

## Yenidoğan Buzağı İshal Olgularında Enterik Virusların (BRV, BCoV, BVDV, BToV) Çoklu Enfeksiyonu

Özer ATEŞ<sup>1,2</sup> Kadir YEŞİLBAĞ<sup>\*1</sup>

1 Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, 16059 Bursa, Türkiye

2 Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı, 03200 Afyonkarahisar, Türkiye

Received 25-08-2022 Accepted 02-12-2022

### Özet

Neonatal dönemde en önemli mortalite sebebi olan buzağı ishalleri birçok faktöre bağlı olarak gelişmekte ve büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Türkiye’de bugüne kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, viral etkenlerin yeni doğan buzağılarda önemli oranda neonatal ishal olgularına neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada şiddetli ishal ve neonatal ölümlerin görüldüğü buzağılarda çoklu viral enfeksiyonların rolü araştırıldı. Çalışma kapsamında tek bir işletmeden toplanan dışkı örnekleri (n=16) üç farklı hücre hattında (MDBK, HRT-18 ve MA-104) virus izolasyonuna alındı. Tüm örneklerle 4 kör pasaj işlemi ve sonrasında IPMA testi uygulandı. Bu süreçte araştırılan enterik virusların (BRV, BCoV, BVDV, BToV) hücre kültüründe izolasyonu yapılamadı. Çalışma kapsamında dışkı örneklerinden PCR ve Ag ELISA testlerinin sonuçlarına göre, ishal semptomu gösteren 16 buzağıdan alınan dışkı örneklerinin 14 (%87,5) adedinde araştırılan enterik virusların en az bir tanesi tespit edildi. Araştırılan olgularda tekli BRV enfeksiyonuna rastlanmazken; 2 (%12,5) hayvanda tek BCoV, 2 (%12,5) hayvanda tek BVDV, 2 (%12,5) hayvanda tek BToV enfeksiyonu saptandı. Diğer yandan 1 (%6,25) hayvanda BRV ve BVDV, 1 (%6,25) hayvanda BCoV ve BToV, 4 (%25) hayvanda BCoV ve BVDV, 1 (%6,25) hayvanda BVDV ve BToV içeren ikili enfeksiyonlar tespit edildi. 1 (%6,25) hayvanda ise BVDV, BToV ve BCoV olmak üzere enterik virusların oluşturduğu üçlü enfeksiyon saptandı. SDS-PAGE testinde akrilamid jel üzerinde RNA segmentlerinin bant profillerine göre (4/2/3/2) tespit edilen rotavirusun grup A’da yer aldığı gösterildi. Ayrıca çalışmada da PCR testi ile pozitif saptanan rotavirusun, G10P[11] genotipine sahip olduğu, genotip spesifik primerler kullanılarak tespit edildi. Bu çalışmada neonatal buzağı ishallerine sebep olabilen önemli viral etkenler olan BRV, BCoV, BVDV ve BToV’un aynı işletmede eş zamanlı olarak görülebileceği ve şiddetli hastalık bulguları ve kayıplara neden olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Neonatal buzağı ishalleri, Çoklu viral enfeksiyon, Bovine Rotavirus (BRV), Bovine Coronavirus (BCoV), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Torovirus (BToV)

## Concurrent Infections of Enteric Viruses (BRV, BCoV, BVDV, BToV) in Calves with Neonatal Diarrhea

### Abstract

Calf diarrhea, which develops in the neonatal period and is the most important cause of mortality, develops depending on many factors and causes significant economic losses all over the world. In the epidemiological studies conducted in Turkey to date, it has been shown that diarrhea often occurs after the calving period and causes great economic losses with growth retardation, treatment costs and deaths. Stool samples collected in the study were isolated in three different cell lines (MDBK, HRT-18 and MA-104), enteric viruses (BRV, BCoV, BVDV, BToV), which were intended to be obtained after four blind passages and IPMA test, could not be isolated in cell culture. According to the results of PCR and Ag ELISA tests from stool samples within the scope of the study, at least one of the investigated enteric viruses was detected in 14 (87.5%) stool samples taken from 16 calves with diarrhea symptoms. While no single BRV infection was found in the study; Single BCoV infection was detected in 2 (12.5%) calves, single BVDV infection in 2 (12.5%) calves, and single BToV infection in 2 (12.5%) calves. Dual infections of BRV and BVDV were detected in 1 (6.25%) calf, BCoV and BToV in 1 (6.25%) calf, BCoV and BVDV in 4 (25%) calves, and BVDV and BToV in 1 (6.25%) calf. A triple multiple infection of enteric viruses, BVDV, BToV and BCoV, was detected in 1 (6.25%) calf. Rotavirus, which was detected according to the migration pattern of RNA segments (4/2/3/2) on acrylamide gel in the SDS-PAGE test, was shown to be in group A. In addition, in the study, it was determined by using genotype-specific primers that the rotavirus, which was detected positive by PCR test, had the G10P[11] genotype. In this study, it was shown that BRV, BCoV, BVDV and BToV, which are important viral agents that can cause neonatal calf diarrhea, can be seen simultaneously in the same farm and cause severe disease findings and losses.

Keywords: Neonatal calf diarrhea, Multiple viral infections, Bovine Rotavirus (BRV), Bovine Coronavirus (BCoV), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Torovirus (BToV)

\* Corresponding author: Prof. Dr. Kadir Yeşilbağ, kyesilbag@uludag.edu.tr, +090 224 2941295

## Giriş

Neonatal dönemin ilk 10 günlük döneminde en önemli mortalite sebebi olan buzağı ishalleri birçok enfeksiyöz ya da non-enfeksiyöz faktörlere bağlı olarak gelişmekte ve sığırcılık işletmeleri için önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır <sup>1</sup>. Bu dönemde özellikle enfeksiyöz orijinli (bakteriyel, viral ve paraziter) ishaller ön plana çıkmakta ve bunlar arasında E. coli, Cryptosporidium, Rotavirus, Coronavirus, Bovine Viral Diarrhea ve Toroviruslar yer almaktadır<sup>2-7</sup>. Non-enfeksiyöz sebeplere bağlı olarak gelişen ishaller ise alimenter faktörler, hazırlayıcı faktörler ve çevresel faktörleri kapsamaktadır <sup>8</sup>. Hastalıklara karşı savunma mekanizması gelişmemiş ve kolostrum almamış buzağılarda, bakım ve besleme şartları iyi düzeyde olsa dahi neonatal ishal nedeni kayıplar yaşanabilmektedir. Türkiye'de yılda yaklaşık 6 milyon buzağının doğduğu ve neonatal dönemde en az %15 oranında kayıp yaşandığı ön görülmektedir <sup>9</sup>.

Buzağı ishallerinde sıklıkla karşılaşılan ve ilk olarak 1974 yılında elektron mikroskopu ile teşhis edilmiş olan *rotaviruslar* <sup>10</sup>, *Reoviridae* ailesi içerisinde Rotavirus genusunda sınıflandırılan, zarfsız, kübik simetrik, çift iplikçikli ve 11 segmentli RNA genomuna sahip olan viruslardır. Viral genom 6 yapısal (VP1- 4, VP6, VP7) ve 6 yapısal olmayan protein (NSP1-6) olmak üzere toplam 12 protein kodlamaktadır <sup>11</sup>. VP6 gen bölgesinin genetik ve antijenik özelliklerine dayanarak *rotaviruslar* on gruba (tür) (A-J) ayrılmıştır <sup>12</sup>. Buzağı ishallerinde rotavirus A grubu ön planda yer almakla birlikte B ve C grubu *rotaviruslar* sığırlarda spontan olarak enfeksiyona neden olmaktadır <sup>13</sup>. Rotavirus suşları, dış kapsid proteinleri VP7 (glikoprotein, G) ve VP4 (proteaza duyarlı protein, P) genleri kullanılarak tiplendirilmektedir <sup>14</sup>. Genel olarak *rotaviruslar* 42 farklı G genotipi (G1-G42) ve 58 farklı P genotipine (P[1]-P[58]) sahiptir <sup>15</sup>. Saha çalışmaları sırasında tespit edilen sığır rotavirus genotiplerinin büyük çoğunluğu G6, G10 <sup>11</sup> ve daha az yaygın olan G8 olarak tespit edilmiştir <sup>16</sup>. Bu genotipler genellikle P[5], P[11] ve daha az sıklıkla P[1] ile ilişkilendirilmiştir <sup>17</sup>.

İlk olarak 1970' lerde yenidoğan buzağular arasında diyare salgını sırasında tanımlanmış ve bugüne kadar birçok ülkeden bildiri yapılmış olan coronaviruslar, *Nidovirales* dizininde, *Coronaviridae* ailesinde, *Coronavirinae* alt ailesinde, *Betacoronavirus* genusunda yer almaktadır <sup>18</sup>. Zarflı, helikal simetrik, pozitif polariteli olan RNA viruslarıdır. Viral genom nükleokapsit (N) proteini, transmembran (M) glikoproteini, spike (S) glikoproteini, envelope (E) proteini ve hemaglutinin-esteraz (HE) glikoproteini olmak

üzere beş adet yapısal protein kodlamaktadır. S glikoproteini S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır ve değişken bölge olduğu için coronavirusların genetik değişimlerinin tespitinde kullanılmaktadır <sup>19</sup>.

BVD virusu ilk olarak 1946 yılında New York şehrinde sığırların yeni bir virusu olarak tespit edilmiş olup, hastalığın ekonomik öneminden dolayı birçok ülke kontrol ve eradikasyon programları uygulamaktadır <sup>20</sup>. Multi-sistemik bir enfeksiyona neden olan etkenin, buzağılarda ishale sebep olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir <sup>4</sup>. *Flaviviridae* ailesinde, *Pestivirus* genusunda yer alan BVD virusu pozitif anlamlı, 12.5 kb ve lineer tek iplikçikli RNA genomuna sahip olup; virion zarflı ve ikozahedral simetriklidir <sup>21</sup>. Genomda bulunan genler 5' → 3' yönünde sırasıyla; N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ns</sup>, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B ' dir. BVDV-1 ve BVDV-2 genotipleri taksonomik ve epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan 5'UTR bölgesine göre ayrılmış olup, yapılan filogenetik analizler sonucunda BVDV-1 türünün 21 (1a-1u) ve BVDV-2 türünün 4 (2a-2d) alt grubu olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, her iki virus türe de sitopatojen (cp) ve sitopatojen olmayan biyotipleri (ncp) barındırmaktadır <sup>4,22</sup>.

Sığır torovirusların (BToV) ilk olarak ishalleri buzağılarda 1979 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde tanımlanmıştır <sup>5</sup>. BToV, *Nidovirales* dizininde, *Coronaviridae* ailesinde, *Torovirinae* alt ailesinde tanımlanan zarflı, tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA virusudur. 25-30 kb uzunluğunda olan viral genomdan iki adet yapısal olmayan protein (ORF1a ve ORF1ab) ve dört adet yapısal protein (spike (S), membran (M), hemaglutinin-esteraz (HE) ve nükleokapsid (N)) kodlanmaktadır <sup>1</sup>. M ve S hedef gen bölgelerine göre BToV' ların filogenetik çalışmaları bulunmaktadır <sup>1,5</sup>.

Ülkemizde yenidoğan buzağı kayıplarında ishal kaynaklı mortalite oranları bölgelere ve çiftliklere göre değişmektedir ayrıca koruyucu veteriner hekimlik hizmetlerinin uygulandığı çiftliklerde dahi yüksek olduğu tespit edilmiştir <sup>23-25</sup>. Bu çalışmada bir sığırcılık işletmesinde yenidoğan buzağılarda ishale sebep olan önemli enterik viral etkenlerin (BRV, BCoV, BVDV ve BToV) birlikte veya eş zamanlı olarak enfeksiyon oluşturma durumları araştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

### Örneklerin toplanması

Araştırmaya konu olan vakalar 2021 yılı Kasım ayında Edirne' de 40 tanesi ishal semptomu gösteren, 60 günlükten küçük 250 buzağı bulunan entansif bir süt işletmesinde önlenemeyen, tedaviye sınırlı düzeyde cevap veren ve ölümler

sonuçlanan neonatal buzağı ishal olgularını kapsamaktadır. Doğumdan 2 gün sonra ishalin başladığı işletmede, bir ay içerisinde 21 buzağı ölmüştür. İşletme yönetim sistemi dahilinde anaç sığır popülasyonunda BVD, BoHV-1, rotavirus ve coronavirus enfeksiyonlarına karşı düzenli aşılama uygulandığı teyid edilmiştir. Olgulara ilişkin örnekleme çalışmaları işletme veteriner hekimi tarafından yürütülmüştür. Bu kapsamda ishal bulgusu gösteren toplam 16 buzağıdan rektal yolla bireysel dışkı örnekleri alınarak teşhis amacıyla steril plastik kaplar içerisinde ve soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmıştır. Örneklenen tüm buzağuların doğum sonrası 1 aylık dönemde olduğu ve işletmede kolostrum yönetiminin titizlikle takip edildiği kaydedildi.

### İnokulum hazırlığı

Dışkı örnekleri 100 IU/ml penicilin ve 100µ/ml streptomisin içeren steril PBS ile 1:10 oranında sulandırılarak homojenize edildi ve 3000 rpm devirde 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan süpernatant 0.45 µm ve 0.22µm por çaplı enjektör filtrelerden süzüldü. Elde edilen süzüntü test edileceği zaman kullanılmak üzere -70 °C' de muhafaza edildi.

### Ag ELISA testi

Toplanan 16 adet ishali buzağı dışkı örneğinden antijen tespiti için BRV (BioX Diagnostic BIO K 343/2), BCoV (BioX Diagnostic BIO K 392/2) ve BVDV (IDEXX BVDV Ag/Serum Plus Test) ticari Ag ELISA kitleri kullanıldı. Kullanılan kitlerdeki test protokolü üretici firmaların önerdiği şekilde uygulandı. Test pleytleri ELISA okuyucuda (Thermo-Multiskan EX, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda okutularak sonuçlar değerlendirildi.

### Hücre hattı ve virus izolasyonu

MDBK ve HRT-18 hücre hatlarının hazırlama aşamasında %10 fetal dana serumu (FDS) ilave edilen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma,) kullanıldı. MA-104 hücre kültürünün hazırlanması aşamasında ise %10 fetal dana serumu (FDS) ilave edilen Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) kullanıldı. Ayrıca hücre kültürlerinde olası bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek amacıyla vasatlara 100 UI/ml Penisilin/Streptomisin ve 250 µl/ml Amfoterisin B solüsyonu eklendi. Hücre kültürleri ve FDS kullanım öncesinde RT-PCR ve immunoperoksidaz yöntemleriyle test edilerek *Pestivirus* kontaminasyonundan arı olduğu gösterildi. Ayrıca söz konusu hücre kültürleri mikoplazma kontaminasyonu yönünden periyodik olarak test edildi.

### African Green Monkey Kidney (MA-104) hücre hattında virus izolasyon çalışmaları

Rotavirus izolasyonu amacıyla MA-104 hücre hattından hazırlanan 24 gözlü hücre kültür pleytlerinin her gözüne 100.000 hücre/ml oranında olacak şekilde MA-104 hücre kültürü süspansiyonundan 1 ml konuldu. Ertesi gün pleyt yüzeyinin >%80' ini kaplayan hücre tabakasının üzerindeki üst sıvı uzaklaştırıldı. Pleyt yüzeyini kaplayan hücrelerin üzeri FDS içermeyen GMEM ile yıkandı. Daha önce hazırlanmış olan stok pankreatin (100µl/ml) çözeltisi ve GMEM ile %10 oranında pankreatin içeren virus üretme vasatı hazırlandı ve MA-104 hücre monolayerinin bulunduğu pleyt gözlerine, hücre yüzeyini kaplayacak kadar ilave edildi. Pleytler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde 30 dk inkübasyona bırakıldı. Eş zamanlı olarak ekimi yapılacak inokulumlar %10 oranında pankreatin (100µl/ml) ile muamele edildi ve 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her örnekten bir pleyt gözüne 200 µl inokulum eklenerek tekrar 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda içerik uzaklaştırılarak her göze 1 ml, %10 oranında pankreatin içeren virus üretme vasatı ilave edildi ve 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatöre kaldırıldı. Ekim yapılan kültürlerle iki günde bir % 10 oranında pankreatin ilave edildi. Pleytler 6 gün boyunca hücre morfolojisindeki sitopatolojik değişimleri saptayabilmek için invert mikroskop yardımıyla incelendi. Altı günün sonunda pleytler -80°C' ye kaldırılarak donduruldu ve daha sonra 37°C' de çözündürüldü. Söz konusu işlem inokule edilen inokulumların seri pasajlanması için üst sıvıların kullanılması yoluyla üç defa daha tekrarlanarak toplam dört kör pasaj işlemi yapıldı.

### Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) ve Human Rectal Tumor (HRT-18) hücre hatlarında virus izolasyon çalışmaları

MDBK ve HRT-18 hücre hatlarından hazırlanan farklı 24 gözlü hücre kültür pleytlerinin her gözüne 100.000 hücre/ml oranında olacak şekilde MDBK ve HRT-18 hücre kültürü süspansiyonundan 1 ml konuldu. Ertesi gün pleyt yüzeyinin >%80' ini kaplayan hücre tabakasının üzerindeki üst sıvı uzaklaştırıldı ve pleyt gözlerinin yüzeyini kaplayan hücrelerin üzeri FDS içermeyen DMEM ile yıkandı. Olası enterik virusların izolasyonu amacıyla, dışkı örneklerinden hazırlanan inokulumlar adsorbsiyona bağlı virus inokulasyonu yöntemiyle hücre hatlarına inokule edildi. Bu amaçla her örnekten pleytin bir gözüne 200 µl inokule edilerek 37°C' deki, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda test gözlerinden içerik uzaklaştırılarak 1 ml DMEM ilave edildi ve tekrar 37°C'deki, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatöre kaldırıldı. Pleytler 6 gün

boyunca hücre morfolojisindeki sitopatolojik değişimleri saptamak amacıyla invert mikroskop yardımıyla incelendi. Altı günün sonunda pleytler  $-80^{\circ}\text{C}$ ' ye kaldırılarak donduruldu ve daha sonra  $37^{\circ}\text{C}$ ' de çözündürüldü. Söz konusu işlem inokule edilen inokulumların seri pasajlanması için üst sıvıların kullanılması yoluyla üç defa daha tekrarlanarak toplam dört kör pasaj işlemi yapıldı.

### İmmunoperoksidaz Monolayer Assay (IPMA)

Test protokolü daha önce yapılmış bir çalışmada belirtilmiş şekilde gerçekleştirildi<sup>26</sup>. Nonsitopatojen karakterdeki virus üremelerinin teyidi için 100,000 hücre/ml oranındaki MDBK hücre süspansiyonundan 24 gözlü makro pleytlerdeki (Corning, ABD) her bir göze 1 ml aktarıldı. Bir gün inkübe edildikten sonra daha önceden kör pasaj işlemleri yapılmış olan örneklerden her bir göze 100 µl inokule edildi. Ardından  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde 3 gün süreyle inkübasyona bırakılan pleytler  $80^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış etüvde 3 saat boyunca fizyasyona tâbi tutuldu. Ardından tüm gözler 1 kez PBS ile yıkandı. Her göze 200 µl olmak üzere Tween-PBS (1x PBS, %0.05 Tween 20 Merck, 822184) içerisinde 1:300 oranında sulandırması yapılan monoklonal antikor (mAb 1/4/7) eklenerek 90 dakika  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. Aynı koşullar altında sırasıyla 1:300'lük sulandırması yapılan anti-fare konjugatı (Pierce, 31800, ABD) eklendi. İnkübasyon ve tüm gözleri 4 kez PBS ile yıkamayı takiben 1:400'lük sulandırması yapılan strepto-avidinle işaretli HRPO konjugatı (Pierce, 21124, ABD) eklendi ve 90 dk inkübe edildi. Süre sonunda 4 kez PBS ile yıkama yapıldıktan sonra substrat solüsyonu (%0,05  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 2 mg AEC (Sigma, A5754, ABD) / 3 ml di-methyl-formamid (Sigma-Aldrich, 40255, ABD), 4,7 ml Na asetat buffer) ilave edildi. Sonuçlar, substrat ilavesini takip eden 30 dakika içerisinde invert mikroskopta (Nikon Eclipse, TS100, Japonya) kırmızı kahverengi hücre içi boyanma görülmesine göre değerlendirildi.

### PCR için nükleik asit izolasyonu ve cDNA eldesi

Viral nükleik asit ekstraksiyon işlemi ticari olarak temin edilen nükleik asit izolasyon kitiyle (Macherey-Nagel Nucleospin Virus, Almanya) ve üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Takip edilen protokolle elde edilen yaklaşık 30 µl hacmindeki nükleik asit PCR aşamasına kadar  $-80^{\circ}\text{C}$  sıcaklıktaki derin dondurucuda saklandı. cDNA elde etmek amacıyla ticari olarak temin edilen cDNA kiti (Biorad, 170-8891), üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyon sürecinde  $42^{\circ}\text{C}$ ' de 30 dk ve  $85^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dk sıcaklık uygulandı.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu

#### BRV RT-PCR protokolü

BRV için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 7,5 µl nükleaz ari su, 1 µl VP6-F forward primer (50 pmol) ve 1 µl VP6-R reverse primer (50 pmol) (Tablo 1) ve 3 µl cDNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı  $95^{\circ}\text{C}$ ' de 4 dk ön denatürasyon; 35 siklus ( $95^{\circ}\text{C}$  1dk,  $58^{\circ}\text{C}$  1dk sn,  $72^{\circ}\text{C}$  2 dk) ve  $72^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu. BRV RT-PCR da pozitif sonuç veren örneğin tiplendirmesi amacıyla genotip spesifik RT-PCR uygulandı<sup>27</sup>.

Tablo1. Çalışmada kullanılan PCR primerleri

Etken	Hedef Gen Bölgesi	Primerler	Pozisyon	Dizini (5'-3')	Beklenen ürün büyüklüğü	Kaynak
BRV	VP6	VP6-F	747-766	GACGGVGCRACTACATGGT	379	27
		VP6-R	1126-1106	GTCCAAITTCATNCCTGGTGG		
	G Genotiplendirme	Beg9-F	1-28	GGCTTTAAAGAGAGAATTCGCTGG	715	16
		G(10)-R	715-697	TTCAGCGCTTGCGACTTC		
	p Genotiplendirme	Pgen-F	1064-1085	TTCATTATGGGACGATTCACA	335	16
		P[11]-R	1398-1377	TGCTCATATAATTGGTGTCT		
Pestivirus	5'UTR	p-324	108-128	ATGCCCTTAGTAGGCTAGCA	288	28
		p-326	395-375	TCAAATCCATGTGCCATGTAC		
BCoV	N	F1	21-40	GCAATCCAGTAGTAGAGCGT	730	29
		R1	731-750	CTTAGTGGCATCCTTGCCAA		
		F2	79-98	GCCGATCACTCCGCAATG	407	
		R2	467-485	AGAATGTCAGCCGGGTAG		
BToV	M	F	98-700	TTCTTACTACACTTTTGGGA	603	30
		R		ACTCAAACCTAACACTAGAC		
		nF	152-560	TATGTACTATGTTTCAAGCT	409	
		nR		CCAACACAAATCCGCAACGC		

G(10) içi PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Beg9-F forward primer (10 pmol) ve 1 µl G(10)-R reverse primer (10 pmol) (Tablo 1) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı  $95^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus ( $94^{\circ}\text{C}$  1dk,  $55^{\circ}\text{C}$  1dk,  $72^{\circ}\text{C}$  2 dk) ve  $72^{\circ}\text{C}$ ' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu<sup>16</sup>.

P[11] için PCR karışımı toplamda 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 9,5 µl nükleaz ari su, 1 µl Pgen-F forward primer (10 pmol), 1 µl P[11]-R reverse primer (10 pmol) (Tablo 1) ve 1 µl DNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı  $95^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dk ön denatürasyon; 40 siklus ( $94^{\circ}\text{C}$  1dk,  $50^{\circ}\text{C}$  1dk,  $72^{\circ}\text{C}$  2 dk) ve  $72^{\circ}\text{C}$ ' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programı<sup>16</sup>.

### Pestivirus RT-PCR protokolü

PanPestivirus için PCR karışımı toplamda 50 µl olacak şekilde 31,8 µl nükleaz ari su, 5 µl  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 5 µl 10x

PCR buffer, 1,5 µl p324 primeri (10 pmol) ve 1,5 µl p326 primeri (10 pmol) (Tablo 1), 1 µl dNTPs (10mM), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ µl) ve 4 µl 30 cDNA eklener-ek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 94°C' de 2 dk ön denatürasyon; 35 siklus (94°C 1 dk, 56°C 1 dk, 72°C 1 dk) ve 72°C' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu<sup>28</sup>.

### BCoV ve BToV Nested PCR protokolü

Örneklerde BCoV taraması için nested RT-PCR protokolü takip edildi<sup>29</sup>. Birinci aşama için PCR karışımı toplam- da 50 µl olacak şekilde 37,7 µl nükleaz ari su, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5 µl 10x PCR buffer, 1 µl F1 primeri (25 pmol) ve 1 µl R1 primeri (25 pmol) (Tablo 1), 1 µl dNTPs (10mM), 0,3 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl) ve 2 µl cDNA eklener-ek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 94°C' de 4 dk ön denatürasyon; 35 siklus (94°C 1 dk, 58°C 1 dk, 72°C 2 dk) ve 72°C' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu. Elde edilen birinci evre ürünün- den 0,5 µl alınarak reaksiyonun ikinci evresinde kullanıldı. PCR karışım oranlarında değişiklik olmaksızın F2 ve R2 primerleri ile PCR protokolünün ikinci evresi hazırlandı ve aynı thermal-cycler programında 35 siklus olacak şekilde uygulandı.

BToV nested PCR birinci evresi için PCR karışımı toplam- da 25 µl olacak şekilde 12,5 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x), 7,5 µl nükleaz ari su, 2 µl F forward primer (50 pmol) ve 2 µl R reverse primer (50 pmol) (Tab- lo 1) ve 1 µl cDNA eklenerek hazırlandı. Elde edilen PCR karışımı 94°C' de 5 dk ön denatürasyon; 35 siklus (94°C 1 dk, 49°C 1 dk, 72°C 2 dk) ve 72°C' de 7 dk son uzama olacak şekilde thermal-cycler programına tâbi tutuldu. Elde edilen birinci evre ürününden 1 µl ürün, 9 µl nükleaz ari su ile karıştırılıp 1/10 luk sulandırma işlemi yapıldı ve reaksiyonun ikinci evresinde 5 µl ürün kullanıldı. PCR karışım oranlarında değişiklik olmaksızın nF ve nR pri- merleri ile PCR protokolünün ikinci evresi hazırlandı ve aynı thermal-cycler programında 35 siklus olacak şekilde uygulandı<sup>30</sup>.

PCR ürünleri 1x TAE buffer içinde hazırlanan % 2'lik agaroz jelle yüklendi ve 30 dakika boyunca 200 volt elek- trik uygulanarak yürütüldü. Yürütme işlemi sonunda jel görüntüleme sistemi aracılığıyla PCR ürünleri görüntülen- di ve kayıt altına alındı.

### Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE)

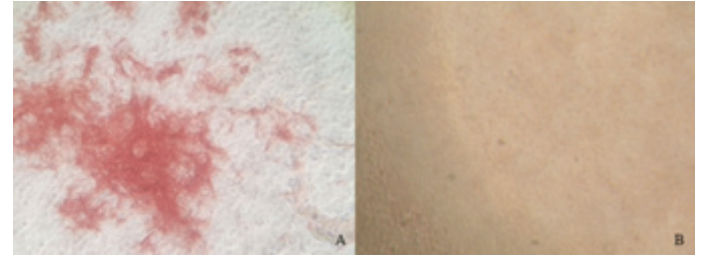
Toplanan 16 adet ishali buzağı dışkı örneğinden BRV Ag ELISA ve BRV RT-PCR ile pozitif tespit edilen bir örnekte BRV nükleik asit segmentlerinin gösterimi PAGE yöntemi-

yle yapıldı. Bu aşamada dışkıdan uygulanan nükleik asit ekstraksiyonu ve PAGE yöntemi ayrıca jelde gümüş nitrat boyaması daha önce bildirilmiş bir protokolda sınırlı mod- ifikasyonlar yapılarak uygulandı<sup>31</sup>.

## Bulgular

Toplanan dışkı örnekleri üç farklı hücre hattında (MDBK, HRT-18 ve MA-104) virus izolasyonuna alınmış olup, uygulanan dört kör pasaj işlemi sonrasında virus izo- lasyonu yapılamamıştır.

MDBK hücre hattında 4. pasaj sonrası, BVDV izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla 5. pasaj işlemi yapıldı ve 24 gözlü pleyt 3 gün etüvde inkübe edildikten sonra IPMA testi uygulandı. BVDV spesifik substrat ilavesi sonrası pozitif kontrol hariç diğer gözlerde kırmızı-kahverengi hücre içi boyanma saptanmadı (Resim.1).



Resim 1. A: Pozitif virus kontrol (BVDV-FLK suşu)(x10 büyütme), B :Negatif kontrol (Enfekte edilmemiş MDBK hücre kültürü)(x10 büyütme)

Tablo 2. PCR ve Ag ELISA sonuçlarına göre tekli ve çoklu enfeksiyon bulunan örnek sayıları

Enterik Virüsler	Pozitif Örnek Sayısı (%)
Tek BRV	0 (%0)
Tek BCoV	2 (%12,5)
Tek BVDV	2 (%12,5)
Tek BToV	2 (%12,5)
BRV + BVDV	1 (%6,25)
BCoV + BToV	1 (%6,25)
BCoV + BVDV	4 (%25)
BVDV + BToV	1 (%6,25)
BVDV + BToV + BCoV	1 (%6,25)
<b>Toplam</b>	<b>14 (%87,5)</b>

16 buzağıdan alınan dışkı örnekleri BRV (BioX Diagnostic BIO K 343/2), BCoV (BioX Diagnostic BIO K 392/2) ve BVDV (IDEXX BVDV Ag/Serum Plus Test) antijen ELISA test kitleri kullanılarak test edildi. 16 örnekten 1 tanesi BRV pozitif, 8 tanesi BCoV pozitif ve 9 tanesi BVDV pozitif olarak tespit edildi (Tablo 3).

BRV, BCoV ve BVDV antijen ELISA ile pozitif tespit edilen örneklerin teyid edilmesi amacıyla aynı örneklere BRV, BVDV RT-PCR ve BCoV nested-PCR yapıldı. Ayrıca 16

örneğin hepsi BToV nested-PCR ile test edildi. BRV Ag ELISA ile pozitif tespit edilen 1 örneğin, BRV-RT PCR ile de pozitif olduğu doğrulandı. G(10) ve P(11) genotipine spesifik primerler ile RT-PCR yapılarak, pozitif tespit edilen BRV örneğinin G10P[11] genotipinde olduğu saptandı. BRV tiplendirmesi amacıyla uygulanan G6, G8, P(1) ve P(5) spesifik RT-PCR testlerinde ise negatif sonuç alındı. BCoV Ag ELISA ile pozitif tespit edilen 8 örnek BCoV nested PCR ile test edildi. PCR'ın 1. evresi sonrası 4 örnek pozitif tespit edilirken, 2. evresi sonrası 7 örneğin pozitif olduğu BCoV nested-PCR ile saptandı. BVDV Ag ELISA ile pozitif tespit edilen 9 örnek panpesti RT-PCR ile test edildi ve 9 örneğin hepsi negatif olarak tespit edildi. BToV varlığı açısından test edilen 16 örnekten 3 tanesi BToV nested PCR'ın 1. evresinde pozitif saptanırken, nested PCR'ın 2. evresi sonrası toplam 5 örneğin BToV pozitif olduğu tespit edildi (Tablo 3).

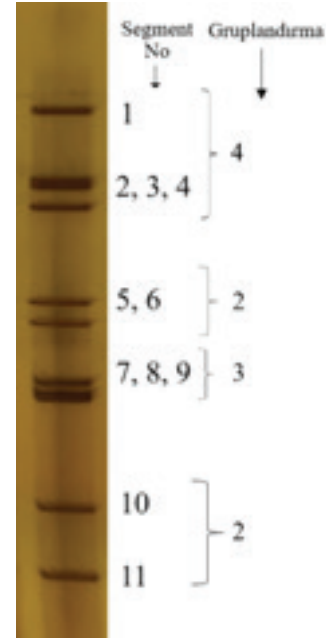
Tablo 3. İshalli dışkı örneklerinde elde edilen virolojik test sonuçları

Sıra No	Örnek ID	IPMA	Antijen (Ag) ELISA			PCR					
			BRV	BCoV	BVDV	BRV	BCoV		Pestivirus	BoTV	
							1.evre	2.evre		1.evre	2.evre
1.	10410	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)
2.	10411	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)
3.	10412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
4.	10413	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
5.	10414	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	10415	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-
7.	10422	-	-	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-
8.	10423	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
9.	10424	-	-	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-
10.	10425	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	10426	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-
12.	10427	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-
13.	10428	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
14.	10429	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)
15.	10430	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
16.	10431	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-

((+): pozitif, (-): negatif, IPMA: immunoperoksidaz testi, BRV: Bovine rotavirus, BCoV: Bovine coronavirus, BVDV: Bovine viral diarrhea virus, BToV: Bovine torovirus)

Çalışma kapsamında dışkı örneklerinden PCR ve Ag ELISA testlerinin sonuçlarına göre, ishal semptomu gösteren 16 buzağıdan alınan dışkı örneklerinin 14 (%87,5) adedinde araştırılan enterik virusların en az bir tanesi tespit edilmiştir. Çalışmada tek BRV enfeksiyonuna rastlanmazken; 2 (%12,5) hayvanda tek BCoV, 2 (%12,5) hayvanda tek BVDV, 2 (% 12,5) hayvanda tek BToV enfeksiyonu saptandı. 1 (%6,25) hayvanda BRV ve BVDV, 1 (%6,25) hayvanda BCoV ve BToV, 4 (%25) hayvanda BCoV ve BVDV, 1 (%6,25) hayvanda BVDV ve BToV ikili enfeksiyonları saptandı. 1 (%6,25) hayvanda BVDV, BToV ve BCoV olmak üzere enterik virusların oluşturduğu üçlü enfeksiyon saptandı (Tablo.2). Örnekleme yapılan 16 hayvandan 2 (%12,5) tanesinde çalışma kapsamında ele alınan enterik viruslara rastlanmadı.

SDS-PAGE testinde akrilamid jel üzerinde RNA segmentlerinin bant profillerine göre BRV segmentlerinin 4/2/3/2 şeklinde sıralandığı görüldü (Resim 2).



Resim 2. BRV pozitif örneğe ait RNA segmentlerinin akrilamid jelde bant profili

## Tartışma ve Sonuç

Buzağı ishalleri dünyada, sığırcılık işletmelerinde yüksek morbitide ile seyreden en önemli sorunlardan biridir. Enfeksiyöz sebepleri oldukça karmaşık olan neonatal buzağı ishallerinde, dünyada enterik viral etkenler arasında BRV, BCoV, BVDV ve BToV'a sıklıkla rastlanılmaktadır<sup>1,2,4,11,18</sup>. Türkiye'de bugüne kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, buzağılama döneminden sonra sıklıkla ishallerin şekillendiği ve gelişme geriliği, tedavi masrafları ve ölümler ile büyük ekonomik kayıplara neden olduğunu tespit edilmiştir<sup>9</sup>.

Enterik virusların hücre kültüründe izolasyonu oldukça zordur. BRV ile ilgili olarak MA-104 hücre hattı ve proteolitik bir enzim olan pankreatin kullanımının, BRV izolasyonu için uygun bir yaklaşım olduğunu bildirmiştir<sup>32</sup>. Virus izolasyon çalışmalarında BCoV ve BToV için HRT-18 hücre hattı<sup>5</sup> ve BVDV izolasyonu için MDBK hücre hattı kullanılmaktadır<sup>26</sup>. Bu doğrultuda yapmış olduğumuz çalışmada olası enterik virusların (BRV, BCoV, BVDV, BToV) tespiti için söz konusu hücre hatları (MA-104, MDBK ve HRT-18) kullanılmıştır.

Multisistemik bir enfeksiyon olarak buzağılarda ve erişkin hayvanlarda tespit edilen BVDV, buzağılarda ishale neden olup dışkı ile de saçılmaktadır<sup>4</sup>. Sahada sıklıkla karşılaşılan olası non-sitopatojen BVDV biyotiplerin tespiti amacıyla IPMA testinin uygulandığı birçok çalışma bulunmak-

tadır <sup>26,33,34</sup>. Bu çalışmada MDBK hücre hattında 5. kör pasaj işlemi sonrası yapılan IPMA testinde pozitif örnek saptanmamıştır. Ayrıca CPE tespitine dayalı olarak değerlendirme yapılan MDBK, HRT-18 ve MA-104 hücre hatlarında 4 kör pasaj sonrası 16 adet dışkı örneğinden olası bir enterik virus izolatı elde edilememiştir. Bu durumun Ag ELISA ve PCR testleri ile tespit edilen pozitifliklerin enfektivitesini kaybetmiş virus partiküllerinin bulunması veya virus izolasyon çalışmalarında üretilmeyen fakat duyarlı test yöntemleri ile varlığı gösterilebilen çok düşük sayıdaki viral partikülün bulunmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Yapılan her iki yöntemin (Ag ELISA ve PCR) diagnostik sensitivite değerinin (tespit alt sınırının) oldukça düşük böylece teşhis kapasitesinin yüksek olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir <sup>7,21,35</sup>. Diğer taraftan örnekleme zamanının dışkıdan virus izolasyonunda oldukça önemli olduğu ve klinik bulguların başlangıç ve pik döneminde alınan örneklerde virus izolasyon şansının yüksek olduğu da bilinmektedir<sup>7,24</sup>. Bu çalışmada viral izolat elde edilememesinin bir nedeni de saha şartlarında örnek alım zamanlamasıyla ilgili olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Yapılmış olan çalışmalarda PCR ve Ag ELISA testleri ile neonatal buzağı ishallerinde doğada sirküle olan enterik virusların (BRV, BCoV, BToV ve BVDV) tespiti bildirilmiştir<sup>5,23,24,34,36</sup>. Yapılan çalışmalarda aynı yöntemler ile tespit edilen tekli veya çoklu enfeksiyonlara sebep olan enterik patojenler ile bu çalışmada tespit edilen viral patojenler benzerlik göstermektedir.

Dünyada buzağılarda neonatal ishale sebep olan enterik virusların (BRV, BCoV, BToV ve BVDV) tekli ve çoklu enfeksiyonları yapılan çalışmada gösterilmiştir <sup>2</sup>. Ülkemizde buzağuların ishal olgularında, dışkıdan PCR metodu ile yapılmış olan çalışmalarda BToV tekli enfeksiyon oranı %4,7 - %16,7 arasında <sup>5,37</sup>, tek BRV enfeksiyon yaygınlığı %6,1 - %37,27 <sup>6,38</sup>, tek BCoV enfeksiyon yaygınlığı %10,8 - %37,27 <sup>6,39</sup> ve ikili BRV ve BCoV enfeksiyon yaygınlığı %4,16 - %18,18 <sup>6,7</sup> oranında tespit edilmiştir. ELISA metodu ile tek BRV yaygınlığı %17,80 - %71,1 <sup>23,40</sup> ve tek BCoV yaygınlığı %1,12 - %15,4 <sup>23,41</sup>; BRV ve BCoV ikili enfeksiyon yaygınlığı %13,4 oranında tespit edilmiştir <sup>23</sup>. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, ülkemizde yapılmış diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Türkiye’de araştırmada ele alınan enterik virusların (BRV, BCoV, BToV ve BVDV) tamamını kapsayan ve aynı hayvanda çoklu enfeksiyon varlığını gösteren veri bulunmamaktadır. Ayrıca ishalleri buzağuların dışkı örneklerinde BVDV yaygınlığı gösteren prevalans çalışmaları kısıtlıdır <sup>4</sup>. Elde edilen sonuçların güncel olması ve çoklu enfeksiyon varlığının

gösterilmesi, sonuçları değerli kılmaktadır.

Çalışmada Ag ELISA ile pozitif tespit edilen örneklerin teyidi için PCR yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla BVDV Ag ELISA ile pozitif tespit edilen örnekler, 5’UTR hedef gen bölgesine göre pan*Pestivirus* RT-PCR testi uygulanmıştır. Klinik örneklerde BVDV Ag ELISA ile tespit edilen pozitif örnek sayısının, RT-PCR testindeki pozitif örnek sayısından yüksek olduğu daha önce bildirilen bir veridir <sup>33</sup>. Bu çalışmada BVDV’ nin tespitinde, BVDV Ag ELISA test sonucuna göre pozitif tespit edilen 9 örneğin tamamının pan*Pestivirus* RT-PCR ile negatif olması, dışkı örneklerinde BVDV tespitinde, BVDV Ag ELISA testinin analitik sensitivitesinin daha yüksek olduğunu teyit etmektedir. Diğer taraftan BCoV Ag ELISA ile pozitif tespit edilen 8 örnekte 7 tanesi BCoV nested-PCR ile pozitif tespit edilmiştir. BRV Ag ELISA ile BRV RT-PCR sonuçları da birbiri ile uyumludur.

*Rotavirusların* farklı P ve G genotiplerinin tespiti, tip spesifik primerler kullanılarak PCR testi ile yapılmaktadır <sup>11</sup>. Dünya genelinde yapılan saha çalışmalarında tespit edilen sığır *rotavirusların* büyük çoğunluğu G6 ve G10 genotipindedir <sup>11,16</sup>. Daha az yaygın olarak G8 genotipi de tespit edilmiştir <sup>16</sup>. Bu genotipler genellikle P[5], P[11] genotipleri ve daha az sıklıkla P[1] genotipi ile ilişkilendirilmiştir <sup>17</sup>. Türkiye’de ishalleri buzağularla yapılan saha çalışmalarda sıklıkla G10P[11] genotipine rastlanmaktadır <sup>11</sup>. Bu çalışmada da PCR testi ile pozitif saptanan rotavirus suşunun, G10P[11] genotipine sahip olduğu tespit edilmiştir.

SDS-PAGE testi dışkıda rotavirus gösterimi için kullanışlı bir yöntem olup 11 segmentli rotavirus genomunun PAGE ile gösterildiği birçok çalışma bulunmaktadır <sup>42,43</sup>. Akrilamid jel üzerinde RNA segmentlerinin bant profillerine göre yapılan çalışmalarda *rotavirusların* A (4/2/3/2), B (4/2/2/3) ve C (4/3/2/2) gruplarına ayrıldığı gösterilmiştir <sup>42</sup>. Bu çalışmada tespit edilen segmentler 4/2/3/2 şeklinde sıralanmıştır (Resim 2). Bu sonuçlar, Ag ELISA ve PCR ile pozitif tespit edilen rotavirus örneğinin, SDS-PAGE testinde segmentlerin bant profillerine göre grup A’da olduğunu göstermektedir.

Sürü yönetiminde dikkatle takip edilmesi gereken hususlardan biri de hastalıktan korunma amacıyla biyogüvenlik tedbirleri ve aşı programlarının uygulanmasıdır. Bu çalışmaya konu olan örneklerin temin edildiği işletmede erişkin sığırlarda BVDV, BRV ve BCoV aşılama programları uygulanıyor olmasına rağmen buzağılarda bu denli yüksek oranlı pozitif vakaların tespit edilmesi beklenen

bir tablo değildir. Dolayısıyla bu gibi durumlarda özellikle kolostrum beslemesinin etkinliğinin sorgulanması ve buzağularda pasif transfer yetmezliği sorununa odaklanması yararlı olacaktır.

Ülkemizde neonatal dönemdeki buzağı kayıplarında ishal kaynaklı mortalite oranları çiftliklere ve bölgelere göre değişmekle birlikte, koruyucu veteriner hekimlik hizmetlerinin uygulandığı çiftliklerde dahi yüksek oranlara ulaşabilmektedir. Buzağı ishali ile ilgili hastalık kontrolü, genotip prevalansı, bulaşma koşulları, aşı etkinlik çalışmaları gibi epidemiyolojik çalışmaların sınırlı düzeyde olması nedeniyle, bu alandaki olguların incelenmesi ve raporlanması önem arz etmektedir. Bu araştırmada neonatal buzağı ishallerine sebep olabilen önemli viral etkenler olan BRV, BCoV, BVDV ve BToV' un aynı işletmede eş zamanlı olarak görülebileceği ve şiddetli hastalık bulguları ve kayıplara neden olabileceği gösterilmiştir.

## Teşekkür

Bu makale BUÜ-BAP tarafından desteklenen DDP(V)-2020/12 numaralı ve "Buzağı ishal olgularında Bovine Rotavirus (BRV) ve Bovine Coronavirus (BCoV) tespiti ve karakterizasyonu" başlıklı tez projesinden üretilmiştir. Özer Ateş ayrıca TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) bursuyla da desteklenmiştir (Proje No: 118 G 012).

## Kaynaklar

1. Shi Z, Wang W, Chen C, et al. First report and genetic characterization of bovine rotavirus in diarrhoeic calves in China. *BMC Vet Res.* 2020;16(1):1-7. doi:10.1186/s12917-020-02494-1
2. Duckmanton L, Carman S, Nagy E, Petric M. Detection of bovine rotavirus in fecal specimens of calves with diarrhea from ontario farms. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1266-1270. doi:10.1128/JCM.36.5.1266-1270.1998
3. Keleş İ, Ekinçi G, Tüfekçi E, et al. Etiological and predisposing factors in calves with neonatal diarrhea: a clinical study in 270 case series. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2022;28(3):315-326. doi:10.9775/kvfd.2021.26981
4. Hou P, Zhao G, Wang H, He H. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle herds in eastern China. *Trop Anim Health Prod.* 2019;51(4):791-798. doi:10.1007/s11250-018-1751-z
5. Gülaçtı I, Işidan H, Sözdutmaz I. Detection of bovine rotavirus in fecal specimens from calves with diarrhea in Turkey. *Arch Virol.* 2014;159(7):1623-1627. doi:10.1007/s00705-014-1977-7

6. Aksoy E, Kara E, Yagcı Bb, Azkur K. Kırıkkale ve çevre illerindeki neonatal ishalleri buzağularda sığır koronavirus ve sığır rotavirus varlığının araştırılması. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü Derg.* 2021;9(3):38-46. doi:10.24998/maeusabed.1010683
7. Saklı G, Bulut O, Hasoksuz M, Hadımlı H. Investigation of bovine coronavirus and bovine rotavirus by rapid diagnosis kit and RT-PCR in diarrheic calf feces. *J Istanbul Veterinary Sciences Rev.* 2017;3(3):89-94. doi:10.30704/http-www-jivs-net.601639 To
8. Constable PD. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J Vet Intern Med.* 2004;18(1):8-17. doi:10.1892/0891-6640(2004)18<8:AUITTO>2.0.CO;2
9. Şahal M, Terzi OS, Ceylan E, Kara E. Buzağı ishalleri ve korunma yöntemleri. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg.* 2018;58:41-49.
10. Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SVS. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun.* 2009;33(1):1-23. doi:10.1007/s11259-008-9070-x
11. Alkan F, Ozkul A, Oguzoglu TC, et al. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. *Vet Microbiol.* 2010;141(3-4):231-237. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.016
12. Elkady G, Zhu J, Peng Q, et al. Isolation and whole protein characterization of species A and B bovine rotaviruses from Chinese calves. *Infect Genet Evol.* 2021;89:104715. doi:10.1016/j.meegid.2021.104715
13. Otto PH, Rosenhain S, Elschner MC, et al. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet Microbiol.* 2015;179(3-4):168-176. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.021
14. da Silva Medeiros TN, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. G and P genotype profiles of rotavirus A field strains circulating in beef and dairy cattle herds in Brazil, 2006-2015. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2019;64(July 2018):90-98. doi:10.1016/j.cimid.2019.03.002
15. Park GN, Kim DI, Choe S, et al. Genetic diversity of porcine group a rotavirus strains from pigs in South Korea. *Viruses.* 2022;14(11)(2522). doi:https://doi.org/10.3390/v14112522
16. Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A, Tollis M. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37(12):3879-3882. doi:10.1128/jcm.37.12.3879-3882.1999
17. Abdou NEMI, Majeed QAH, Saad AA, Mijatovic-Rustempasic S, Bowen MD, Samy A. Cross-sectional study



- and genotyping of rotavirus-A infections in ruminants in Kuwait. *BMC Vet Res.* 2021;17(1):4-11. doi:10.1186/s12917-021-02944-4
18. Zhu Q, Su M, Li Z, et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. *Virus Res.* 2022;308(November 2021). doi:10.1016/j.virusres.2021.198632
  19. Shin J, Tark D, Le VP, et al. Genetic characterization of bovine coronavirus in Vietnam. *Virus Genes.* 2019;55(3):415-420. doi:10.1007/s11262-019-01647-1
  20. Houe H, Lindberg A, Moennig V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagnostic Investig.* 2006;18(5):427-436. doi:10.1177/104063870601800501
  21. Laamanen UI, Neuvonen EP, Yliviuhkola EM, Veijalainen PML. Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. *Res Vet Sci.* 1997;63(3):199-203. doi:10.1016/S0034-5288(97)90020-5
  22. Yeşilbağ K, Alpay G, Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses.* 2017;9(6). doi:10.3390/v9060128
  23. Feray A. Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. *Ankara Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* 1998;45(1):1. doi:10.1501/vetfak\_0000000609
  24. Pestil Z, Gülyaz V, Hasöksüz M. Marmara bölgesinde yeni doğan buzağı ishallerinde bovine coronavirusların saptanması ve patojenite çalışması. *Etlik Vet Mikrobiyoloji Derg.* 2016;27(1):16-20. doi:10.35864/evmd.514149
  25. Tokgöz Bs, Özdemir R, Turut N, et al. Adana bölgesinde görülen neonatal buzağı enfeksiyonlarının morbidite ve mortaliteleri ve risk faktörlerinin belirlenmesi. *Adana Vet Kontrol Araştırma Enstitüsü Derg.* 2013;3(1):7-14.
  26. Alpay G, Yeşilbağ K. Serological relationships among subgroups in bovine viral diarrhoea virus genotype 1 (BVDV-1). *Vet Microbiol.* 2015;175(1):1-6. doi:10.1016/j.vetmic.2014.10.034
  27. Iturriza Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of vp6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 2002;76(13):6596-6601. doi:10.1128/jvi.76.13.6596-6601.2002
  28. Vilček Š, Nettleton PF, Paton DJ, Belák S. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol.* 1997;78(4):725-735. doi:10.1099/0022-1317-78-4-725
  29. Jenkinson CP, Hanson R, Cray K, et al. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhoea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch Virol.* 2001;146(12):2401-2419. doi:10.1007/s007050170011
  30. Park SJ, Jeong C, Yoon SS, et al. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhoea during the warmer seasons. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3178-3188. doi:10.1128/JCM.02667-05
  31. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol.* 1982;16(3):473-477. doi:10.1128/jcm.16.3.473-477.1982
  32. Bohl EH, Theil KW, Saif LJ. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 1984;19(2):105-111. doi:10.1128/jcm.19.2.105-111.1984
  33. Toker EB, Yeşilbağ K. Molecular characterization and comparison of diagnostic methods for bovine respiratory viruses (BPIV-3, BRSV, BVDV, and BoHV-1) in field samples in northwestern Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 2021;53(1). doi:10.1007/s11250-020-02489-y
  34. Yeşilbağ K, Förster C, Ozyiğit MO, et al. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet Microbiol.* 2014;169(1-2):42-49. doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.005
  35. Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunn AA, House JK. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J.* 2011;89(5):167-173. doi:10.1111/j.1751-0813.2011.00692.x
  36. Hoet AE, Nielsen PR, Hasoksuz M, Thomas C, Wittum TE, Saif LJ. Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhoea cases in cattle. *J Vet Diagnostic Investig.* 2003;15(3):205-212. doi:10.1177/104063870301500301
  37. Aydın H, Timurkan MO, Kirmizi GA. Sequence analysis of Turkish field strains of bovine torovirus shows unique amino acid changes in the partial M gene. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2019;9(3):129-134. doi:10.4103/2221-1691.254607
  38. Aydın H, Timurkan MÖ. Partial sequence and phylogenetic analysis of the nucleoprotein gene of coronavirus and VP7/VP4 gene of rotavirus in calf diarrhoea. *Ataturk Univ Vet Bilim Derg.* 2018;13(2):211-218. doi:10.17094/ataunivbd.372439
  39. Alkan F, Ozkul A, Bilge-Dagalp S, et al. The detection and genetic characterization based on the S1 gene region of bcovs from respiratory and enteric infections

- in turkey. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58(2):179-185. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01194.x
40. Yazıcı Z, Akça Yılmaz. Buzagılarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyon. *1993;40(2):231-240.*
  41. Çabalar M, Kaya A, Arslan S. Yeni doğan buzağuların ishal olgularında rotavirus ve coronavirus araştırılması. *Vet Bil Derg.* 2007;23(3-4):103-106.
  42. Barman P, Ghosh S, Das S, et al. Sequencing and sequence analysis of VP7 and NSP5 genes reveal emergence of a new genotype of bovine group B rotaviruses in India. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2816-2818. doi:10.1128/JCM.42.6.2816-2818.2004
  43. Rahman M, Banik S, Faruque ASG, et al. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4460-4465. doi:10.1128/JCM.43.9.4460-4465.2005