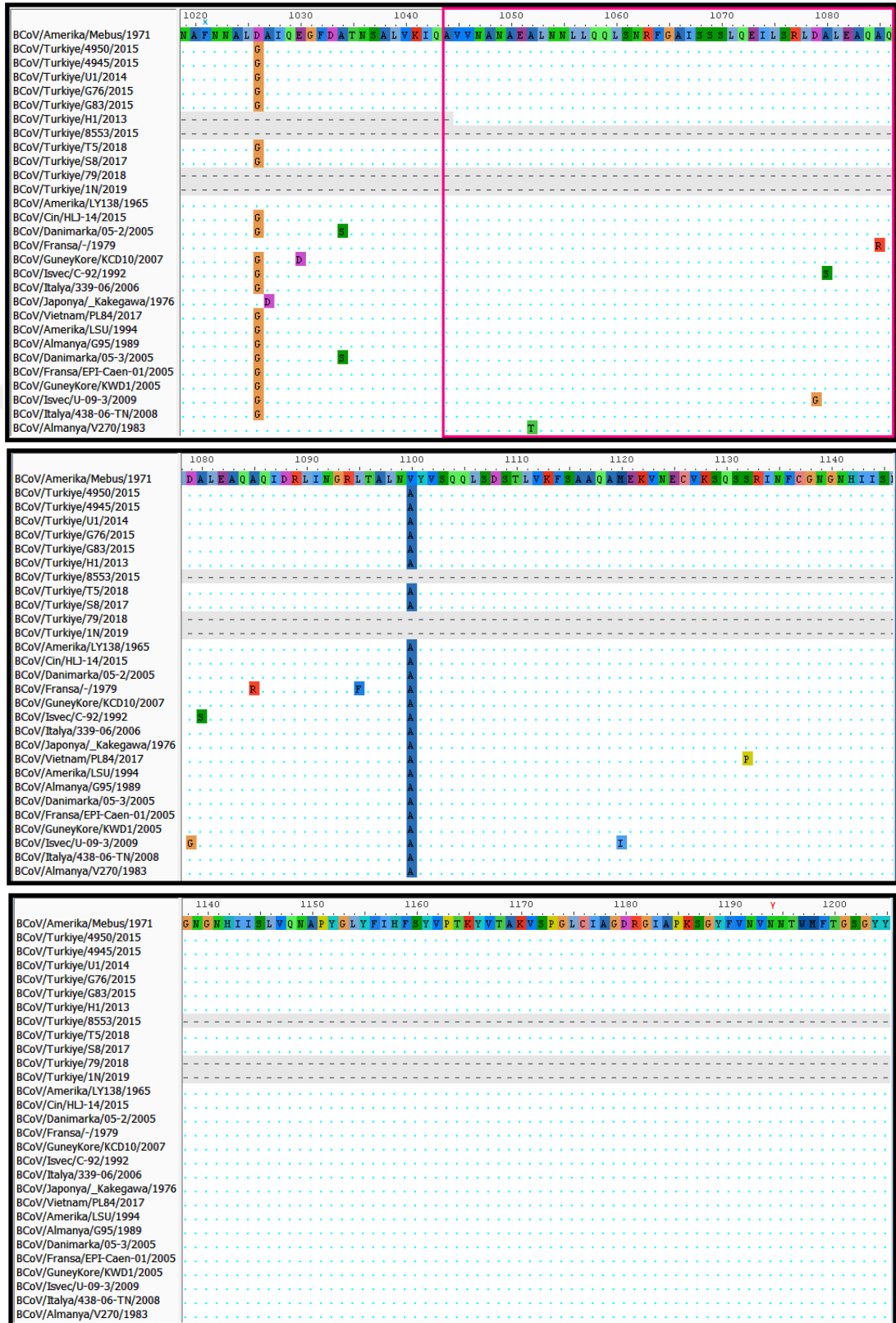
Ek 2. Devam



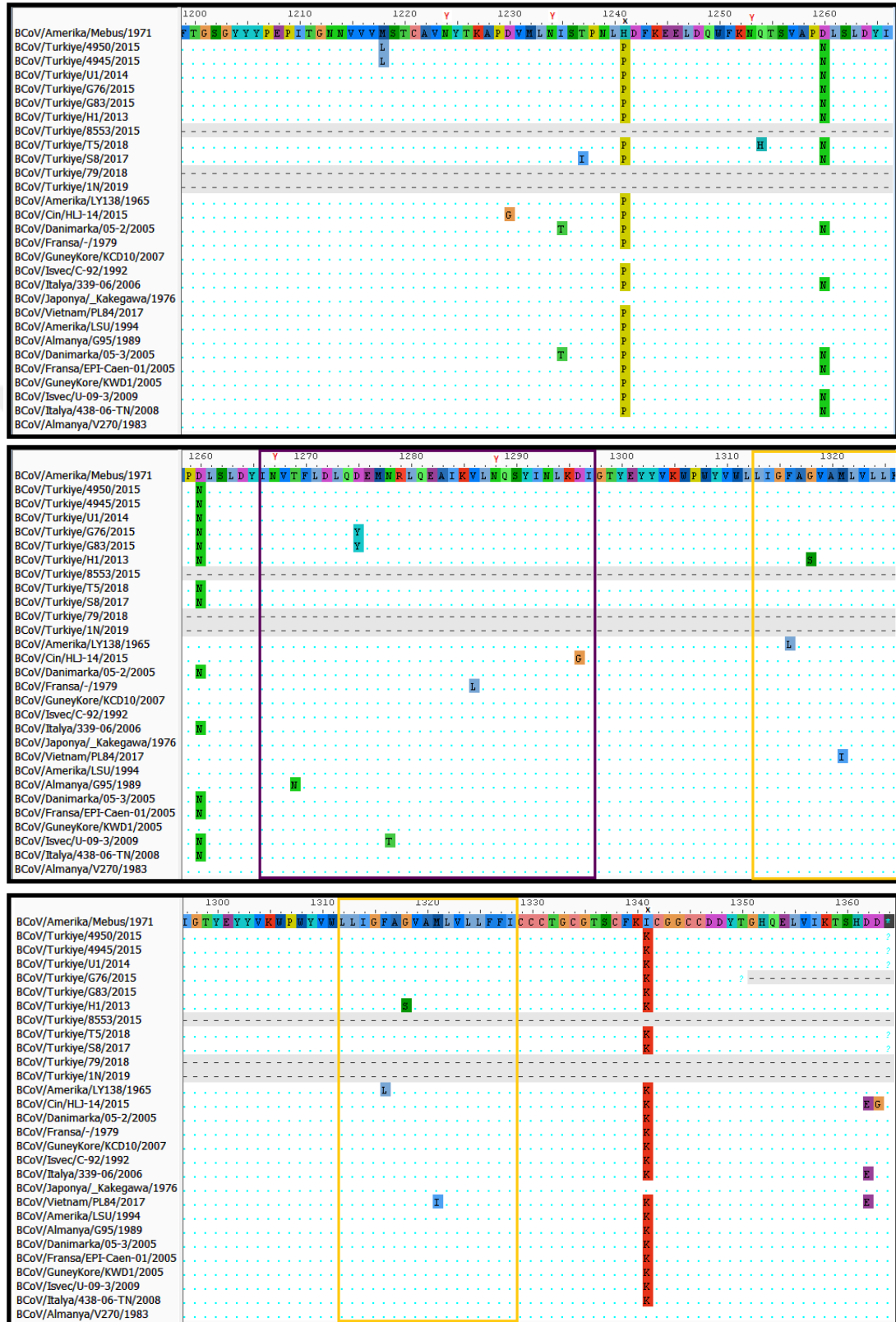
Ek 2. Devam



Ek 2. Devam



Ek 2. Devam



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: SEÇİL SEVİNÇ

Doğum Yeri ve Tarihi: Çifteler / ESKİŞEHİR, 02/05/1989

Uyruğu: Türkiye

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu: Atıfbey mah. Altındağ cad. Gökçenefe Konutları, A1 Blok, 12
Altındağ/ANKARA, +90 554 808 77 49

II- Eğitimi

2015-2019, Ankara Üni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Viroloji (Doktora – Ankara)

2013-2015, Selçuk Üni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Viroloji (Doktora – Konya)

2011-2012, University of Life Sciences in Lublin Faculty of Medicine Lublin/POLONYA
(Erasmus Exchange Student Programs)

2007-2012, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Lisans/Yükseklisans – Konya)

2003-2007, Etimesgut Anadolu Lisesi (Lise- Ankara)

2001-2003, Nurettin Ersin Ortaokulu (Ortaokul- Ankara)

1999-2001, 75. Yıl İlköğretim Okulu (Ortaokul/İlkokul son sınıf- Balıkesir)

1995-1999, Karagözoğlu İlkokulu (İlkokul- Balıkesir)

Yabancı Dili: İngilizce

III- Ünvanları

2012: Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2016 – 2019: Ankara Üni. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

2013 – 2016: Selçuk Üni. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimler Derneği

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

1. KARAYEL HACIOĞLU İ, COŞKUN N, DURAN YELKEN S, SEVİNÇ S, ALKAN F (2019). Phylogenetic Analysis of Bovine Respiratory Syncytial Virus from Calves with Respiratory Disorders. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 25(2): 251-256. DOI: 10.9775/kvfd.2018.20819

Bildiriler

1. Yavru S, Avcı O, Kale M, Sevinç S, (2014). Köpeklerde Canine Rotavirus Enfeksiyonunun Belirlenmesi, 21-24.10.2014, Antalya, Türkiye. (Poster Sunumu).
2. Avcı O, Bulut O, Yapıcı O, Yavru S, Şimşek A, Kale M, Dik I, Sevinç S, (2015). Detection of Canine Distemper Infection in Dogs in Antalya, 7-9.04.2015, St. Petersburg, Rusya. (Sözlü Bildiri).
3. Karayel Hacıoğlu İ, Coşkun N, Duran Yelken S, Sevinç S, Alkan F, (2018). Detection of Viral Agents Associated with Respiratory Disease in Calves, 27-30.08.2018, Viyana, Avusturya. (Poster Sunumu).
4. Sevinç S, Alkan F, (2019). The Detection of Bovine Coronaviruses in fecal and nazal specimens from cattle in Turkey, 22-23.04.2019, Atina, Yunanistan. (Poster Sunumu).

VII- Bilimsel Etkinlikleri

- 2019: 9th EuroSciCon Conference on Microbiology And Virology, 22-23 Nisan 2019, Atina/YUNANİSTAN
- 2015: 11th International VETistanbul Group Congress Russia, 7-9 Nisan 2015, St. Petersburg/RUSYA
- 2015: Aşı Bilimi Kongresi, 28-30 Nisan 2015, İzmir/TÜRKİYE
- 2014: XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 21-24 Ekim 2014, Antalya/TÜRKİYE
- 2012: 3. Kök Hücre Sempozyumu, 30 Kasım – 1 Aralık, İstanbul/TÜRKİYE
- 2011: 17. FECAVA Avrupa ve 6. KHVHD Kongresi, 7-10 Eylül 2011, İstanbul/TÜRKİYE
- 2011: 2. Veteriner Hekimliğe Sektörel Bakış (VESPA 2011) Toplantısı, 17-20 Mart 2011, Bursa/TÜRKİYE
- 2010: VTM (Veteriner Tıp Merkezi) Ankara/TÜRKİYE Stajyer
- 2009: Cat Hospital Ankara/TÜRKİYE Stajyer

Projeler ve Burslar

1. Sığır Coronavirusların S Gen Bölgesi Moleküler Analizi (BAP Doktora Tez Projesi, 18L0239002), Araştırmacı.

Seminerler

2017, Maedi Visna Enfeksiyonu

2016, Viral Genetik

VIII- Diğer Bilgiler

Aldığı Ödüller

En iyi poster ödülü: Sevinç S, Alkan F, (2019). The Detection of Bovine Coronaviruses in fecal and nazal specimens from cattle in Turkey, 22-23.04.2019, Atina, Yunanistan (Poster Sunumu).

Katıldığı Eğitim Seminerleri

2014 - Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu - Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası.

