

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

BUZAĞILARDA ENTERİK BOVİNE CORONAVİRUS
ENFEKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI VE EPİDEMİYOLOJİDE
KLİNİK OLARAK SAĞLIKLI SIĞIRLARIN ROLÜ

DOKTORA TEZİ
Vet. Hek. Sibel HASIRCIOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK

Konya 2005

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

BUZAĞILARDA ENTERİK BOVINE CORONAVİRUS ENFEKSİYONLARININ
ARAŞTIRILMASI VE EPİDEMİYOLOJİDE KLİNİK OLARAK SAĞLIKLI
SİĞİRLARIN ROLÜ

DOKTORA TEZİ

SİBEL HASICIOĞLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 25 / 03 / 2005 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği* ile kabul edilmiştir. (S.B.E. Yön. Kur. Karar tarih ve No:)

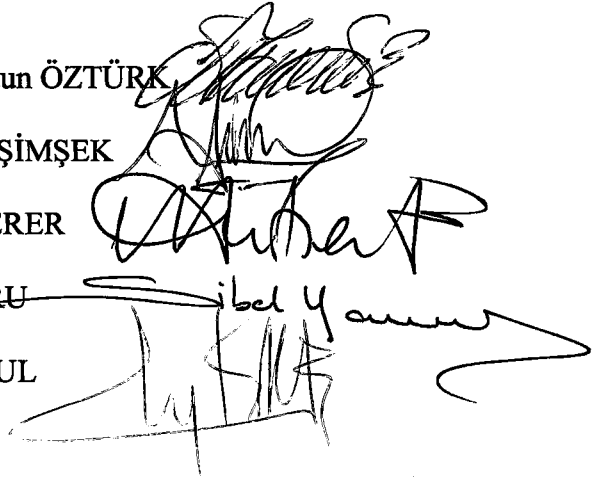
Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK

Danışman: Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK

Üye: Prof. Dr. Hüdaverdi ERER

Üye: Prof. Dr. Sibel YAVRU

Üye: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I-II
TABLO LİSTESİ.....	III
RESİM LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR.....	V
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1. Coronavirusların Sınıflandırılması.....	3
2.2. Coronavirusların Virion Yapısı.....	4
2.3. Coronavirusların Çoğalma Özellikleri	6
2.4. Bovine Coronavirusun Sebep Olduğu Hastalıklar	7
2.4.1. Buzağı ishalleri	8
2.4.1.1 Epidemiyoloji.....	8
2.4.1.2.Patogenez ve patoloji	10
2.4.1.3.Klinik belirtiler.....	12
2.4.1.4.Teşhis.....	13
2.4.1.5.Tedavi.....	18
2.4.1.6. İmmunite, koruma ve kontrol.....	18
2.4.2.Kış Dizanterisi (Winter dysentery, Epizootic diarrhoea).....	21
2.4.3.Solunum yolu enfeksiyonları.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1.Materyal.....	25
3.1.1. Dışkı örnekleri	25
3.1.2. Serum örnekleri	25
3.1.3. Eritrosit	25
3.1.4. Hücre Kültürleri	25
3.2. Metot	26
3.2.1. Virolojik Çalışma.....	26
3.2.1.1. ELISA ile bovine coronavirus antijen tespiti.....	26
3.2.1.2. Hemaglutinasyon.....	27
3.2.1.2.1. Eritrosit hazırlanışı.....	27
3.2.1.2.2. Testin yapılışı.....	27
3.2.1.3. Virus izolasyonu.....	28

3.2.1.3.1. Hücre kültürlerinin hazırlanması.....	28
3.2.1.3.2. Dışkı örneklerinin hazırlanması.....	28
3.2.1.3.3. Virus izalasyonu amacıyla hücre inokulasyonu	28
3.2.2. Serolojik Çalışma	29
3.2.2.1. Serum örneklerinin hazırlanması	29
3.2.2.2. ELISA ile bovine coronavirusa spesifik antikor tespiti.....	29
4. BULGULAR	31
4.1. Antijen-ELISA Sonuçları	31
4.2. Hemaglutinasyon Test Sonuçları.....	31
4.3. Hücre Kültüründe Virus İzolasyon Sonuçları.....	31
4.2. Antikor-ELISA Sonuçları.....	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
6. ÖZET.....	48
7. SUMMARY	49
8. LİTERATÜR LİSTESİ.....	50
9. ÖZGEÇMİŞ	58
10. TEŞEKKÜR	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.	Coronavirusların antijenik grupları, doğal konakçıları ve sebep olduğu hastalıklar.....	4
Tablo 4.1.	Dışkı örneklerinde antijen-ELISA sonuçları.....	34
Tablo 4.2.	Kan serumu örneklerinde antikor-ELISA sonuçları.....	34
Tablo 4.3.	Hem anne hem de yavrusundan kan örneği alınabilen hayvanların serolojik test sonuçları	34
Tablo 4.4.	Antijen pozitif buzağılara ait dışkıların ELISA OD değerleri ve hücre kültüründe virus izolasyon sonuçları	34
Tablo 4.5.	Araştırmada kullanılan buzağı ile annelerinin yaşı ve ELISA sonuçları.....	35
Tablo 4.6.	Anneler haricinde dışkı örnekleme yapılan 14 adet yetişkin dişi hayvanın durumu.....	36

RESİM LİSTESİ

Resim 4.1.	Antijen-ELISA pleytinde bir buzağıya ait dışkının pozitif reaksiyonu (Okla gösterilmiştir) (3 nolu pleyt)	32
Resim 4.2.	Antikor-ELISA sonuçları (1 nolu pleyt).....	33
Resim 4.3.	Hemaglütinasyon test sonuçları	33



KISALTMALAR

BCV	Bovine coronavirus
BVD	Bovine viral diarrhea
BRCV	Bovine respiratory coronavirus
BECV	Bovine enteric coronavirus
BEL	Bovine embryonic lung
BFB	Bovine fetal brain
°C	Derece santigrat
CPE	Cytopathogenic effect
DEM	Direkt elektronmikroskopi
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EM	Elektronmikroskopi
FDB	Föetal dana böbrek
gp	Glikoprotein
HE	Hemaglutinin esteraz
HRT-18	Human rectal tümör-18
HRPO	Horseradish peroksidase
IF	Immunofloresans
IEM	İmmunelektronmikroskopi
Ig	İmmunoglobulin
IHA	İndirekt hemaglutinasyon
IP	Immunoperoxidase
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
mg	Miligram
nm	Nanometre
OD	Optical Density

PAG-IEM	Protein A gold immuno elektronmikroskopi
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Asitlik değeri
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonükleik Asit
S	Spike
μl	Mikrolitre



1. GİRİŞ

İshal, dehidrasyon ve ağırlık kaybı ile seyreden enterik enfeksiyonlar, tüm dünyada buzağuların önemli bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Çok sayıda enteropatojenin sebep olduğu ishalin şiddeti; çevre, sürü yönetim biçimi ve konakçı faktörleri gibi unsurlarla etkenin etkileşimine bağlıdır. Hem etçi hem de sütçü sürülerde görülen buzağı ishalleri; ölüm, genetik materyallerin kaybı, yüksek tedavi masrafları ve buzağuların ilerideki yaşamlarında normal performanslarına ulaşamamaları gibi nedenlerden dolayı belirgin ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Bütün dünyada yaygın olarak görülen ve büyük ölçüde ekonomik kayıplara neden olan buzağı ishallerinin etiyolojisinde, bovine coronavirus (BCV)'un önemli bir yeri olduğu ileri sürülmektedir (Czerny ve Eichhorn 1989). Bovine coronavirus ile intestinal kanalın enfeksiyonu, ince bağırsakların proksimalinde başlamakta, ince ve kalın bağırsak boyunca yayılmakta, buzağılarda ishalle seyreden şiddetli bir enfeksiyona ve yüksek mortaliteye neden olduğu bildirilmektedir. Bovine coronavirustan etkilenen buzağılarda; dehidrasyon, elektrolit dengesizliği ve asidozise neden olan şiddetli bir ishal görülmekte, enfeksiyondan kurtulan buzağılar ise genellikle potansiyel verimlerini ortaya koyamamaktadırlar. Modern buzağı işletmelerinde bile buzağı ishallerine bağlı kayıplar bazen büyük boyutlara ulaşmaktadır.

Bovine coronavirus her yaş grubundaki sığırları farklı biçimlerde etkileyebilmekte, şiddetli ishal olgularının gözleendiği buzağılarda ise en tipik bulgular yaşamın ilk aylarında ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyon kış aylarında daha etkili ve yaygın olarak gözlenmektedir. Bu mevsimsel görünüm, virusun soğuk ve nemli çevrede daha uzun süre canlı kalabildiğinin bir göstergesi olarak düşünülmektedir. Bunun yanısıra klinik olarak normal görünümlü yetişkin sığırların da hassas buzağılar için enfeksiyon kaynağı olabileceği ileri sürülmekte bu tür hayvanların dışkılarında BCV'un yüksek oranlarda (% 70'in üzerinde) tespit edilebildiği

bildirilmektedir (Colins ve ark 1987, Crouch ve ark1985). Bu nedenle subklinik enfeksiyona sahip hayvanlardan doğan buzağıllarda ishalin gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu düşünölmektedir.

Bu çalışmada, sığircılık işletmelerinde ekonomik olarak büyük kayıplara yol açan buzağı ishallerinin etiyoöojisinde BCV'un yeri ve öneminin tespiti, klinik olarak sağlıklı görünen yetişkin sığırlların bu enfeksiyonun epidemiyolojisinde rolünün olup olmadığının belirlenmesi ve mevcut antikor yanıtının enfeksiyonu önlemesi açısından değerlendirilmesi amacıyla ishelli buzağılların ve bunların annelerine ait kan serumlarının BCV antikorları yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİ

İlk defa 1968’de elektronmikroskop (EM) ile morfolojik olarak tanımlanan coronaviruslar; memeli ve kanatlı hayvanların patojen etkenlerini içine alan geniş bir virus familyasını temsil etmektedir (Mostl 1990). Coronaviruslar özellikle sığır, köpek, kedi, kanatlı, tavşan, fare, sıçan ve domuz gibi vertebralı hayvanlarda solunum ve gastrointestinal sistem başta olmak üzere farklı birçok organda, özellikle yeni doğanlarda intestinal kanalda enfeksiyonlara yol açarak çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Coronaviruslar, özellikle Uzakdoğu ülkelerinde yaşayan insanlarda ortaya çıkan ve akut üst solunum yolları enfeksiyonlarına neden olan SARS (severe acute respiratory syndrome) virusu ile son yıllarda güncelliğini koruyan bir familya olarak dikkat çekmektedir (Oxford ve ark 2003, Holmes ve Enjuanes 2003).

2.1. Coronavirusların Sınıflandırılması

Nidovirales dizini içerisinde yer alan *Coronaviridae* familyası, coronavirus ve torovirus olmak üzere iki cinsi içine almaktadır. *Nidovirales* dizini içerisinde yer alan coronavirus, torovirus ve arteriviruslar, virion yapısı ve genom büyüklüğündeki farklılıklara rağmen, çoğalma stratejileri ve genom organizasyonu açısından benzerlikler sergilemektedirler. Bu virusların tümü, enfekte ettikleri hücrelerde “nested set” adı verilen bir transkripsiyon stratejisi kullanarak çoğalmaktadırlar. Bu strateji, *Nidovirales* (latince “yuva” anlamına gelen nidus=nest) dizinininde yer alan viruslara özgü olarak kabul edilmektedir (Murphy ve ark 1999, White ve Fenner 2000).

Coronaviruslar, antijenik ve genetik olarak 3 grup altında sınıflandırılmaktadır (Holmes ve Lai 1996, Lai ve Cavanagh 1997, Saif 2004). Her grup konakçı, nükleotid dizilim ve serolojik akrabalığa göre ayırt edilmektedir (Tablo 2.1). İnsanlardaki SARS coronavirusu ile vahşi hayvanlarda saptanan 2 adet SARS benzeri coronavirus (Civet cat coronavirus ve Raccoon

dog coronavirus) filogenetik analizler sonucu řu anda geçici olarak grup IV içerisinde sınıflandırılmaktadır (Saif 2004). Coronavirus familyası içinde yer alan etkenler, genellikle tek bir tırde ya da birbirine çok benzeyen tırler arasında doğal enfeksiyona neden olmaktadır. Virusun organizmaya girişinden sonra replikasyonun birkaç hşcre tipinde sınırlı kalması sonucu (genellikle solunum ya da enterik sistem epitel hşcreleri ve makrofajlar) lokal, bu replikasyonun in vivo yayılımı neticesinde ise sistemik enfeksiyon şekillenebilmektedir (Holmes ve Lai 1996).

Tablo 2.1. Coronavirusların grupları, doğal konakçıları ve sebep olduğu hastalıklar

Grup	Virus	Konakçı	Solunum Yolu Enfeksiyonu	Enterik Enfeksiyon	Hepatitıs	Nşrolojik Enfeksiyon	Diğer ^a
I	HCV-229E	İnsan	X				
	TGEV	Domuz	X	X			X
	CCV	Kşpek		X			
	FECV	Kedi		X			
	FIPV	Kedi	X	X	X	X	X
	RbCV	Tavşan					X
II	HCV-OC43	İnsan	X	?			
	MHV	Fare	X	X	X	X	
	SDAV	Rat				X	
	HEV	Domuz	X	X			
	BCV	Sığır	X	X			
	RbEVC	Tavşan			X		
III	TCV	Hindi	X	X			
	IBV	Tavuk	X		X		X

^aİnfeksiyşz peritonitis, immunolojik bozukluklar, zayıflama, nefritis, pankreatitis, parotitis ve adenitis gibi coronavirusların neden olduğu diğer hastalıklar.

HCV-229E, human respiratory coronavirus; TGEV, porcine transmissible gastroenteritis virus; CCV, canine coronavirus; FECV, feline enteric coronavirus; FIPV, feline infectious peritonitis virus; TCV, turkey coronavirus; HCV-OC43, human respiratory coronavirus; MHV, mouse hepatitis virus; SDAV, sialodacryoadenitis virus; HEV, porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; BCV, bovine coronavirus; RbCV, rabbit coronavirus; IBV, Infectious bronchitis virus (KV Holmes ve MMC Lai 1996, L Saif 2004).

Hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyona yol açan coronavirusların bşyşk bir çoğunluğu tek serotip içermekle beraber en az 8 serotip tespit edilen IBV bir istisna olarak kabul edilmektedir. FIPV ve FECV'ları ise tek serotip ihtiva etmelerine rağmen, enfektivite ve virulensleri şnemli derecede değişiklik arzeden çeşitli biyotipler içermektedirler (Murphy ve ark 1999, Saif ve Heckert 1990).

2.2. Coronavirusların Virion Yapısı

Bu familyaya yüzeysel çıkıntıları nedeniyle latince taç anlamına gelen corona adı verilmiştir. Virionun en dış kısmında bir zara sahip olan coronaviruslar; pleomorfik (genellikle küresel) yapıda ve 80–220 nm (ortalama 100 nm) çapındadırlar (Clark 1993, Murphy ve ark 1999). Helikal simetrik kapsit tübüler bir yapıdadır (White ve Fenner 2000). RNA virüsleri arasında en büyük genoma sahip olan coronaviruslar; doğrusal (linear), segmentsiz, tek iplikçikli, pozitif polariteli, $5-6 \times 10^6$ moleküler ağırlığında ve 27-32 kilobase (kb) uzunluğunda bir genetik materyale sahiptir. Enfeksiyöz olan genomik RNA, 5' uçta başlık (cap)' lanmış ve 3' uçta poliadenile olmuştur (Kapil ve ark 1999, White ve Fenner 2000).

Coronavirüslerde virionun yapısını oluşturan proteinler; nükleokapsit (N) proteini, peplomer (S), transmembran (M) ve küçük transmembran (E) glikoproteini'dir. S, M ve E glikoproteinleri zarın yapısına katılan proteinlerdir. Bu proteinlerden E glikoproteini, M glikoproteini ile birlikte virion oluşumu için esastır. Bu proteinlerin yanısıra, BCV'un da içinde bulunduğu antijenik grup II coronaviruslarında, daha küçük peplomerleri oluşturan hemaglutinin-esterase (HE) glikoproteini bulunmaktadır (Lai ve Cavanagh 1997, Murphy ve ark 1999).

Viral zarın üzerinde yaygın olarak bulunan 20 nm uzunluğundaki, yüksek oranda glikozilasyona uğramış olan S (spike) glikoproteini (180-220 kDa), uç kısmı yumrucuk şeklindeki çıkıntılar tarzında ışınal bir dizilime sahiptir ve virusa taçlı bir görünüm verir. S glikoproteininin bazı önemli fonksiyonları arasında virusa karşı nötralizan antikorların oluşumunu uyarma, hedef hücre reseptörlerine bağlanma, hücre membranının füzyonu ve hemaglutinasyon işlevi sayılabilmektedir. Bu membran glikoproteini, amino (S1) ve karboksi (S2) uçlarına yakın olan farklı fonksiyonel sahalar taşımaktadır. S1 alt ünitesi, periferaldedir ve reseptörlere bağlanma fonksiyonları ile ilgilidir. S2 alt ünitesi ise viral ve hücrel

membranların füzyonuna aracılık eden bir transmembran proteindir (Clark 1993, Hasöksüz ve ark 2002b).

Bovine coronavirus ve insan coronaviruslarından OC43 suşu gibi antijenik grup II'de yer alan coronaviruslar, hemaglütinin-esteraz (HE) adı verilen daha kısa yapıdaki (yaklaşık 5 nm) ikinci bir peplomere sahiptirler (Clark 1993, Murphy ve ark 1999). Hemaglütinasyon özelliğine sahip olan glikoprotein yapısındaki bu uzantılar, hem nötralizan hem de hemaglütinasyonu inhibe eden antikoları uyarmaktadırlar (Saif 1993). Ancak S glikoproteini, aglütinasyon için eritrositlerin yüzeyinde daha az reseptöre ihtiyaç duyduğundan, HE'dan daha önemli hemaglütininler olarak kabul edilmektedir (Shultz ve ark 1991). Ayrıca esteraz aktivitesi gösteren HE, reseptöre bağlanma ve tahrip etme fonksiyonuna sahiptir. HE glikoproteini, influenza C virusunun hemaglütinin-esteraz füzyon proteininin (HEF) N-terminal alt ünitesi ile % 30 benzerlik göstermektedir (Murphy ve ark 1999).

Fosforilasyona uğramış olan N proteini, direkt olarak transmembran glikoproteini M'ye bağlanmış halde bulunur. Zarın oluşumuna katılan M glikoproteini, diğer bazı virüslerde bulunan matriks proteininin işlevini görmektedir (Murphy ve ark 1999).

2.3. Coronavirusların Çoğalma Özellikleri:

Coronavirusların kendine özgü bir replikasyon stratejisi vardır. Nispeten yavaş olan virus replikasyonu, tamamen hücre stoplazması içinde gerçekleşir. Coronaviruslar; hedef hücre membranı üzerindeki reseptörlere hem S hem de HE glikoproteinleri vasıtasıyla tutunurlar. Virusun hücreye girme mekanizması ya hücrenin plazma membranı ile virus zarının direkt füzyonu ya da endositik veziküllerin membranları ile virus zarının füzyonu sonucu gerçekleşen endositoz ile olmaktadır (Clark 1993).

Virus hücreye girdikten sonra zarından ayrılır. Pozitif polariteli genomik RNA'nın sitoplazma içine salınmasından sonra önce ribozomlara tutunur ve RNA'ya bağımlı RNA

polimeraz enziminin senteziyle replikasyon devam eder. Bu enzim, pozitif polariteli genomik RNA'dan, negatif polariteli RNA'yı kopyalamaktadır. Bu negatif polariteli RNA'dan yeni genomik RNA, subgenomik mRNA'ların bir serisi ve lider RNA kopyalanmaktadır (White ve Fenner 2000). Bu subgenomik mRNA'lar, nested set'in 3' ucundan transkribe edilir. Hem genomik RNA ve hem de subgenomik mRNA'ların 5' ucu başlıklanmış (cap), 3' ucu poliadenile edilmiştir. Her bir mRNA bir sonraki en küçük mRNA'nın nükleotid dizilimlerine ve ayrıca 5' ucunda extra bir gene sahiptir. 5' ucu aynı zamanda 60-70 bazdan oluşan ortak bir lider dizilim içerir. Bu lider dizilimin, sürekli olmayan transkripsiyon mekanizması yardımıyla negatif polariteli RNA'nın 3' ucundan köken aldığı ileri sürülmektedir. Bu modelde negatif polariteli RNA'nın 3' ucundan transkribe olan lider RNA, şablon RNA'dan ayrılır ancak polimeraz enzimine bağlı olarak kalır. Bu lider dizilim-polimeraz kompleksi, kalan mRNA'nın sentezi için primer olarak görev yaptığı bölgeler olan, negatif polariteli RNA üzerindeki yeniden başlangıç bölgeleri olarak isimlendirilen spesifik kodlanmamış bölgelere baz çiftleri ile bağlanır. mRNA sentezinin bu modeli, coronavirus mRNA'larının kendi kendine replike olması (self-replication) ihtimalinden dolayı halen tam açıklık kazanmamıştır (Clark 1993).

mRNA'ların sadece 5' ucuna yakın olan özgün dizilimleri translasyona uğramaktadır ve her bir mRNA sadece bir protein sentezine yönelir (Siddell ve ark 1983). Bu translasyonda; yapısal olmayan proteinler hücre stoplazmasındaki serbest ribozomlarda, yapısal proteinler ise granüler endoplazmik retikulumdaki (RER-rough endoplasmic reticulum) ribozomlarda sentezlenir. Olgun virus partikülleri (virion), RER ve golgi kompleksinden tomurcuklanma ile zarlarını kazanırlar. Virus partiküllerinin bir kısmı hücrelerin erimesi ile salınırken; çoğu normal hücre salgı mekanizmasını kullanarak sağlam hücrelerden dışarı dökülürler (Clark 1993).

2.4. Bovine Coronavirusun Sebep Olduğu Hastalıklar

Bovine coronavirus, sığırlarda genel manada üç farklı klinik sendroma neden olmaktadır (Saif 2004). Bunlar; buzağılarda ishal (Bridger ve ark 1978, Reynolds ve ark 1986, Tsunemitsu ve ark 1991), erişkin sığırlarda kış dizanterisi (Durham ve ark 1989, Benfield ve Saif 1990, Athanassious ve ark 1994) ve farklı yaş gruplarındaki sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonlarıdır (McNulty ve ark 1984, Hasöksüz ve ark 2005). Hastalıkların klinik bulgularındaki farklılığa rağmen bütün BCV izolatlarının tek bir serotipe ait olduğu düşünölmektedir. Bununla birlikte, solunum sistemi (BRCV-Bovine respiratory coronavirus) ve intestinal kanalda (BECV-Bovine enterik coronavirus) enfeksiyon oluşturan BCV'lar arasındaki genetik ve antijenik ilişki hakkında farklı görüşler bildirilmiştir (Fukutomi ve ark 1999, Hasöksüz ve ark 1999a, Hasöksüz ve ark 1999b, Kapil ve ark 1999).

2.4.1. Buzağı ishalleri

Coronavirus familyasının antijenik grup II içerisinde yer alan BCV'un, ilk defa Mebus ve ark (1973) tarafından Amerika'da ishalleri bir buzağının dışkısından hazırlanan inokulumun fetal dana böbrek hücre kültürüne seri pasajları sonunda izole edildiği bildirilmiştir.

2.4.1.1 Epidemiyoloji

İntestinal kanalın BCV ile enfeksiyonu, genellikle enfekte dışkı ile bulaşık yem veya suyun oral yolla alınması sonucu gerçekleşmektedir. Bovine coronavirusun, buzağılarda fekal-oral yolun yanı sıra aerosol yolla da taşınabildiğine dair bilgiler mevcuttur (Saif ve ark 1986, Tsunemitsu ve ark 1991, Hasöksüz ve ark 2005). Hasöksüz ve ark (2002a), Amerika'da besiye yeni alınan hayvanların oluşturduğu bir sürüde ilk önce BCV'a özgü solunum sistemi belirtileri, besiye alındıktan 4 gün sonra ishal semptomu gözlemlenen araştırmadan yola çıkarak, BCV'un ilk önce buzağuların solunum sistemini enfekte ettiği daha sonra enfeksiyonun bağırsaklara yayılarak ishal oluşturduğu fikrini ileri sürmüşlerdir. Yine

Cho ve ark (2001a) tarafından, gnotobiyotik ve kolostrum almamış buzağılara respiratorik izolatların inokule edilmesi sonucu virusun nazal ve rektal olarak saçıldığı ve ishale neden olduğunun tespit edilmesi bu fikri kuvvetlendirmektedir. Ancak Hasöksüz ve ark (2002b) respiratorik ve enterik BCV suşlarına ait spike glikoproteini S1 alt ünitesinin moleküler yapısı üzerine yaptıkları bir araştırmada, respiratorik suşlar ile enterik suşların genetik olarak birbirinden farklı olabileceğini saptamışlar, fakat bu farklılıkların immün yanıtta ve korumada rol oynayıp oynamadığının tam olarak bilinmediğini belirtmişlerdir.

Bovine coronavirus, hem sütçü hem de etçi sürülerde yetiştirilen buzağılarda enteritise sebep olabilmektedir (Carman ve ark 1992, Hasöksüz ve ark 2002a). Enfeksiyon, kış aylarında daha etkili ve yaygın olarak gözlenmektedir. Virusun saçılımının ve ishal olaylarının mevsimsel görünümünün sebebi olarak, soğuk ortamda virusun aktivitesini daha iyi koruyabilmesi, buzağılamanın yoğun olarak ilkbaharın başlangıcında gerçekleşmesi ve yetiştirme biçimi (menagement) sayılabilmektedir (Crouch ve Acres 1984, Crouch ve ark 1985, Collins ve ark 1987, Bulgin ve ark 1989, Benfield ve Saif 1990). İshal salgınları aynı çiftlik içinde birbirini takip eden yıllarda sık sık ortaya çıkabilmektedir (Bulgin ve ark 1989, Benfield ve Saif 1990, Clark 1993).

Virusla sürekli olarak enfekte olan klinik olarak sağlıklı görülen yetişkin sığırların, hassas buzağılar için enfeksiyon kaynağı olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Crouch ve Acres 1984, Crouch ve ark 1985, Collins ve ark 1987). Ayrıca yetişkin sığırlarda yüksek bir coronavirus antikor prevalansı tespit edilmiştir (Saif 1990, Traven ve ark 1999, Cho ve ark 2001b). Hem dışkı hem de kan sirkülasyonunda spesifik antikorların varlığına rağmen klinik olarak normal olan yetişkin sığırların dışkılarında yüksek oranlarda (% 70'in üzerinde) BCV tespit edilmiş, bu saçılımın çoğunluğunun dışkıda coronavirus-immunoglobulin kompleksler şeklinde olduğu bildirilmiştir (Crouch ve Acres 1984). Annelerde doğum esnasında virus saçılım insidensinde meydana gelen artış, annelerin vücutlarında bu dönemde oluşan

hormonal değişikliklere ve strese bağlanmakta ve bu tür taşıyıcı hayvanlardan doğan buzağılarda ishalin gelişme riskinin önemli derecede yüksek olduğu bildirilmektedir (Crouch ve ark 1985, Collins ve ark 1987). Collins ve ark (1987) buzağılarda coronavirus enfeksiyonu insidensinin yıllık % 60 olduğu tespit edilen bir sığircılık işletmesinde yaptıkları araştırmada, bu insidensi yetiştirme tekniklerinin iyileştirilmesi ve aşılama ile % 10-20 ye kadar düşürmeyi başarmışlar, ancak sürüde aşılanan ve aşılınmayan hayvanların özellikle kış aylarında 2 yıl boyunca dışkıları ile coronavirusu sporadik olarak saçtıklarını belirterek insidensteki bu düşüşü aşılama dan ziyade yetiştirme tekniklerinin iyileştirilmesine bağlamışlardır.

Clark (1993), ishaller ve sağlıklı hayvanlarda gözlenen coronavirus insidensinin, ishaller buzağılarda % 8-69, sağlıklı hayvanlarda ise % 0-24 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Traven ve ark (1999) ise İsveç’de yaptıkları bir çalışmada, 40 sürüden alınan toplam 218 koyuna ait kan serumunun 42 (% 19.3) tanesinde BCV’a karşı antikor varlığı tespit ederek, koyunların BCV enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bütün bunların yanısıra, coronavirus familyası içerisinde yer alan bazı virusların persiste enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Buzağı ishalleri ve kış dizanterisi gibi BCV tarafından meydana getirilen doğal enfeksiyonların epidemiyolojisi ile ilgili bazı şaşırtıcı olguların persiste enfeksiyon mekanizmaları ile açıklanabileceği ileri sürülmekle birlikte, BCV’un bu tür bir enfeksiyon meydana getirdiğine dair henüz tam bir bilgi söz konusu değildir (Smith 1997).

2.4.1.2. Patogenez ve patolojik bulgular

Bovine coronavirus ile intestinal kanalın enfeksiyonu ince bağırsağın proksimalinde başlar, ince ve kalın bağırsak boyunca yayılır. Virus bu organların özellikle emilimde rol

oynayan epitel hücrelerini hedef olarak seçer (Clark 1993, Milli ve Hazıroğlu 2000). Buzağılarda ishale neden olan rotaviruslar sadece ince bağırsağı enfekte ederken, coronavirusların hem ince bağırsağı hem de kalın bağırsağı enfekte etmesi daha şiddetli enfeksiyona ve yüksek mortaliteye neden olabilmektedir (İkemori ve ark 1997). BCV replikasyonu, ince bağırsağın villileri üzerindeki olgunlaşmış epitel hücreleri ile kolonun yüzeysel epitel hücrelerinde gerçekleşir. Enfekte olan hücrelerin lize olması sonucu gelişen hücre dejenerasyonuna bağlı dökülmeler meydana gelmekte ve bu hücrelerin yerlerini olgunlaşmamış mukoza epitel hücreleri almaktadır. İnce bağırsaktaki bu değişiklikler, villilerin boylarının kısalması ve birbirleriyle birleşmeleri sonucu villus atrofinin şekillenmesine yol açmaktadır. Kalın bağırsakların yüzeysel epitel hücrelerinde de dejenerasyon ve dökülme sonucu mukozal erezyonlar şekillenmektedir (Clark 1993, Milli ve Hazıroğlu 2000).

Histopatolojik muayenede, ince bağırsak villus epitel hücrelerinin ve kolon yüzeysel epitel hücrelerinin yerini yassı, kübik ve prizmatik epitel hücrelerinin aldığı görülür ve şiddetli enfeksiyonlarda tam dökülme sahaları tespit edilebilir. Bu değişiklikler kadeh (goblet) hücrelerinin azalması ile birlikte gözlenir. Scanning elektron mikroskopi (SEM) ile yapılan incelemelerde her bir bağırsak hücresi üzerindeki mikrovillusların uzunluğunda ve aralıklarında değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Clark 1993). Viral antijen ayrıca villusların lamina propriasında ve mezenterik lenf düğümlerindeki makrofajlarda da saptanmıştır (Clark 1993, Milli ve Hazıroğlu 2000).

Bağırsakların mukozal epitel hücrelerinde BCV'un etkisiyle meydana gelen dejenerasyon ve bunların yerine geçen olgunlaşmamış hücreler nedeniyle bağırsakların emilim kapasitesi oldukça azalır. Bu hücreler, normal sekretorik aktivitelerin engellenmesine bağlı olarak bağırsak lümenindeki sıvı hacminde aşırı bir artışa yol açmakta ve sindirimde rol alan enzimleri salgılayamamalarından dolayı bağırsağın sindirim kapasitesinin azalmasına

neden olmaktadır. Bunun neticesinde bağırsak lümeninde biriken hazmedilmemiş laktoz, mikrobiyal aktivitenin aşırı artışına sebep olmakta ve bağırsaklarda fazla miktarda sıvı birikimi lümeninde ozmotik dengesizliğe yol açmaktadır. Sindirim ve emilim kapasitelerinde meydana gelen azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan ishal, sıvı ve elektrolit kaybına neden olmaktadır. Şiddetli enfeksiyonlarda; ishalle beraber dehidrasyon, asidoz ve hipoglisemi ortaya çıkmakta, akut şok ve kalp yetmezliğine bağlı olarak ölümler gerçekleşmektedir (Clark 1993).

2.4.1.3 Klinik belirtiler

İshal semptomu gösterebilir veya göstermez her yaştaki sığırın dışkı ve bağırsak örneklerinden virusun tespiti yapılabilir (Heckert ve ark 1991, Clark 1993, Saif 2004, Hasöksüz ve ark 2005) beraber buzağuların BCV ile intestinal kanal enfeksiyonlarına oldukça duyarlı oldukları dönem genellikle yaşamlarının ilk 3-21. günleridir (Tsunemitsu ve ark 1991). Deneysel enfeksiyonlarda inkubasyon süresi 20-36 saattir (Mebus 1990). Bovine coronavirusun yol açtığı enteritlerin şiddeti, buzağının yaşına, immunolojik durumuna, kolostrum alıp almamasına, virusun enfektif dozuna ve suşuna göre değişiklik göstermektedir. Enfeksiyon sonucu sarı renkli, sulu, bazen mukuslu ve nadiren kanlı bir ishal şekillenir ve 3-6 gün devam eder. Virus bu süre zarfında dışkıda tespit edilebilir. Buzağular enfeksiyonun akut safhasında durgun ve iştahsızdırlar, hayvanda kilo kaybı, tüyler de düzensizlik ve keçeleşme dikkati çeker. Eğer ishal şiddetli ise ateş ve dehidrasyon şekillenebilir. Buzağuların çoğunluğu, herhangi bir komplikasyon şekillenmediği takdirde iyileşebilirler. İshal şiddetli ise dehidrasyon ve dolaşım yetmezliğinden hayvanlar ölebilir. BCV'un meydana getirdiği tüm bu semptomlar, buzağularda intestinal kanalı etkileyen diğer bir viral etken olan rotavirus enfeksiyonunda gözlenen semptomlara çok benzerlik göstermektedir (Clark 1993, Gül 1999).

2.4.1.4 Teşhis

Enterik BCV enfeksiyonları genellikle dışkı örneklerinin virolojik muayenesi ile teşhis edilmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden bir tanesi, dışkı örneklerinin elektron mikroskopik (EM) muayenesidir (Reynolds ve ark 1984, Collins ve ark 1987, De Rycke ve ark 1986, Murphy ve ark 1999). Fakat virusun pleomorfik morfolojiye sahip olması ve örneklerde hücresel membranlar, organeller ve bakteriyofajlar gibi virus benzeri partiküllerin karışma olasılığının yüksek olması sebebiyle direkt elektronmikrokopi (DEM) ile teşhisin zor olabileceği ve sonuçların bazen doğrulanması gerektiği bildirilmektedir (Athanasios ve ark 1994, Shoenthaler ve Kapil 1999). Bunun yanında yüksek ekipman maliyeti, teşhisin dışkıdaki viral partikül sayısına bağlı olması, örneklerin incelenmesinin uzun zaman alması, deneyimli araştırmacı gereksinimi gibi dezavantajları da vardır (Bridger ve ark 1978, Czerny ve Eichhorn 1989).

De Rycke ve ark (1986) Fransa'da, 1983-1984 yılı kış aylarında, yaşları 3 haftalıktan daha küçük olan 32 adet ishalleri, 21 adet sağlıklı buzağıdan topladıkları dışkıları çeşitli enteropatojenlerin varlığı yönünden EM ile incelemiştir. Araştırmacılar, ishalleri buzağuların 7 (% 33) tanesinde, sağlıklı buzağuların ise 11 (% 52) tanesinde coronavirus benzeri partiküller saptamışlar ve etkenin sağlıklı buzağularda tespit edilmesini, coronavirusların bazı suşlarının apatojen olabileceği şeklinde yorumlamışlardır.

Myers ve ark (1984), klinik olarak sindirim sistemi hastalıklarından arı 22 sürüden, yaşları 1 günlük ile 12 haftalık olan 136 sağlıklı sığırdan topladıkları dışkı örneklerini EM ile enterik patojenlerin varlığı yönünden incelemişler, buzağuların hiç birinde BCV tespit edememişlerdir. Bunun nedenini, örnekleme için çoğunun bir aylıktan büyük hayvanlardan (136 sığırın sadece 14 tanesi 1 günlük) ve sindirim sistemi enfeksiyonlarının gözlenmediği sürülerden yapılmış olmasına bağlamışlardır.

Bovine coronavirusun bir başka tanı tekniği de, ishalin başlamasından sonra 1-4. günlerde otopsi yapılan buzağılardan alınan spiral kolon parçalarının dondurulduktan sonra immunofloresan (IF) testine tabi tutulmasıdır (Mebus 1990). Ancak, postmortem tanı amacıyla kullanılabilmesinden ve taze materyale gereksinim duyulmasından dolayı bu metodun rutin amaçlar için pek uygun olmayacağı belirtilmektedir (Bridger ve ark 1978, Carman ve Hazlet 1992). Bununla beraber direkt IF tekniği, enfekte buzağuların nazal epitel hücrelerinde bovine coronavirus antijenlerini aramak için kullanılan yaygın bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır (Saif ve ark 1986, Heckert ve ark 1991).

İmmunohistokimyasal yöntemle teşhiste, peroksidaz enzimi ile konjuge edilmiş spesifik antikolar enfekte hücrelerin ışık mikroskop ile tespitinde kullanılabilir (Van Kruiningen ve ark 1987, Zhang ve ark 1997).

Bovine coronavirus hemagglütinasyon (HA) yapabilme kabiliyetine sahip olduğundan HA testi de teşhis amacıyla kullanılmaktadır (Gaber ve Kapil 1999, Shoenthaler ve Kapil 1999). BCV'un fare, rat, hamster ve tavuk eritrositlerini hemagglütine edebildiği, ancak insan, sığır, at, koyun, kobay, kaz, ördek, civciv ve güvercin eritrositlerini hemagglütine edemediği bildirilmiştir (Tsunemitsu ve ark 1991, Hasöksüz ve ark 1999b). Bazı BCV ile enfekte hücre kültürü süpernatantlarının semipurifiye edildikten sonra tavuk eritrositlerini hemagglütine edebildiği, ancak suşlar arasında HA titresini açısından farklılıklar gözlenebileceğini belirten araştırmacılar (Fukutomi ve ark 1999) bu durumu, BCV suşlarına ait S glikoproteinlerinin reseptöre bağlanma özelliklerindeki farklılıklara atfetmişlerdir. Hemagglütinasyon testi kolay uygulanabilirliğine rağmen, dışkı örneklerinin spesifik olmayan hemagglütinini içermesi ve hemagglütinasyon olayının ortam ısısına bağlı olarak değişkenlik göstermesi çoğu zaman hatalı sonuçlara neden olduğundan, pratikte veya rutin tanıda pek kabul görmemektedir (Czerny ve Eichhorn 1989).

BCV enfeksiyonlarının direkt teşhisinde en yaygın olarak kullanılan tanı testi, ELISA'dır. Bu konuda gerçekleştirilen araştırmalar, poliklonal (Reynolds ve ark 1984, Czerny ve Eichhorn 1989) ve monoklonal (Crouch ve Acres 1984, Crouch ve ark 1984, Czerny ve Eichhorn 1989, Sato ve Akashi 1993, Alkan 1998, Hasoksuz ve ark 2002,) antikorlar kullanılarak yapılmıştır.

Fagan ve ark (1994), İrlanda'da yaptıkları bir çalışmada, dışkida enteropatojenlerin aynı anda ve direkt olarak tespitine olanak tanıyan bir monoklonal antikor ELISA kiti kullanarak buzağı ishallerine neden olan enteropatojenlerin varlığını ve prevalansını araştırmışlardır. Araştırmacılar (Fagan ve ark 1994), ishal semptomu gösteren ve yaşları 28 gnlge kadar olan buzağılardan topladıkları dışkı örneklerinin % 10.3'nde BCV antijeni tespit ederlerken, % 31.8'inde rotavirus antijeni saptadıklarını bildirmişlerdir.

Sato ve Akashi (1993), dışkı örneklerinden BCV varlığını saptamak amacıyla 2 farklı monoklonal antikor kullanarak geliştirdikleri ELISA ile 29 sürüden topladıkları 202 örnekten 40 adedinde BCV antijeni saptamışlardır.

Schoenthaler ve Kapil (1999), Amerika'da yaptıkları bir araştırmada dışkı örneklerinde BCV antijen varlığını tespit etmek için spike proteinine özgü Z3A5 adı verilen monoklonal antikorları kullanarak antijen-capture sandviç ELISA geliştirmişler, bu testi duyarlılık ve özgüllük bakımından HA ve EM ile kıyaslamışlardır. ELISA ile HA testi arasında % 81 korelasyon olduğu saptanmış, tespit edilen bu düşük korelasyonun sebebi olarak dışkı örneklerinde BCV'un belirlenmesi amacıyla kullanılan HA testinin duyarlılığının az olması gösterilmiştir. ELISA'nın EM tekniği ile karşılaştırılması sonucu ise korelasyonun % 96 olduğu bildirilmiş, virusun tespitinde ELISA'nın hem duyarlılığı hem de özgüllüğü artırdığı ifade edilmiştir. ELISA'nın yüksek duyarlılığının, 10^4 adet kadar düşük partikül içeren dışkı örneklerinde bile virusu tespite yettiği, oysa EM ile teşhis için örneklerin 10^5 ve daha üzerinde virus partikülü içermesi gerektiği de bildirilmiştir.

Gaber ve Kapil (1999), 347 adet ishali buzağının dışkı örneklerinde ELISA ile % 91.4, HA testi ile % 86.7 oranında BCV antijeni elde etmişlerdir.

Verbeek ve Tijssen (1988) ise ya fosfor (P^{32}) ya da biyotin ile işaretlenmiş komplementer DNA probu kullanılarak, BCV RNA'sını tesbit etmek için dot blot hibridizasyon tekniğinin kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Bovine coronavirusun hücre kültürlerine adaptasyonunun zor olması sebebiyle, hücre kültüründe virus izolasyonu yöntemi nadiren kullanılmaktadır. Ancak virus izolasyonundaki problemlere rağmen BCV'unun, primer trake (Bridger ve ark 1978) ve bağırsak, human rektal tümör-18 (HRT-18), African green monkey (Vero) ve Madin Darby bovine kidney (MDBK) hücre kültürlerinde (Saif ve ark 1988) çoğalabildiği gözlenmiştir. Bu hücre kültürlerinden HRT-18'in sığır, köpek, insan ve hindi enterik coronaviruslarına son derece duyarlı olduğu bildirilmiştir (Reynolds ve ark 1986, Tsunemitsu ve ark 1991, Sato ve Akashi 1993, Hasöksüz ve ark 2002a).

Vero, MDBK, bovine fütal tiroid (BFTy), bovine fütal beyin (BFB) ve bovine embriyonik akciğer (BEL) ve HRT-18 hücre kültürlerinde BCV'un primer olarak çoğaltılması vasata sonradan tripsin ilavesiyle artırılabilir (Toth 1982, Saif ve ark 1988, Murphy ve ark 1999). Tripsin ilavesi, coronavirusların biyolojik fonksiyonlarında önemli rolü olan S glikoproteininin S1 ve S2 alt ünitelerine ayrışmasına neden olmaktadır. Ortaya çıkan S1 virusun hücre reseptörlerine bağlanmasında, S2 ise hücre füzyonunun gerçekleşmesinde görev almaktadır (Holmes ve Lai 1996). Virus hücre kültürlerine yapılan ilk pasajlarda genellikle tam bir CPE oluşturmadan çoğalmakta, daha sonraki pasajlarda ise syncytium ve hücre dökülmesi ile karakterize bir CPE oluşumu gerçekleşmektedir. Bu CPE oluşumu virus suşu ve konakçı hücre tipi ile değişkenlik göstermekte olup yine tripsin ilavesi ile hem CPE hem de plak oluşumu artırılabilir (Mostl 1990, Clark 1993). Hücre kültürlerinde viral çoğalma; çoğunlukla CPE oluşumu, immunofloresans, hemagglütinasyon ve hemadsorbsiyon testleriyle

veya enfekte hücrelerin süpernatantlarının elektron mikroskopisiyle gösterilmektedir (Bridger ve ark 1978, Mc Nulty ve ark 1984, Saif ve ark 1988).

Bovine coronavirusun Nebraska (NCDV) suşu, MDBK hücre kültürlerinde idame vasatına pankreatin ilavesi sonucu başarıyla çoğaltılmıştır. BCV'unun saha izolatları ise vasata tripsin ilavesiyle primer bovine kidney ve Vero hücrelerinde çoğaltılmış olup, tanı örneklerinden virus izolasyonu ve virusun kantitatif olarak tespitinde bu hücre tiplerinden faydalanılabileceği bildirilmiştir (Saif ve ark 1988).

Son zamanlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi nazal ve fekal örneklerde BCV enfeksiyonlarının teşhisinde başarıyla kullanılmaktadır (Cho ve ark 2001a, Hasöksüz ve ark 2002a, Hasöksüz ve ark 2002b). Bu testin ELISA'ya göre daha duyarlı ve özgül olduğu bildirilmiş olup, özellikle subklinik enfeksiyonların teşhisinde son derece duyarlı ve faydalı bir test olduğu vurgulanmıştır (Hasöksüz ve ark 2002a). Cho ve ark (2001a) Amerika'da yaptıkları bir çalışmada, antijen-capture ELISA tekniği ile karşılaştırıldığında RT-PCR tekniğinin 50, nested PCR tekniğinin 5000 kez daha duyarlı olduğunu bulmuşlar ve geliştirdikleri PCR testlerinin nazal ve fekal örneklerde BCV'u tespit etmede son derece duyarlı ve özgül testler olduğunu saptamışlardır. Özellikle nested PCR yöntemi ile örneklerde çok az miktarda dahi olsa virusun saptanabilmesinden dolayı buzağılarda ve sığırlarda BCV enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılmasının çok yararlı olacağını bildirmişlerdir.

Bovine coronavirus enfeksiyonlarının serolojik teşhisi için, nötralizasyon testi (Carman ve ark 1992, Alkan ve ark 2003) ve indirekt ELISA (Alenius ve ark 1991, Traven ve ark 1999) yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, çoğu buzağı ve yetişkin sığırların kan serumlarında BCV'a karşı antikora sahip oldukları bildirilmiştir (Saif 1990).

Alenius ve ark (1991) ile Traven ve ark (1999) yapmış oldukları araştırmalarda yetişkin sığırların BCV'una karşı genellikle seropozitif olduğunu bildirirlerken, Atterhem ve

ark (1996) buzağılarda enfeksiyonun bu yolla tespitinin maternal antikorlardan dolayı zor olduğunu kaydetmişlerdir.

2.4.1.5. Tedavi

Bovine coronavirusun neden olduğu enteritisten etkilenen buzağılar, ishallerin diğer formlarını tedavi etmek için kullanılan standart metotlar ile tedavi edilmektedirler. Tedavide amaç, dehidrasyon ve asidoza yol açan sıvı ve elektrolit kaybını yerine koymaktır. Kullanılan sıvılar dengeli elektrolit solüsyonları olmalı ve bunlar oral ya da intravenöz yollarla verilmelidir. Etkilenmiş hayvanlar sağlıklılarından ayrılıp, temiz altlıklı ılık yerlerde tutulmalıdır (Clark 1993).

2.4.1.6. İmmunite, Koruma ve Kontrol

Bovine coronavirus ishallerine karşı korunma, kan dolaşımında sirküle olan antikorlardan ziyade bağırsak lümeninde yeterli düzeyde spesifik antikorların varlığına bağlıdır (Crouch ve ark 2001). Buzağılarda bu lokal immunité, annelerden kolostrum ve sütün alınması ile pasif olarak elde edilir. Kolostrum ve sütteki predominant antikor türü IgG1'dir. Laktal sekresyonlardaki BCV spesifik antikorlarının seviyesi doğum sırasında çok yüksek olup daha sonra hızla düşer. Buzağıda pasif olarak kazanılan immunitenin süresi, mukoza epitel hücreleri tarafından absorbe edilmiş antikorların bağırsak lümenine resekresyonu ve intestinal mukozanın yüzeyine antikorların tutunması ile uzatılmaktadır.

Doğal enfeksiyonu takiben buzağılarda virusa karşı aktif immunité gelişir. Bu olaydan sorumlu olan antikorlar, mukozal yüzeyde enfeksiyonlara karşı hayvanları koruyan IgA antikorlarıdır (Clark 1993).

Gnotobiyotik buzağıların deneysel olarak oral ya da intranazal inokulasyonu sonucu 7. günde hem dışkı hem de nazal sekresyonlarda IgM antikorlarının en yüksek seviyeye ulaştığı,

daha sonraki günlerde bu düzeyin düştüğü görülmüştür (Saif 1987). İnokulasyondan 10-14 gün sonra nazal ve fekal IgA antikor seviyesi yükselmiş, ancak 21-35. günlerde bu antikorların tespiti yapılamamıştır. Serumda da aynı biçimde IgA antikor cevabı görülmüş fakat dışkı ve nazal sekresyonlardaki kadar uzun süre varlığını sürdürememiştir. İlerleyen zamanlarda buzağuların çoğunda dışkı ve nazal akıntı ile virus saçılımı azalırken antikor titresinde artış gözlenmiştir. İnokulasyondan sonra 14. güne kadar IgG1 antikorları, 21. güne kadar da IgG2 antikor cevabı gözlenememiştir (Saif 1987).

Bovine coronavirusa karşı buzağuların immun cevabının saptanması ve BCV enfeksiyonlarına karşı korunmada bu cevabın değerlendirilebilmesi amacıyla saha şartlarında da benzer bir araştırma (Heckert ve ark 1991) yapılmıştır. Kapalı yetiştirme yapılan sütçü bir sürüde doğal BCV enfeksiyonu sonucu, deneysel enfeksiyonlarda olduğu gibi, buzağuların yaşamlarının 2. haftasında önce güçlü bir IgM cevabı gözlenmiş, daha sonra 4. haftaya kadar sırasıyla IgA, IgG1 ve IgG2 antikor cevabı gerçekleşmiştir (Heckert ve ark 1991).

Hassas buzağuların immun durumlarını kuvvetlendirmek için ya pasif immunité seviyesini artırmak amacıyla gebe sığırların paranteral olarak ya da aktif immunitéyi uyarmak amacıyla yeni doğan buzağuların oral olarak aşılması gereklidir (Clark 1993, Saif 1993). Yeni doğan buzağuların enterik enfeksiyonlarına (Rotavirus-Coronavirus-E. Coli) karşı maternal aşılama ile kazanılan pasif immunitenin değerlendirildiği bir araştırmada (Kohora ve ark 1997), 96 inekten oluşan bir sürüde 48 adet gebe inek doğumdan 6-11 hafta önce, dört hafta arayla iki defa aşılana ineklerin, serum ve kolostrum antikor titreleri ile bu ineklere ait buzağuların serum antikor titrelerinin kontrol grubundan önemli oranda yüksek bulunduğu tespit edilmiş ve annelere aşı uygulamasının buzağularda pasif immunité seviyesini artırarak ishale seyreden enfeksiyonların prevalansını ve şiddetini azalttığı ortaya konmuştur. Crouch ve ark (2001), laktojenik immunitéyi artırmak amacıyla gebe ineklere ve düvelere yağ adjuvantlı BCV aşısı uygulamasından sonra kan serumu, kolostrum ve sütlerindeki spesifik nötralizan antikor seviyesini araştırdıkları bir çalışmada, doğumdan 2-12 hafta önce tek doz

olarak uygulanan aşının, süt ve kolostrumdaki mevcut spesifik antikor titresini ve süresini önemli derecede artırabildiğini göstermişlerdir. İkemori ve ark (1997), inaktive BCV antijeni ile aşılanmış tavukların yumurta sarısı tozu ile yine aşılanmış sığırların colostrum tozlarından hazırlanan materyalin koruyucu etkisini değerlendirmek amacıyla BCV'dan arı sürülerden seçilen buzağuları, doğduktan 24-36 saat sonra oral olarak BCV'un virulent Kakegawa suşuyla enfekte etmişler, tedavi grubundaki buzağulara enfekte edildikten 6 saat sonra 7 gün boyunca günde 2 kez 1.5 ile 2 litre arasında biri yumurta sarısı tozu diğeri BCV spesifik antikor içeren colostrum tozu ile hazırlanmış süt vermişlerdir. Antikor almayan kontrol grubundaki buzağuların tümü, enfeksiyondan 6 gün sonra ishal sonucu ölürken yumurta sarısı ve colostrum tozu içeren sütle beslenen buzağularda ishal şekillenmediği, bu buzağuların hepsinin hayatta kaldığı ve ağırlık kaybının oluşmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, immunize edilen tavuklardan hazırlanan yumurta sarısı ile tedaviyi BCV'una karşı pasif korunma metodlarına etkili alternatif bir seçenek olarak sunmuşlardır. Annelerin aşılanmasını savunan bütün bu araştırmalara (İkemori ve ark 1997, Kohora ve ark 1997, Crouch ve ark 2001) rağmen, Bulgin ve ark (1989) ticari olarak hazırlanmış modifiye canlı aşuların gebe ineklere kas içi, yeni doğan buzağulara ise oral olarak uygulanmasının fayda sağlamadığını belirtmişler, sürü içerisinde virusu saçan hayvanların tespit edilerek sürüden uzaklaştırılması yönteminin enfeksiyonun önlenmesinde en etkili yol olduğunu vurgulamışlardır.

Attenuated canlı BCV aşularının oral inokulasyonu uygulamalarında kolostrum almayan buzağuların enfeksiyondan korunduğu deneysel olarak saptanmasına rağmen saha denemelerinde etki sağlanamamıştır. Bu durumun, muhtemelen aşı virusunun bağırsakta pasif olarak kazanılmış maternal antikorlar tarafından nötralize edilmesi ya da yeni doğan buzağuların immun sistemlerinin henüz tam olarak gelişmemesi nedeniyle oral aşılarla karşı yeterli immun cevabın verilememesinden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Clark 1993).

Sığır fôtuslarının intrauterin aşılması yöntemi buzağılarda koruyucu etki sağlamasına karşın, pratikte abortlara ve premature doğumlara sebep olduğundan kabul görmemiştir (Clark 1993)

Aşılamanın yanı sıra buzağılara uygun bakım beslemenin yapılması, sürüdeki taşıyıcı sığırların ve buzağuların tespiti bunların sürüden ayrılması gibi yetiştirme teknikleri de enfeksiyonu önleyebilmektedir (Collins ve ark 1987, Bulgin ve ark 1989).

Gül (1999) ise, ahırda doğum yapan ineklerden fazla olan kolostrumun alınıp konservasyonu yapılarak (1 kg kolostrum içine % 37'lik formaldehitten 1.35 gr. ilave edilir) yeni doğan buzağılara küçük porsiyonlar halinde (ilk gün 3-4 öğün halinde ve buzağı ağırlığının 1/10'u miktarında) verilmesini ve uygun hijyen şartlarının sağlanmasını, coronaviruslara karşı etkili koruyucu tedbirler arasında saymaktadır.

2.4.2. Kış Dizanterisi (Winter Dysentery, Epizootic diarrhoea)

Kış dizanterisi, tüm dünya ülkelerinde görülmesine rağmen hastalığın etiyojisi son yıllara kadar tam olarak bilinmemekte idi. Bu enfeksiyondan bir çok etken sorumlu tutulmuş ancak araştırmaların çoğunda etçi ve sütçü sığırlarda kış dizanterisinin etkeni olarak BCV gösterilmiştir (Benfield ve Saif 1990, Alenius ve ark 1991, Clark 1993, Athanassious ve ark 1994, Fukutomi ve ark 1999, Hasöksüz ve ark 1999a, Hasöksüz ve ark 1999b). Alenius ve ark (1991) İsviçre'de kış dizanterisi gözlenen 549 adet düvede yaptıkları serolojik bir çalışmada, hayvanların % 61'inin BCV'una karşı seropozitif olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu hayvanlarda BCV antikorları yanında BVDV'una özgü antikorların da tespit edilmesi nedeniyle BCV'un BVDV ile birlikte hastalığın seyrini ağırlaştırabileceği düşüncesini ileri sürmüşlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kış dizanterili hayvanlardan virus izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen bir araştırmada (Benfield ve Saif 1990), hastalıklı sığırlardan hazırlanan dışkı filtratlarının gnotobiyotik ve normal buzağılara oral olarak inokule edilmesi

sonucu buzağı dışkılarından coronavirus izole edildiği, bu izolatin h¼ce k¼lt¼rlerine (HRT-18, MDBK, bovine akciğer h¼ce k¼lt¼r¼) inokule edilmesi sonucu morfolojik (EM ile), antijenik ve HRT-18 h¼ce k¼lt¼rlerinde oluşturduğu CPE y¼n¼nden BCV'un referens Mebus suşuna benzediği ileri s¼r¼lm¼řt¼r.

Hastalık, kış aylarında ahıra kapatılan yetişkin s¼t¼c¼ ve etçi sığırılarda g¼r¼lmektedir (Clark 1993). Ancak Fukutomi ve ark (1999) tarafından Japonya'da yapılan bir çalışmada, ağustos ayında g¼r¼len bir salgında yetişkin sığırılarda dışkısında BCV tespit edildiği bildirilmiştir. Bundan ¼nce gerçekleştirilen çalışmalarda (Durham ve ark 1989, Saif 1990) hayvanların soğuk su içmesi dahil, d¼ř¼k evre sıcaklıklarına bağlı ¼ř¼tme veya ani ısı değişiklerinin meydana getirdiği stresin kış dizanterisinin başlamasında ¼nemli bir risk fakt¼r¼ oluşturduğu bildirilmesine rağmen Fukutomi ve ark (1999)'nın yaptığı araştırmada s¼z konusu etkilerin yetişkin sığırılarda ishali başlatmada her zaman gerekli olmayabileceği ifade edilmiştir. Enfeksiyon; akut seyirli, koyu renkli, kanlı bir ishalle birlikte s¼t ¼retiminde belirgin bir d¼ř¼ř¼n g¼r¼lmesiyle karakterizedir. Enfekte hayvanlarda ayrıca nazolakrimal akıntı ve ¼ks¼r¼k g¼r¼lebilir ve bu hayvanlar iştahsız ve depresif olabilirler. Hastalıktan etkilenmiş s¼r¼lerde çok y¼ksek bir morbidite (% 50-100) g¼zlenmesine rağmen mortalite oranı çok d¼ř¼kt¼r (% 1-2). S¼t ¼retimindeki d¼ř¼ře bağlı olarak ekonomik kayıplar çok y¼ksek d¼zeydedir ve b¼yle bir s¼r¼de normal ¼retime geçiş uzun s¼re alabilmektedir (Clark 1993).

Bovine coronavirus hem oral hem de respiratorik yollar ile nakledilebildiği için kış aylarında çok sayıda sığırın kapalı olarak bir arada tutulması ile hastalığın yayılması kolaylaşır (Cho ve ark 2001b). Fukutomi ve ark (1999) tarafından kanlı ishal g¼zlenen bir sığırın tracheal eksudatından BCV izole edilmiş olup, etkenin yetişkin sığırılarda ¼st solunum yoluna karşı bir doku tropizmine sahip olabileceğine de işaret etmişlerdir. Ayrıca BCV için tek bir serotip bildirilmesine rağmen, bu çalışmada BCV'unun antijenik olarak birbirinden

farklı altı izolatu bulunduğu ve bu izolatların en az iki serolojik alttıpe (Mebus suşuna yakın olanlar ve olmayanlar) ayrıldığı ileri sürülmüştür. Bu antijenik farklılıkların BCV'una karşı aşı geliştirilmesinde dikkate alınması gerektiği de ayrıca belirtilmiştir (Fukutomi ve ark 1999). Hasöksüz ve ark (1999b) BCV'u yetişkin sığırların solunum yolundan izole edip HRT-18 hücre kültüründe çoğaltabilmişlerdir. Aynı çalışmada, BCV'un respiratorik suşları ile enterik suşları arasında benzerlikler tespit edilmiş, enterik BCV'a karşı hazırlanacak aşuların hayvanları respiratorik BCV enfeksiyonlarına karşı da koruyabileceği ileri sürülmüştür. Hayvanların enfeksiyona karşı hassasiyetleri, immun durumlarının yanı sıra yaş, beslenme ve dış faktörlere bağlı olarak artabilir . Dış faktörler arasında, ani ısı değişikliği ve atmosfer basıncındaki düşmeler ayrıca hayvanlara düşük kalitede küflü yiyeceklerin yedirilmesiyle gastrointestinal sistemin predispose hale gelmesi sayılabilir (Clark 1993).

2.4.3. Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Bovine coronavirus, intestinal kanalı etkileyen bir patojen olmasının yanı sıra çeşitli yaş grubuna dahil sığırlarda solunum yolu enfeksiyonlarına da sebep olabilmektedir. Enfeksiyon genellikle subklinik seyretse bile, klinik belirtiler çoğunlukla 2-16 haftalık buzağılarda belirgin olarak gözlemlenmektedir. Solunum yolunda virusun öncelikli etkilediği bölgeler, burun boşluğunun epitel hücreleri ve trakeadır. Bu bölgelerde virus; rinitis, aksırma ve öksürme gibi belirtilerle kendini gösteren orta şiddette üst solunum yolu enfeksiyonuna neden olmakta, aynı zamanda virus alt solunum yolunu da enfekte edebilmekte ve küçük çapta akciğer lezyonlarına sebep olabilmektedir. BCV nedenli solunum yolu enfeksiyonları, çoğunlukla tedavi gerektirecek kadar şiddetli seyretmese dahi buzağıları, daha ağır semptomlara yol açan sekonder alt solunum yolu enfeksiyonlarına predispoze kılarlar. BCV ile enfekte olan buzağıların, virusu solunum ve intestinal kanallarının her ikisinde birden aynı anda bulundurabilecekleri de bildirilmiştir (Reynolds ve ark 1986, Tsunemitsu ve ark 1991, Hasöksüz ve ark 1999a). BCV solunum yolu enfeksiyonları, genellikle enterik patojenler

tarafından bulaşmada kullanılan fekal-oral yola ilave olarak, aerosol-nazal yol ile de virus bulaşmasına yol açabilmeleri nedeniyle oldukça önemli görülmektedir (Clark 1993, Hasöksüz ve ark 2005).

Hasöksüz ve ark (1999 b) besi danalarında bovine respiratorik coronavirusun (BRCV) izolasyonu amacıyla, yaşları 5-8 aylık olan besi danalarından 488 adet nasal svap örneği toplamışlar ve bu hayvanların 105 adedinde ELISA ile BRCV antijeni tespit etmişlerdir. ELISA pozitif 13 adet örneği HRT-18 hücre kültürlerine inokule ederek 10 adet izolat elde etmişlerdir. Bu izolatların, bazı BECV suşlarıyla aralarında benzerlikler olduğunu belirlemişler, BECV ve BRCV suşları arasında saptanan antijenik yakınlık derecesi yüksek olduğu takdirde, BECV'una karşı hazırlanan aşuların BRCV enfeksiyonlarına karşı da koruyucu olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Dışkı Örnekleri

Araştırmada kullanılan dışkı örnekleri, Ekim 2003 ve Nisan 2004 tarihleri arasında Malatya ili, halk elindeki 58 ahırda yer alan, yaşları 3 gün ile 6 ay arasında değişen 63 adet ishali buzağıdan, bunların annelerinden (Tablo 4.5) ve bu hayvanların bir kısmı ile aynı ahır paylaşan 14 adet yetişkin inekten (Tablo 4.6) elde edildi. Önceden steril edilmiş numune kaplarına alınan dışkı örnekleri, kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklandı.

3.1.2. Serum Örnekleri

Bovine coronavirus antikor varlığı yönünden araştırılması için, dışkı örnekleme gerçekleştirilen 63 buzağıdan 36 adedinin ve bunların annelerinin 46'sının serum örnekleri toplandı. Bu amaçla kan örnekleri, hayvanların herbirinin vena jugularisinden tek kullanımlık steril kanüllerle, pıhtılaşma aktivatörü içeren steril vakumlu tüplere alındı.

3.1.3. Eritrosit

Hemaglutinasyon testini gerçekleştirmek amacıyla gerekli olan taze fare eritrositleri BALB/c farelerinden elde edildi.

3.1.4. Hücre Kültürleri

ELISA testi ile BCV'a özgü antijenlerin saptandığı dışkı örneklerinden virus izolasyonu amacıyla Vero, MDBK ve HRT-18 hücre kültürlerinden yararlanıldı. Hücre üretme vasatı olarak % 10 fotal calf serumu içeren Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail), virus üretme vasatı olarak 10 µg/ml miktarında tripsin içeren DMEM kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Virolojik Çalışma

3.2.1.1 ELISA ile Bovine Coronavirus antijen tespiti

Dışkı örneklerinde coronavirus antijen varlığını saptamak amacıyla ticari ELISA kiti (Bio-X Diagnostics, Belçika) kullanıldı. Çalışma, üretici firmanın belirttiği test prosedürüne uygun biçimde yapıldı. İshali hayvanlardan alınan dışkılar testte kullanılmadan önce sulandırma solüsyonu ile 96 gözlü ELISA pleytinde kalitatif olarak sulandırılarak santrifüj işlemi uygulanmadan oda ısısında 10 dakika bekletildi. Testte kullanılacak olan bütün kimyasallar kullanılmadan önce en az 30 dakika oda ısında bekletildi. Konsantre yıkama solüsyonu distile su ile 20 katı sulandırıldı. Bir gözü coronavirus spesifik antikorlarla, diğer gözü nonspesifik antikorlarla kaplanmış (A, C, E, G gözleri anti-coronavirus antikorları ile B, D, F, H gözleri ise nonspesifik antikorlar ile kaplanmış) 96 gözlü ELISA pleytinin A1 gözünden başlamak şartı ile yukarıdan aşağıya doğru iki göz negatif (A1-B1) ve iki göz pozitif (C1-D1) kontrol olarak ayrıldıktan sonra, sulandırılmış olan herbir dışkı örneğinden çift göz 100 µl miktarında konuldu (Örnek 1: E1 ve F1 olacak şekilde). Oda ısısında 1 saat inkubasyona bırakıldıktan sonra pleytler yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı ve bir kurutma kağıdına ters çevrilip içindeki sıvı birkaç defa vurularak boşaltıldı. Sulandırma solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırılan konjugattan (peroksidaz ile bağlanmış anti-coronavirus monoklonal antikor) her bir göze 100 µl ilave edildi. Konjugat ilavesinden sonra pleyt oda ısısında 1 saat inkube edildi. Pleytler, inkubasyondan sonra yıkama solüsyonu ile yine 3 kez yıkandı. Kit prosedüründe belirtildiği şekilde (bir pleyt için, 9.5 ml substrata 12 damla kromojen ilave edilerek) hazırlanan indikatör solüsyonundan her göze 100 µl konuldu. Daha sonra oda ısısında 10 dakika inkube edilen pleytlerin her gözüne 50 µl stop solüsyonundan ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Sonuçlar, ELISA okuyucusu (Anthos II, Avusturya) ile

450 nm dalga boyunda okundu. Her bir göz için ölçülen optik dansite (OD) değeri negatif kontrolün OD değerinden çıkartılarak her örnek için net OD tespit edildi. OD'leri 0.150 ya da bu değerden büyük olan test örnekleri pozitif, küçük olanlar ise negatif olarak kabul edildi:

Net ODörnek = ODörnek – ODnegatif kontrol

Net ODörnek \geq 0.150 ise sonuç pozitif

3.2.1.2. Hemaglütinasyon

3.2.1.2.1. Eritrosit hazırlanışı

EDTA'lı tüplere alınan fare kanları 1500-2000 devirde 5 dak santrifüj edilip eritrositlerin dibe çökmesi sağlandı. Santrifüj tüpünün dibine çöken eritrositler plazmadan ayrıldı ve PBS içerisinde 1500-2000 devirde 5 dak santrifüj edilerek 3 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra dipteki çöküntü %100 eritrosit kabul edildi ve kullanılacağı zaman alsever solüsyonu ile %2'lik süspansiyonları hazırlandı.

3.2.1.2.2. Testin yapılışı

ELISA ile coronavirus antijeni yönünden pozitif saptanan iki buzağı dışkısı (4 ve 62 nolu) ve negatif kontrol amacı ile coronavirus negatif bir buzağı dışkısı (38 nolu), Gaber ve Kapil (1999)'in bildirdiği metot modifiye edilerek hemaglütinasyon (HA) testine tabi tutuldu. Daha önce 5 ml 0.01M PBS (pH 7) konulan tüplerin içine dışkı örneklerinden 0.5'şer gr konularak vortekslendi. 1800 g'de 5 dakika + 4 °C da santrifüj edildi. Daha sonra 0.45 µm por genişliğine sahip membran filtreden (Sartorius, Almanya) süzüldü. U tabanlı HA pleytinde (Costar, ABD) örneklerin sulandırılacağı gözlerin tümüne 25 µl PBS ilave edildi. Çifter göze olmak şartı ile testte kullanılan örneklerden ilk gözlere 25 µl miktarında konuldu ve 2 katlı seri sulandırmaları (1/2, 1/4,1/1024) yapıldı. Alsever solüsyonu ile % 2 oranında sulandırılan taze hazırlanmış fare eritrosit solüsyonundan her göze 25 µl ilave edildi. HA

pleyti +4 °C'da 90 dakika inkube edildi ve sonuçlar gözlerde meydana gelen hemaglütinasyona göre değerlendirildi.

3.2.1.3. Virus izolasyonu

3.2.1.3.1. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Sıvı azota dayanıklı ampüllerin içinde saklanan Vero, MDBK ve HRT-18 hücreleri azot tankından çıkarıldıktan hemen sonra 37 °C'lık su banyosunda bekletilerek çözümleri sağlandı. Çözünen hücre süspansiyonları, % 10 fetal dana serumu içeren DMEM ilave edilmiş 500 ml.lik hücre kültürü şişelerine (Costar, ABD) aktarıldı ve 37 °C da inkubasyona bırakıldı. Şişelerde tek tabaka halinde yeteri kadar ürediği tespit edilen hücreler, vasatları dışarı atıldıktan sonra PBS-V+tripsin solüsyonu ile şişe yüzeyinden uzaklaştırıldı. Elde edilen hücreler, yine % 10 fetal dana serumu (FDS) ve konsantre antibiyotik içeren DMEM içinde 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırılarak 24 gözlü hücre üretme pleytlerinin her bir gözüne 2'şer ml paylaştırıldı. Pleytler, bir gece süre ile % 5 CO₂ içeren 37 °C'lık etüvde inkubasyona bırakıldı.

3.2.1.3.2. Dışkı örneklerinin hazırlanması

Hücre kültürlerine ekim amacıyla dışkı örneklerinden inokulum hazırlanması için örneklerin HA testine tabi tutulmaları aşamasında izlenen yöntemin (Gabil ve Kapil 1999) aynısı kullanıldı.

3.2.1.3.3. Virus izolasyonu amacıyla hücre inokulasyonu

Bir gece süreyle inkubasyona bırakılan pleytin gözlerindeki vasatlar dışarı atılarak hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı. Önceden hazırlanmış dışkı örneklerinden 0.2 ml miktarında ve her örnek için 2'şer göze olmak kaydı ile inokulasyon gerçekleştirildi. Adsorbsiyon için bir saat 37 °C'da inkubasyona bırakılan pleytler, daha sonra her bir göze virus üretme vasatı

olarak 10 µg/ml oranında tripsin (Durham ve ark 1989) içeren DMEM ilave edilip, hücre kültürlerinde meydana gelecek morfolojik değişiklikleri gözlemlemek amacıyla yeniden inkubasyona bırakıldı. Beş günlük inkubasyon süresi sonunda hücre kültürlerine bir kez dondurma-çözme işlemi uygulanarak elde edilen süpernatantların, önceden hazırlanmış hücre kültürlerine yeniden ekimi gerçekleştirildi. Bu işlem 5 kez (pasaj) tekrarlandı. Her bir pasajdan elde edilen süpernatantlar, ELISA ve HA testi ile BCV varlığı yönünden kontrol edildi.

3.2.2. Serolojik Çalışma

3.2.2.1. Serum örneklerinin hazırlanması:

Pıhtılaşma aktivatörü içeren steril vakumlu tüplere alınan kan örneklerinin, 1500-2000 devirde 5-10 dakika santrifüj edildikten sonra serumları çıkarıldı. Serum saklama tüplerine aktarılan örnekler, antikor-ELISA testinde kullanılmak üzere 56 °C'lık su banyosunda 30 dakika inaktive edilerek -20 °C da saklandı.

3.2.2.2. ELISA ile Bovine Coronavirusa spesifik antikor tespiti

Araştırmada kullanılan hayvanlardan alınan kan serumu örneklerinde coronavirusa spesifik antikorları tespit etmek için ticari kompetatif ELISA kiti (Bio-X Diagnostics, Belçika) kullanıldı. Testte kullanılacak olan bütün kimyasallar kullanılmadan önce en az 30 dakika oda ısısında bekletildi. Konsantre yıkama solüsyonu distile suyla 20 kat, sulandırma solüsyonu ise 5 kat sulandırıldı. Önce poliklonal antikorlar ile kaplanmış sonra bovine coronavirus antijeni ilavesi ile hazır hale getirilmiş olan 96 gözlü ELISA pleytinin A1 gözünden başlamak üzere ilk iki gözüne yukarıdan aşağıya doğru pozitif ve negatif kontrol yerleştirildi. Takip eden gözlere sulandırma solüsyonu ile 1:20 oranında sulandırılmış serum örneklerinden 100 µl konuldu. Daha sonra her göze 20 kat sulandırılmış konjugattan (peroksidazla bağlanmış anti-coronavirus monoklonal antikor) 100 µl ilave edilerek oda

ısında 1 saat inkube edildi. Süre sonunda pleyt, yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı ve bir kurutma kağıdına ters çevrilip birkaç defa vurularak içindeki sıvı boşaltıldı. Kit prosedüründe belirtildiği şekilde (bir pleyt için, 9.5 ml substrata 12 damla kromojen ilave edilerek) hazırlanan indikatör solüsyonundan her göze 100 µl konuldu. Daha sonra 10 dakika oda ısısında inkube edildi ve her göze 50 µl stop solüsyonundan ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Pleytler, ELISA okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda okundu. Aşağıdaki formüle göre pozitif kontrol ve her örnek için inhibisyon yüzdesi hesaplandı:

$$\%inhibisyon \text{ örnek} = [(OD_{neg} - OD_{örnek}) : OD_{neg}] \times 100$$

$$\%inhibisyon \text{ pozitif} = [(OD_{neg} - OD_{poz}) : OD_{neg}] \times 100$$

Testin değerlendirilebilmesi için “OD neg - OD poz > 0.7” ve “%inhibisyon pozitif > %50” olmak kaydı ile, sonuçlar aşağıdaki cetvele göre yorumlandı:

Ölçülen Değer	Pozitiflik Düzeyi
$\%inhibisyon < 20$	0
$20 \leq \%inhibisyon < 40$	+
$40 \leq \%inhibisyon < 60$	++
$60 \leq \%inhibisyon < 80$	+++
$80 \leq \%inhibisyon$	++++

4. BULGULAR

4.1. Antijen-ELISA Sonuçları

İshal semptomu gösteren 63 adet buzağıya ait dışkı örneklerinden 2 adedinde (% 3) coronavirus antijen varlığı saptandı (Resim 4.1). Antijen tespit edilen 2 dışkı örneğinden birisi 10 günlük (4 nolu), diğeri ise 5 günlük (62 nolu) bir buzağıya aitti. Buzağuların annelerinden toplanan 63 adet, ishalleri buzağularla aynı ahır paylaşılan dişi hayvanlara ait 14 adet dışkı örneğinin hiç birisinde coronavirus antijeni tespit edilemedi (Tablo 4.1, Tablo 4.5, Tablo 4.6).

4.2. Hemagglütinasyon Test Sonuçları

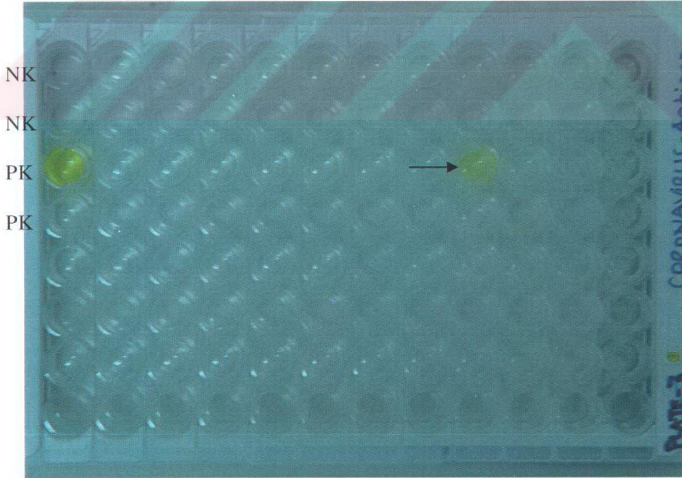
Antijen-ELISA ile BCV yönünden pozitif olduğu saptanan 2 buzağıya ait dışkı örneklerinin HA testine tabi tutulması sonucu, 4 nolu örneğin 1:32, 62 nolu örneğin ise 1:64 sulandırmaya kadar hemagglütinasyon meydana getirdiği tespit edildi. Negatif kontrol olarak kullanılan 38 nolu yavruya ait dışkı örneği ise hiçbir sulandırmada hemagglütinasyon göstermedi (Resim 4.3).

4.3. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu Sonuçları

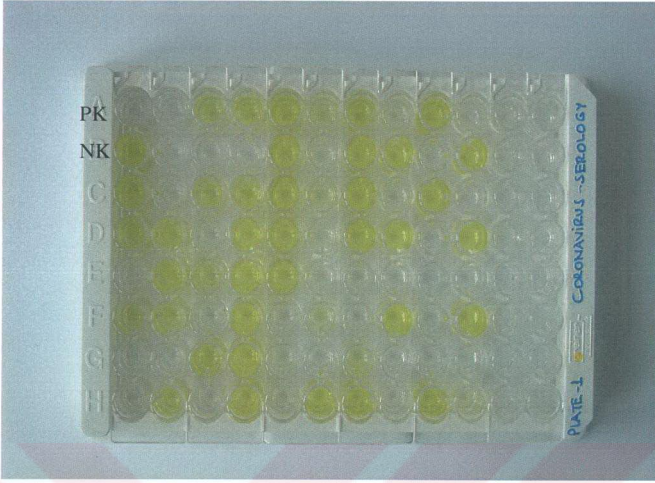
ELISA ile coronavirus yönünden pozitif olarak saptanan dışkı örneklerinin, Vero, MDBK ve HRT-18 hücre kültürlerine yapılan 5 kör pasajı sonucunda herhangi bir CPE gözlenmedi (Tablo 4.4). Hücre kültürlerinde BCV'un çoğalıp çoğalmadığının tespiti amacıyla, beş kör pasajın her birinden elde edilen süpernatantların ELISA ve HA testi ile incelenmesi sonucu virusa özgü reaksiyon belirlenemedi.

4.4. Antikor-ELISA Sonuçları

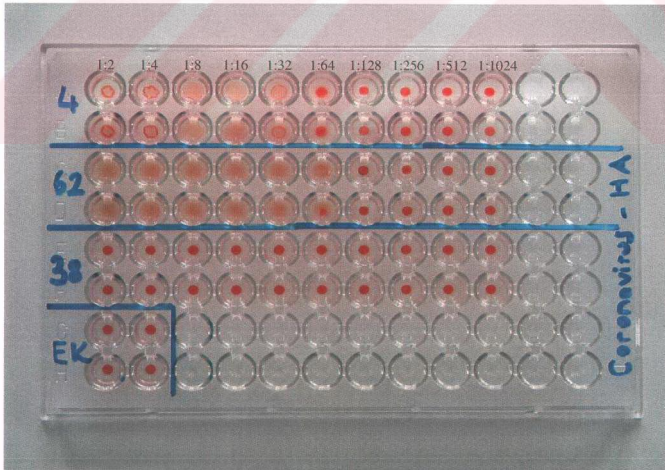
Altmış üç ishallerli buzağının 36'sından ve annelerinin 46'sından alınabilen kan serum örnekleri ELISA testi ile coronavirusa spesifik antikorlar yönünden incelendi (Resim 4.2) ve 36 buzağının 9 adedinde (% 25), 46 ineğin 35 adedinde (% 76) seropozitiflik gözlemlendi (Tablo 4.2). Araştırmada dışkılarından coronavirus antijeni tespit edilen 10 günlük buzağının (4 nolu) kan serumunda spesifik antikorlar saptanamazken, 5 yaşındaki annesinin seropozitif olduğu belirlendi. Dışkısında antijen saptanan 5 günlük diğer buzağının (62 nolu) ve annesinin serumu ise örneklenemedi. Serolojik test sonucu 25 seropozitif anneye ait buzağıdan 8 tanesinde (% 32) seropozitiflik belirlenirken, 17 adet buzağıda seronegatiflik saptandı. Seronegatif olduğu ortaya konan 7 anneye ait buzağının ise anneleri gibi seronegatif olduğu tespit edildi (Tablo 4.3). Seropozitif olarak saptanan 1 adet ve seronegatif olarak saptanan 3 adet buzağının annesinden ise serum örnekleme yapılamadı.



Resim 4.1. Antijen-ELISA pleyninde bir buzağıya ait dışkının pozitif reaksiyonu (Okla gösterilmiştir) (3 nolu pleyn). NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol



Resim 4.2. Antikor-ELISA sonuçları (1 nolu pleyt).PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol



Resim 4.3. Hemaglutinasyon test sonuçları. EK: Eritrosit kontrol

Tablo 4.1. Dışkı örneklerinde antijen-ELISA sonuçları

Örneklenen hayvanlar	Hayvan Sayısı	ELISA		Pozitiflik oranı (%)
		Negatif	Pozitif	
İshalli buzağı	63	61	2	3
Yetişkin	77	77	0	0
TOPLAM	140	138	2	1.4

Tablo 4. 2. Kan serumu örneklerinde antikor-ELISA sonuçları

Örneklenen Hayvanlar	Hayvan Sayısı	ELISA		Pozitiflik oranı (%)
		Negatif	Pozitif	
Yavru	36	27	9	25
Anne	46	11	35	76
TOPLAM	82	38	44	53.6

Tablo 4.3. Hem anne hem de yavrusundan kan örneği alınabilen hayvanların serolojik test sonuçları.

Uygulanan test	Anne +	Anne +	Anne -
	Yavru +	Yavru -	Yavru -
Antikor- ELISA	8	17	7

Tablo 4.4. Antijen pozitif buzağılara ait dışkıların ELISA OD değerleri ve hücre kültüründe virus izolasyon sonuçları

Örnek no	Dışkı örneklerinde belirlenen ELISA OD değerleri*	CPE
4	0.264	-
62	0.441	-

*Pozitif kontrol OD ortalaması=1.230, Negatif kontrol OD ortalaması=0.042

Tablo 4.5. Araştırmada kullanılan buzağı ile annelerinin yaşı ve ELISA sonuçları

Örnek no	Yavru			Anne		
	Yaş	Antijen	Antikor (Antikor düzeyi)	Yaş (Yıl)	Antijen	Antikor (Antikor düzeyi)
1	1,5 ay	-	-	5	-	örneklemedi
2	30 gün	-	-	7	-	örneklemedi
3	30 gün	-	örneklemedi	8	-	örneklemedi
4	10 gün	+	-	5	-	+ (++++)
5	15 gün	-	örneklemedi	6	-	+ (++++)
6	20 gün	-	örneklemedi	4	-	+ (++++)
7	3 ay	-	+ (++++)	8	-	+ (++++)
8	1,5 ay	-	+ (++++)	3	-	örneklemedi
9	2 ay	-	örneklemedi	4	-	örneklemedi
10	30 gün	-	-	2	-	-
11	3 ay	-	örneklemedi	6	-	örneklemedi
12	10 gün	-	örneklemedi	5	-	-
13	15 gün	-	-	7	-	+ (++++)
14	25 gün	-	-	5	-	örneklemedi
15 ^a	3 ay	-	-	5	-	+ (++++)
16 ^a	2 ay	-	-	4	-	+ (++++)
17 ^a	3 ay	-	-	6	-	+ (++++)
18 ^a	2 ay	-	-	8	-	+ (++++)
19 ^a	4 ay	-	-	8	-	+ (++++)
20	2 ay	-	-	5	-	-
21	30 gün	-	-	3	-	-
22	20 gün	-	-	6	-	-
23	1,5 ay	-	-	4	-	-
24	30 gün	-	-	7	-	-
25	4 ay	-	örneklemedi	6	-	örneklemedi
26	6 ay	-	örneklemedi	5	-	örneklemedi
27	4 ay	-	örneklemedi	4	-	örneklemedi
28	3 ay	-	örneklemedi	3	-	örneklemedi
29	30 gün	-	+ (++++)	6	-	+ (++++)
30	2,5 ay	-	+ (+++)	5	-	+ (++++)
31	30 gün	-	+ (+++)	5	-	+ (++++)
32	15 gün	-	örneklemedi	4	-	+ (++++)
33	20 gün	-	+ (+++)	3	-	+ (++++)
34	30 gün	-	örneklemedi	5	-	+ (++++)
35	1,5 ay	-	-	10	-	-
36	30 gün	-	örneklemedi	7	-	örneklemedi
37	30 gün	-	örneklemedi	7	-	örneklemedi
38	2 ay	-	örneklemedi	8	-	örneklemedi
39	2 ay	-	örneklemedi	4	-	-
40	30 gün	-	örneklemedi	5	-	-
41	1,5 ay	-	örneklemedi	5	-	-
42	30 gün	-	örneklemedi	4	-	+ (++++)
43	20 gün	-	örneklemedi	3	-	+ (++++)
44	30 gün	-	-	5	-	+ (+++)

Tablo 4.5.'in devamı. Araştırmada kullanılan yavru ile annelerinin yaşı ve ELISA sonuçları

Örnek no	Yavru			Anne		
	Yaş	Antijen	Antikor	Yaş (Yıl)	Antijen	Antikor
45	2 ay	-	-	4	-	+ (++++)
46	20 gün	-	-	6	-	+ (++++)
47	2,5 ay	-	-	4	-	+ (++++)
48	30 gün	-	Örneklenemedi	6	-	+ (++++)
49	2 ay	-	-	3	-	+ (++++)
50	30 gün	-	-	7	-	+ (++++)
51	30 gün	-	örneklenemedi	6	-	+ (++++)
52	1,5 ay	-	örneklenemedi	4	-	+ (++++)
53	2 ay	-	örneklenemedi	5	-	+ (++++)
54	3 ay	-	örneklenemedi	5	-	örneklenemedi
55	1,5 ay	-	-	5	-	+ (++++)
56	30 gün	-	-	4	-	+ (++++)
57	20 gün	-	-	6	-	+ (++++)
58	3 aylık	-	-	9	-	+ (++++)
59	40 gün	-	+ (+++)	9	-	+ (++++)
60	30 gün	-	+ (++++)	8	-	+ (++++)
61 ^b	3 gün	-	örneklenemedi	5	-	örneklenemedi
62 ^b	5 gün	+	örneklenemedi	7	-	örneklenemedi
63	3 ay	-	+ (++++)	6	-	+ (++++)

a,b. Aynı ahır paylaşılan hayvanlar, aynı harf ile işaretlenmiştir. İşaretlenmeyen hayvanlar birbirinden farklı ahırda yer almaktadır.

Tablo 4.6. Anneler haricinde dışkı örnekleme yapılan 14 adet yetişkin dişi hayvanın durumu

Örnek no	Yaş (Yıl)	Aynı ahır paylaştığı hayvanların örnek no.su	Antijen
64	3	15-16-17-18-19	-
65	5	15-16-17-18-19	-
66	5	15-16-17-18-19	-
67	7	15-16-17-18-19	-
68	5	15-16-17-18-19	-
69	6	15-16-17-18-19	-
70	6	38	-
71	5	40	-
72	5	40	-
73	6	50	-
74	5	51	-
75	4	52	-
76	5	55	-
77	7	56	-

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Coronavirüslerin buzağılarda meydana getirdiği ishalle karakterize enfeksiyonlar, verim kaybına ve değişen oranlarda mortaliteye sebep olmalarından dolayı klinik ve ekonomik açıdan oldukça önemlidir (Saif 1993).

Bovine coronavirus, buzağılarda ishalle seyreden enfeksiyonların yanında yetişkin sığırlarda kış dizanterisine, buzağı ve besi sığırlarında ise solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmakta (Clark 1993, Saif 1993), bu nedenle tüm dünyada sığır popülasyonları içinde yer alan her yaştaki hayvanlarda görülebilme riski çok yüksek olan bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır.

Enterik BCV enfeksiyonlarının teşhisi genellikle dışkıda virüsün ya da viral antijenlerin varlığının saptanması esasına dayanmaktadır. Teşhis amacıyla kullanılan yöntemlerden birisi olan ELISA, coronavirusların teşhisinde referans test olarak kabul edilmektedir (Gaber ve Kapil 1999). Coronavirusların teşhisinde sıklıkla kullanılan EM yöntemine göre duyarlılığının oldukça yüksek olması ve dışkıdaki bazı nonviral partiküllerin ya da bredavirus gibi antijenik olarak farklı coronavirus benzeri yapıların EM'de hatalı değerlendirilebilmesi ELISA'nın daha avantajlı olmasını sağlamaktadır. EM'de bu hatalı değerlendirmelerin bir başka sebebi de BCV'un pleomorfik bir yapıya sahip olmasıdır (Reynolds ve ark 1984, Athanassios ve ark 1994, Schoenthaler ve Kapil 1999). İçerisinde birçok mikroorganizma, hücre sel döküntü, koproantikorlar ve çeşitli biyolojik kalıntılar bulunduran dışkıdan spesifik virüsün tespiti zor olduğu için kullanılan ELISA'nın duyarlılığının ve özgüllüğünün artırılması bir gereksinim olarak ortaya çıkmış, son yıllarda geliştirilen monoklonal antikorların kullanılması ile sözü edilen duyarlılık ve özgüllük artırılmıştır. Bu araştırmada kullanılan ticari ELISA kiti de, monoklonal ve poliklonal antikorlar kombine edilerek hazırlanmıştır. Son yıllarda teşhis amacıyla yapılan farklı araştırmalarda (Fukutomi ve ark 1999, Cho ve ark 2001, Hasöksüz ve ark 2002) sık olarak

kullanılan PCR tekniğinin ELISA'dan daha duyarlı olduğu öne sürülse de, kompleks bir laboratuvara ihtiyaç göstermemesi, uygulanabilirliğinin PCR'a göre daha kolay ve ekonomik olması ELISA'nın yaygın olarak kullanılmasını engelleyememektedir.

Tüm dünyada yaygın olarak gözlenen BCV enfeksiyonları ile ilgili ülkemizde çok fazla çalışma olmamasına rağmen buzağuların ishalle karakterize viral enfeksiyonlarında rotavirüslerden sonra en önemli etkenin coronaviruslar olduğu düşünülmektedir. Türkiye'de yapılan virolojik çalışmalarda (Alkan ve ark 1998, Eskiizmirli ve ark 2001, Erdoğan ve ark 2003, Hasöksüz ve ark 2005) buzağularda BCV enfeksiyonlarının prevalansı % 1-37.1 arasında bulunmuştur. Ülkemizde BCV enfeksiyonlarını ilk kez bildiren Alkan (1998), 6 işletmede ishal semptomu gösteren 1-30 günlük 83 buzağıdan alınan dışkı örneklerinden toplam 15 hayvanda (% 18) ELISA ile BCV antijen varlığını tespit etmiş, enfeksiyonun bu hayvanların 8 tanesinde (% 15.4) tek başına, 7 tanesinde (% 13.4) ise bovine rotavirus ile birlikte seyrettiğini bildirmiştir. Eskiizmirli ve ark (2001), Türkiye'nin 16 farklı ilinden topladıkları 1-30 günlük ishalleri buzağıya ait 185 dışkı örneğini coronavirus, rotavirus, *cryptosporidium ssp.* oositleri yönünden inceledikleri dışkı örneklerinin 24'ünde (% 13) BCV saptamışlar, bu hayvanların 8 adedinde BCV'un tek başına enfeksiyon oluşturduğunu belirlemişlerdir. Erdoğan ve ark (2003), Kars yöresinde yeni doğan buzağularda coronavirus ve rotavirus yaygınlığının belirlenmesi amacıyla Eylül 2001 ile Haziran 2002 arasında 45 çiftlikte bulunan buzağulardan toplanan 104 adet ishalleri, 43 adet normal buzağı dışkısını coronavirus varlığı yönünden ELISA ile incelemişler ve ishalleri buzağuların % 1'inde (1/104) BCV antijen varlığını tespit etmişlerdir. Hasöksüz ve ark (2005) ise 2001 sonbaharından 2002 ilkbaharına kadar, Türkiye'nin kuzey batısındaki 23 köyde yer alan 29 ahırdaki üç farklı yaş grubuna (0-30 günlük, 4-12 aylık, 2-7 yaş) ayırdıkları ishal semptomu gösteren sığırlardan alınan dışkı örneklerini, BCV'a karşı hazırlanmış 3 çeşit monoklonal antikor kullanarak indirekt-antijen capture ELISA ile test etmişlerdir. Araştırma sonucunda dışkı ile saçılım oranlarını 0-30 günlük olan buzağularda % 37.1 (13/35), 4-12 aylık hayvanlarda % 25.6

(10/39), 2-7 yaş grubunda olanlarda % 18.2 (4/22), toplamda ise % 28.1 (27/96) olarak bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, yaşları 3 gün ile 6 ay arasında değişen 63 ishali buzağıdan toplanan dışkı örneklerinden 2 adedinde (% 3.1) ELISA ile BCV antijeni saptanmıştır. Belirlenen bu oran (% 3.1) her ne kadar Erdoğan ve ark (2003)'nın belirlediği orana (% 1) yakın ise de Alkan ve ark (1998) ile Eskiizmirli ve ark (2001)'nin bildirdiği oranlardan (sırasıyla % 18 ve %13) düşük bulunmuştur. İshale sebep olan enfeksiyonların buzağular arasındaki yayılma riskinin sürü büyüklüğü ile doğru orantılı olarak arttığı göz önüne alındığında, bu araştırmada BCV prevalansının düşük bulunması, örnekleme yapılan buzağuların büyük bir çoğunluğunun halk elindeki bireysel işletmelerden seçilmiş olmasına bağlanabilir. Bu çalışmada örnekleme yapılan ishali buzağuların sahip oldukları yaş aralığının (3 gün ile 6 ay arası) Alkan ve ark (1998) ile Eskiizmirli ve ark (2001)'nin kullandığı hayvanların yaş aralığına (0-30 gün arası) göre yüksek olması, belirlenen prevalansı açıklayan diğer bir neden olarak gösterilebilir. Ayrıca bu araştırmada antijen tespiti için kullanılan ticari ELISA pleytleri, BCV'a karşı hazırlanmış poliklonal ve bir monoklonal antikor karışımı ile kaplanmıştır. Bu çalışmaya göre daha yüksek oranda antijen prevalansı tespit eden Hasöksüz ve ark (2005)'nin araştırma sonuçları, kullandıkları ELISA yönteminde virusun 3 farklı glikoproteinine (N, S ve HE) ve karşı hazırlanmış monoklonal antikorlarla duyarlılığı arttırmalarına bağlanabilir.

Sığırlarda BCV'un dışkı ile saçılımı her yaşta gözlenebilmesine rağmen, ekonomik değere neden olan enterik enfeksiyonlara daha çok 1-16 haftalık buzağularda rastlanmaktadır (Gaber ve Kapil 1999). Bu bağlamda, dışkıları coronavirus antijen varlığı yönünden test edilen 63 buzağıdan, 26 nolu buzağı hariç, 62 adedi yaşamlarının ilk dört ayı içerisinde örneklenmiştir. Araştırmada kullanılan tüm hayvanlardan, biri 5 günlük (62 nolu) diğeri ise 10 günlük (4 nolu) olan iki buzağının dışkısında BCV antijen varlığı belirlenmiştir (Tablo 4.5). Eskiizmirli ve ark (2001) 1-30 günlük ishali buzağularda BCV'un en erken 3 günlük

hayvanlarda saptandığını belirtirken, antijen pozitif olgularda yaş ortalamasının 10.5 gün olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada (Abraham ve ark 1992) ise buzağılarda yaşamın ilk 5 haftasında BCV enfeksiyonuna yakalanma riskinin yüksek olduğu ve özellikle birinci haftada antijen tespit oranının % 51.5 olarak saptandığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada, dışkısında coronavirus antijeni saptanan 5 günlük 62 nolu buzağı ile aynı ahır paylaşmasına rağmen 3 günlük 61 nolu buzağıda etken tespiti yapılamamıştır. Bunun nedeninin, buzağının yaşı gereği dışkı örneklemesinin virus partiküllerinin saçılma düzeyinin çok düşük seviyede gerçekleştiği ishalin başlangıç döneminde yapılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. İshal süresince dışkı örneklerinden coronavirus varlığının saptanmasına yönelik yapılan bir araştırmada (Cho ve ark 2001), deneysel olarak enfekte edilen kolostrum almamış bir buzağıda inokulasyondan 3 gün sonra ishal olgusu görülmesine rağmen ELISA ile antijen tespiti ancak 5. günde yapılabilmiş, bir başka buzağıda ise ishal 5 gün süreyle devam etmesine rağmen antijen tespiti ancak 4 gün boyunca gerçekleştirilebilmiştir. Ancak nested PCR ile, bahsi geçen ilk buzağıda inokulasyon sonrası 2-15. gün, ikinci buzağıda 3-15. gün gibi geniş bir aralık boyunca viral genom tespiti yapılabilmıştır. Altmış bir nolu buzağının dışkısında antijen belirlenememesine neden olabilecek diğer olasılıklar arasında, buzağının annesinden uygun nitelik ve zamanda kolostrum alması sonucu enfeksiyona karşı korunması ya da ishalin başka bir patojen etkene bağlı olarak gerçekleşmesi sayılabilir. Fakat aynı ahır paylaşan 61 ve 62 nolu buzağı ile bunların annelerinden kan serumu alınamaması ve dışkılarında ishale neden olabilecek diğer etkenlerin araştırılmaması, bu olasılıklar hakkında yorum yapılmasını güçleştirmektedir.

Araştırmada, ishalleri buzağuların yanısıra etkeni etrafa bulaştırmada oynadıkları rolü tespit etmek amacıyla klinik olarak sağlıklı yetişkin sığırlardan da alınan 77 adet dışkı örneği ELISA ile incelenmiştir. Örneklenen bu hayvanlardan 63 adedi ishalleri buzağuların

annelerinden, 14 adedi ise enfeksiyonu yavrulara anneler kadar bulaştırma ihtimali yüksek olabileceği düşünülen, bazı buzağularla aynı ahır paylaştan yetişkin hayvanlardan oluşmaktaydı. Bu örneklerin hiç birisinde BCV antijeni belirlenemezken (Tablo 4.1), ülkemizde Alkan ve ark (2003) tarafından bu konuda yapılan ilk çalışmada da yetişkin hayvanların dışkılarından ELISA ile BCV varlığının tespit edilemediği ancak hayvanlarda % 16.3 oranında seropozitiflik belirlendiği bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan araştırmalarda sağlıklı yetişkin sığırların dışkılarında BCV antijeni saptanamasa da dünyanın birçok ülkesinde gerçekleştirilen birçok araştırmada (Colins ve ark 1987, Cruch ve Acres 1984) sağlıklı sığırların, virusu dışkılarıyla etrafa saçtıklarına dair bildirimler bulunmaktadır. Örneğin Crouch ve ark (1984), geliştirdikleri monoklonal antikor capture ELISA ile bir sürüde bulunan 80 adet ishali ve 121 adet klinik olarak sağlıklı sığırdan topladıkları dışkı örneklerinde coronavirus varlığını araştırmışlardır. İshali sığırlara ait örneklerde 16 (% 20) adet, sağlıklı sığırlara ait olanlarda ise 6 (% 5) adet pozitif sonuç elde ederek, sağlıklı sığırların sürüde virusun doğal rezervuarı olabileceği sonucuna varmışlardır.

Bovine coronavirusa özgü antikorlar yönünden yetişkin sığırların serumlarının incelenmesi neticesinde; bu araştırmada ELISA ile % 76, Alkan ve ark (2003) tarafından ise mikronötralizasyon testi ile % 16.3 oranında seropozitiflik elde edilmesi, kullanılan testlerin duyarlılıklarındaki farklılığa bağlanabilmekle beraber bu durumu etkileyen birçok faktörün (örneklenen sürünün yapısı, bireysel ve bölgesel farklılıklar vs) olabileceği göz önünde bulundurulması gereklidir. Bu araştırma sonuçları ile uyumlu olduğu gözlenen ve ülkemizde yapılan diğer bir araştırmada (Hasöksüz ve ark, 2005) ise seropozitiflik, 4-12 aylık sığırlarda % 46.2, 2-7 yaş grubundaki sığırlarda % 54.5 oranında saptanmış, genç hayvanlarla yetişkinlerin bir arada buldukları karışık sürülerde gençlerin büyük bir çoğunluğunun 4-12. aylar arasında coronavirusa karşı seropozitif hale geldikleri ileri sürülmüştür. Bu araştırmada, çoğunluğu sürü kavramından bahsedemeyeceğimiz ortamlarda bireysel olarak barındırılan 2-10 yaş arasındaki yetişkin hayvanlarda seropozitifliğin % 76 gibi yüksek bir oranda

saptanmış olması, BCV'un ülkemizdeki yaygınlığının çok üst düzeyde olabileceği ve erişkin sığırların yaşamlarının herhangi bir döneminde bu virusla karşılaşma ihtimallerinin oldukça fazla olduğu kanısını uyandırmaktadır. Ancak bu yargının tam olarak kanıtlanabilmesi için bölgesel ve populasyon bağlamında daha geniş kapsamlı araştırmalara gereksinim duyulduğu açıktır.

Crouch ve Acres (1984), yetişkin sığırlarda coronavirus prevalansını tespit etmek amacıyla bir sürüde yer alan klinik olarak normal görünümlü 121 sığırdan topladıkları dışkı örneklerini capture-ELISA kullanarak test ettikleri bir araştırmada, coronavirusun bu örneklerin 6 (% 5)'sında serbest olarak, 85 (% 70)'inde ise immun kompleksler halinde bulunduğunu saptamışlar, sığırlarda BCV'u etrafa saçan bu tür taşıyıcı hayvanların duyarlı buzağular için kaynak oluşturabileceklerini ileri sürmüşlerdir. Aynı şekilde Crouch ve ark (1985), 12 hafta süreyle takip edilen klinik açıdan normal 10 adet sığırın dışkılarıyla kronik olarak BCV'u saçtıklarını ve saçılan viral partiküllerin büyük oranda antikorlarla kompleks teşkil etmesinden dolayı bu komplekslerin buzağular için enfeksiyöz tabiatının araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmada kullanılan ELISA kitinin dışkıdaki serbest antijenlerin tespiti temeline dayalı olarak hazırlanmış olması, sağlıklı hayvanların dışkılarında bulunabilme ihtimali olan immun kompleksler konusunda bir yorum yapılmasını engellemiştir.

Bir çok araştırmada (Gaber ve Kapil 1999, Shoenthaler ve Kapil 1999) BCV'un eritrositleri çöktürebilme özelliğinden faydalanılarak HA testi kullanılmıştır. Ancak bu test ile çalışılırken coronavirus haricindeki bazı virusların da çeşitli memeli türlerine ait eritrositleri aglutine ettiği, bu fenomenin immunoserolojik bir etkileşim sonucu gerçekleşmediği (Gaber ve Kapil 1999) ve dışkı örneklerinin non-spesifik hemaglutininleri de içerdiği (Clark 1993) göz önüne alınmalıdır. Kısacası HA testi, kolay uygulanabilir olmasına rağmen teşhiste özgül bir test olarak görülmemekte, son yıllarda yapılan çalışmalarda (Fukotomi ve ark 1999,

Hasöksüz ve ark 1999b) bir teşhis yönteminden ziyade BECV ve BRCV suşları arasındaki antijenik ve biyolojik farklılıkları tespit edebilmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı araştırmada bütün dışkı örnekleri yerine, ELISA ile BCV yönünden pozitif olarak belirlenen 2 dışkı numunesi HA testine tabi tutulmuş ve 4 nolu buzağıya ait olan dışkı örneği 1:32, 62 nolu buzağıya ait olan dışkı örneği ise 1:64 titrede fare eritrositleri ile hemaglutinasyon vermiştir. Ancak önceden de belirtildiği gibi örnekler, dışkıda bulunma ihtimali olan ve özellikle hemaglutinasyon meydana getirebilme kabiliyetine sahip diğer etkenler yönünden araştırılmadığından elde edilen bu titrelerin sadece BCV'a özgü olabileceğini söylemek oldukça zordur. Bu araştırmada olduğu gibi direkt dışkı örneklerinden hazırladıkları numuneleri fare eritrositleri ile HA testine tabi tutan Gaber ve Kapil (1999), HA testinin ELISA'ya göre % 65.2 gibi düşük bir özgüllük gösterdiğini belirtmişler ancak HA titresini tespiti yapmamışlardır. Hemaglutinasyon titresini bu araştırmaya uygun olarak 1:16-1:64 arasında belirleyen Tsunemitsu ve ark (1991), çalışmalarında direkt dışkı yerine ishali buzağılardan toplanan dışkı ve nazal örneklerin HRT-18 hücre kültürüne ekimi sonucu elde edilen süpernatantları kullanmışlardır. Hemaglutinasyon titresini, bu araştırmada saptanan titreden çok daha yüksek (Örneğin DB2 suşu, fare eritrositleri ile 1:12800) olarak belirleyen Hasöksüz ve ark (1999b) ise kullandıkları suşları tamamen saflaştırdıktan sonra teste tabi tutmuşlardır.

Hücre kültürlerinde coronavirus izolasyonu amacıyla yapılan bir çalışmada (Sato ve Akashi 1993), ELISA ile BCV antijen varlığı yönünden pozitif bulunan 10 dışkı örneğinden (6'sı ishali buzağıdan, 4'ü ishali yetişkin sığırdan olmak üzere) hazırladıkları filtratları, vasata 2 µg/ml tripsin ilavesi ile HRT-18 hücre kültürlerine inokule etmişlerdir. Çalışmalarında 3. pasajda granülasyon ve hücre büyümesi ile ortaya çıkan, 5. pasajda ise tamamen belirginleşen bir CPE oluşumu ile kendini gösteren virüsü izole etmeyi başarmışlar ve HRT-18 hücre kültürlerinin BCV izolasyonu için duyarlı olduğunu ve vasata tripsin

ilavesinin CPE oluşumunu arttırdığını bildirmişlerdir. Cho ve ark (2001b), etçi sığırlarda enterik ve respiratorik bovine coronavirusların saçılımını inceledikleri bir araştırmada, ELISA ile pozitif olduğu belirlenen 10 dışkı ve 10 nazal svap örneğinden, vasata 5 µg/ml pankreatin ilavesiyle HRT-18 hücre kültürlerine adsorbsiyona bağlı ekim yapmışlardır. Bu örneklerden 3-5 kör pasajdan sonra hücrelerde büyüme, yuvarlaklaşma, koyulaşma gibi belirtilerle karakterize CPE gösteren 8 BECV, 8 BRCV suşu izole etmişlerdir. Toth (1982) tarafından, BCV'u çoğaltırken vasata 5 veya 10 µg/ml tripsin ilavesinin normal vasata göre hücre kültürlerini virusa karşı bir milyon kat daha fazla duyarlı hale getirdiğini belirten çalışma sonucuna uygun olarak bu araştırmada da hücrede virus izolasyonu amacıyla kullanılan vasata 10 µg/ml miktarında tripsin eklenmiştir.

Hasöksüz ve ark (2002)'nin Amerika'da besi hayvanlarında yaptıkları bir çalışmada, 32 adet hayvandan alınan nazal örneklerden hazırlanan filtratların HRT-18 hücre kültürlerine ekilmesi sonucunda 28 adet örnekten BCV izole edilirken, aynı hayvanlardan alınan fekal örneklerden sadece 7 tanesinden BCV izole edilebildiği bildirilmiştir. Tsunemitsu ve ark (1991), Japonya'da yaptıkları bir çalışmada ise yeni doğan buzağuların dışkılarından ve nazal svap örneklerinden BCV izolasyonu amacıyla, yaşları 3 ile 30 günlük olan ishali 180 buzağıdan ve bunlarla aynı çevrede bulunan 36 sağlıklı buzağıdan topladıkları fekal ve nazal svap örneklerini HRT-18 hücre kültürlerine inokule etmişler, 180 ishali buzağının 5 (% 3)'ünün dışkı örneğinden, 56 (% 31)'sının da nazal svap örneğinden ve 36 sağlıklı buzağının 10 (% 28)'una ait nazal svap örneğinden sitopatojen BCV izole ettiklerini bildirmişlerdir. Nazal svaplarından virus izolasyonu gerçekleştirilen bu buzağuların hiçbirisinin solunum yolu enfeksiyonu belirtisi göstermediği belirtilmiştir. Dışkı örneğinde BCV izolasyonu yapılan 5 buzağının nazal svap örneklerinden de BCV izolasyonu yapılması, virusun fekal-oral yolun yanı sıra aerosol-nasal yolla da etkin olarak bulaşabileceği ihtimalini ortaya koymuştur (Tsunemitsu ve ark 1991). Bu araştırmada ise ishali buzağılardan alınan ve

ELISA ile BCV antijeni yönünden pozitif olduğu belirlenen 2 dışkı örneğinin hücre kültürlerine inokulasyonu sonucunda BCV izole edilememiştir. Bunun nedenleri arasında saha suşlarının hücre kültürlerinde replikasyonunun zayıf olarak gerçekleşmesi, virusun labilitésinden dolayı laboratuvar uygulamaları sırasında kolaylıkla kaybedilebilmesi ya da enterik coronavirusların izole edilme olasılığının düşük olması gibi unsurlar sayılabilir. Diğer bir olasılık ise örnekleme zamanına bağlı olarak dışkıda bulunan enfeksiyöz partikül sayısının az olmasıdır. Dışkı örneklemesinin, ishal olgusunun başlangıç ve bitiş döneminde yapılması, dışkıdaki viral partikül sayısının tespit edilemeyecek kadar az olma ihtimalini arttırmaktadır. Çalışmada antijen varlığı tespit edilen 4 ve 62 nolu buzağuların dışkılarının ELISA okuyucusunda belirlenen OD değerlerinin (sırasıyla 0.264 ve 0.441), ortalama pozitif kontrol OD değerine (1.230) göre oldukça düşük olması (Tablo 4.4), bu olasılığı kuvvetlendirmektedir. Sonuçta ELISA ile antijen varlığı yönünden pozitif olarak belirlenseler dahi düşük OD değerine sahip olan örneklerden hücre kültürlerinde virus izolasyonunun güç olabileceği ihtimali de bir olasılık olarak düşünülmüştür.

Bovine coronavirusun birkaç saha izolatını ve Mebus suşunu, Vero hücre kültürlerinde çoğalttıktan sonra MDBK ve fotal dana böbrek hücre kültürlerine adaptasyonunu gerçekleştiren Dea ve ark (1980)'nin aksine bu araştırmada, ELISA ile BCV antijeni belirlenen dışkı örneklerinden Vero ve MDBK hücre kültürlerinde izolasyon gerçekleştirilememiştir. Bu çalışma sonucuna uygun olarak Benfield ve ark (1990) da bovine turbinat, bovine akciğer ve MDBK hücre kültürlerinin, enterik BCV'ların çoğaltılması için uygun ortamlar olmadığını, izolasyon için en iyi ortamın HRT-18 hücre kültürü olduğunu savunmuşlardır. İshalli hayvanların dışkı örneklerinden hücre kültürlerinde virus izolasyonunun düşük oranda gerçekleşmesine bir açıklık getiremeyen Tsunemitsu ve ark (1991) ise BCV'un teşhisinde daha duyarlı tekniklerin kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Buzağı ishallerine neden olan enfeksiyöz etkenlere karşı korunmada kolostrum alımının çok önemli olduğu bilinmektedir. Bu araştırmada seropozitif annelere ait buzağıların sadece % 32'sinde seropozitiflik saptanması, halk elindeki küçük işletmelerde bulunan buzağılara kolostrumun verilmesi aşamasında ciddi aksaklıkların olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmada buzağıların kolostrum alıp almadıkları hususunda sağlıklı bir bilgi edinilememiş olsa bile, işletme sahipleri tarafından ishale neden olduğu gerekçesiyle buzağıların büyük bir çoğunluğuna kolostrumun verilmediği ifade edilmiştir. Araştırmada, annesi yüksek düzeyde (++++) seropozitif olduğu belirlenen 4 nolu buzağının dışkısında BCV saptanırken seronegatif olması da bu durumu kanıtlar niteliktedir. Ayrıca seropozitif oldukları ortaya konan yavruların, antikorları kolostrum aracılığı ile değil, geçmişte virusla karşılaşmaları neticesinde kazandıkları dşnlmektedir.

Bovine coronavirusun soğuk ve nemli ortamlarda uzun süre canlı kalabilme özelliğine bağlı olarak buzağılarda meydana getirdiği enfeksiyonlar, kış aylarında ve ilkbahar başlangıcında daha sık gözlenmektedir (Bulgin ve ark 1989, Clark 1993). Bu nedenle araştırmada kullanılan dışkıların rneklemeleri Ekim ile Nisan ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Bulgin ve ark (1989) zellikle evre ısısının 0 0C'ın altına düşmesi durumunda yetişkinlerde virusun dışkı ile etrafa saçılımının, buzağılarda ise ishal riskinin, arttığını tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, hayvan sayısı ve bölge açısından sınırlı bir çalışma olmasına rağmen buzağılarda spesifik antijen, yetişkinlerde ise yüksek seroprevalans tespiti yapılan bu araştırma ile, BCV enfeksiyonlarının ülkemiz için önemli olduğu ortaya konmuştur. Ancak BCV'a karşı aşılama ya da doğal enfeksiyon sonucu oluşan maternal antikorların buzağıları korumada etkinliklerinin ne olduğu, aerosol bulaşmanın buzağı ishallerinin oluşmasında etkin olup olmadığı, BCV'un respiratorik suşları ile enterik suşları arasındaki ilişkilerin ne olduğu, bunun enfeksiyonun patogenezindeki önemi ve özellikle erişkin hayvanlarda virusun kronik

saçılımının nereden kaynaklandığı sorularına cevap verecek olan araştırmaların gerçekleştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca ekonomide önemli kayıplardan sorumlu olduğu tahmin edilen BCV'un, ülkemizdeki izolasyon çalışmalarına önem verilerek, izolatların antijenik ve genetik özelliklerinin araştırılması ve bu izolatlardan aşı üretimi yapılarak etkinliklerinin belirlenmesi faydalı olacaktır.



6.ÖZET

Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2005

Sibel HASIRCIOĞLU

Buzağlarda enterik bovine coronavirus enfeksiyonlarının araştırılması ve epidemiyolojide klinik olarak sağlıklı sığırların rolü

Enterik bovine coronavirus (BCV) varlığı yönünden; 63 adet ishallerli buzağıdan ve 77 adet klinik olarak sağlıklı inekten (63 adedi ishallerli buzağuların annelerine ait olmak üzere) alınan dışkı örnekleri ELISA ile incelendi. BCV; araştırmada kullanılan hiçbir annenin/ineğın dışkısında saptanamazken, 63 buzağıya ait dışkının 2 (% 3.1) tanesinde tespit edildi. Ayrıca, 63 ishallerli buzağının 36'sından ve 77 ineğın 46'sından alınan kan serum örnekleri kompetitif-ELISA ile coronavirusa spesifik antikorlar yönünden araştırıldı. Sonuçta 36 buzağının 9 adedinde (% 25) ve 46 ineğın 35 adedinde (% 76) seropozitiflik gözlemlendi. Virus izolasyonu amacıyla BCV antijen varlığı saptanan 2 adet dışkı örneğinin Vero, MDBK ve HRT-18 hücre kültürlerine ekimleri yapıldı. Dışkı örneklerinin her bir hücre kültürüne 5 kör pasajı sonucunda BCV izolasyonu gerçekleştirilemedi.

7. SUMMARY

Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2005

Sibel HASIRCIOĞLU

Investigation of Enteric Bovine Coronavirus infections in calves and the role of clinically healthy cattle in epidemiology of coronavirus infections

Fecal specimens from 63 diarrhoeic calves and 77 healthy cows (Out of 77 cows, 63 were dams of diarrhoeic calves) were examined for the presence of bovine coronavirus (BCV) antigens by ELISA. Coronavirus was detected in feces of 2 (3.1 %) of 63 calves while not detected in any of the cows. Blood serum samples from 36 of 63 diarrhoeic calves and from 46 of 77 cows were also tested coronavirus specific antibodies by competitive ELISA. Nine (25%) of 36 calves and 35 (76%) of the 46 cows were seropositive. Two fecal samples that were determined to be coronavirus positive by ELISA were also inoculated into Vero, MDBK and HRT-18 cell cultures. BCV was not isolated from two faecal samples after 5 blind passages on the cell lines.

8.LİTERATÜR LİSTESİ

- Abraham G, Roeder PL and Zewdu R (1992)** *Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves*, Trop Anim Hlth Prod, 24, 74-80.
- Alenius S, Niskanen R, Juntti N and Larsson B (1991)** *BCV as the causative agent of winter dysentery : Serological evidence*, Acta Vet Scand., 32 (2), 163-170 .
- Alkan F (1998)** *Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü*, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 45(1), 29-37.
- Alkan F, Bilge-Dağalp S, Can-Şahna K ve Özgünlük İ (2003)** *Sığırlarda coronavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisi*, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 50, 59-64 .
- Athanassious R, Marsolais G, Assaf R, Dea S, Descoteaux JP, Dulude S and Montpetit C (1994)** *Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec:Evaluation of three diagnostic methods*, Can Vet J, 35, 163-169.
- Atterhem K, Fossum C, Traven M, Linde N, Näslund K and Larsson B (1996)** *Type 1 interferon and virus-specific IgA and IgM antibodies as an aid in the diagnosis of ongoing infections in calves*, Swedish J Agric Res., 26, 101-104.
- Benfield DA and Saif LJ (1990)** *Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery*, J Clin Microbiol, 28, 1454-1457.
- Bridger JC, Woode GN and Meyling A (1978)** *Isolation of coronaviruses from neonatal calf diarrhoea in Great Britain and Denmark*, Vet Microbiol, 3, 101-113.
- Bulgin MS, Ward ACS, Barrett DP and Lane VM (1989)** *Detection of rotavirus and coronavirus shedding in two beef cow herds in Idaho*, Can Vet J, 30, 235-239.

Carman PS and Hazlett MJ (1992) *Bovine coronavirus infection in Ontario, 1990-1991*, Can Vet J, 33, 812-814 .

Cho K –O, Hasoksuz M, Nielsen PR, Chang K –O, Lathrop S and Saif LJ (2001a) *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.

Cho K -O, Hoet AE, Loerch SC, Wittum TE and Saif LJ (2001b) *Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle*, Am J Vet Res, 62, 9, 1436-1441.

Clark MA (1993) *Bovine Coronavirus*, Br Vet J, 149 (1), 51-70.

Collins JK, Riegel CA, Olson JD and Fountein A (1987) *Shedding of enteric coronavirus in adult cattle*, Am J Vet Res, 48(3), 361-365.

Crouch CF and Acres SD (1984) *Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows*, Can J Comp Med, 48, 340-342.

Crouch CF, Raybould TJ and Acres SD (1984) *Monoclonal antibody capture ELISA for detection of bovine enteric coronavirus*, J Clin Microbiol, 19, 388-393

Crouch CF, Bielefeldt Ohmann H, Watts TC and Babluk 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 and Francis MJ (2001) *Lactogenic immunity following vaccination of cattle with bovine coronavirus*, Vaccine, 19, 189-196.

Czerny CP and Eichhorn W (1989) *Characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to bovine enteric corona virus: Establishment of an efficient ELISA for antigen detection in feces*, Vet Microbiol, 20, 111-122.

Dea S, Roy RS and Begin ME (1980) Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines, Am J Vet Res, 41, 30-38.

De Rycke J, Bernard S, Laporte J, Naciri M, Popoff MR and Rodolakis A (1986) *Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves*, Ann Rech Vet, 17, 159-168.

Durham PJK, Hasard LE, Armstrong KR and Naylor JM (1989) *Coronavirus-associated diarrhea (Winter dysentery) in adult cattle*, Can Vet J, 30, 825-827.

Erdoğan H M, Ünver A, Güneş V And Çitil M (2003) *Frequency of rotavirus and coronavirus in neonatal calves in Kars District*, Kafkas Univ Vet Fak Derg, 9, 65-68.

Eskiizmirli S N, Öncel T, Beyazıt A And Mısırlıoğlu Ö Z (2001) *Türkiye'nin değişik illerinde ishalleri buzağılarda rotavirus, coronavirus ve cryptosporidiosis yayılımı*, Vet Hek Mikrobiol Derg, 1, 2, 35-42.

Fagan JG, Dwyer PJ and Quinlan JF (1994) *The diagnosis and occurrence of enteropathogens associated with calf diarrhoea in Ireland*, Irish Vet J, 47, 313-318.

Fukutomi T, Tsunemitsu H and Akashi H (1999) *Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities*, Arch Virol, 144, 997-1006.

Gaber F and Kapil S (1999) *Development of antigen spot test for detection of coronavirus in bovine fecal samples*, Clin Diag Lab Immunol, 6, 542-544.

Gül Y (1999) *Yeni doğan buzağılarda ishal ile seyreden infeksiyöz hastalıklar*, Veteriner, 48-54.

Hasöksüz M, Lathrop S, Al-dubaib MA, Levis P and Saif LJ (1999a) *Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses(BECV) and bovine respiratory coronaviruses(BRCV) detected using monoclonal antibodies*, Arch Virol, 144, 2441-2447.

Hasöksüz M, Lathrop SL, Gadfield KL and Saif LJ (1999b) *Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses*, Am J Vet Res, 60, 1227-1233.

Hasöksüz M, Hoet AE, Loerch SC, Wittum TE, Nielsen PR and Saif LJ (2002a) *Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot*, J Vet Diagn Invest, 14, 308-313.

Hasöksüz M, Sreevatsan S, Cho K-Oh, Hoet AE and Saif LJ (2002b) *Molecular analysis of the S1 subunit of spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates*, Virus Research, 84, 101-109.

Hasöksüz M, Kayar A, Dodurka T and Ilgaz A (2005) *Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey*, Acta Veterinaria Hungarica, 53, 1, 137-146

Heckert RA, Saif LJ, Myers GW and 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.

Holmes KV and Enjuanes L (2003) *Virology. The SARS coronavirus: a postgenomic era*, Science, 300, 1377-1378.

Holmes KV and Lai MMC (1996) *Coronaviridae: The viruses and their replication*. In “Fields Virology” Ed. by BN Fields, DM Knipe and PM Howley, 1075-1093, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Ikemori Y, Otha M, Umeda K, Icatlo Jr FC, Kuroki M, Yokoyama H and Kodoma Y (1997) *Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder*, Vet Microbiol, 58, 105-11.

Kapil S, Richardson KL, Maag TR and Goyal SM (1999) *Characterization of bovine coronavirus isolates from eight different states in the USA*, Vet Microbiol, 67, 221-230.

Kohara J, Hirai T, Mori K, Ishizaki H and Tsunemitsu H (1997) *Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea*, J Vet Med Sci, 59, 1023-1025.

Lai MMC and Cavanagh D (1997) *The molecular biology of coronavirus*, Adv Virus Res, 48, 1-100.

McNulty MS, Bryson DG, Allan GM and Logan EF (1984) *Coronavirus infection of the bovine respiratory tract*, Vet Microbiol, 9, 425-434.

Mebus CA (1990) *Neonatal calf diarrhea virus*. In “Virus Infections of Ruminants” Ed. by Z Dinter and B Morein, 297-300, Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands.

Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB and Twiehaus, MJ (1973) *Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent.*, Am J Vet Res, 34, 145-150.

Milli ÜH ve Hazıroğlu R (2000) *Bağırsağın viral hastalıkları* “Veteriner Patoloji”, 84, Özkan Matbacılık, 1.Cilt, Ankara.

Mostl K (1990) *Coronaviridae, Pathogenetic and Clinical Aspects: An Update*, Comp Immun Microbiol Infect Dis, 13, 4, 169-80.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC and Studdert MJ (1999) *Veterinary Virology*, Academic Press, California, USA.

Myers LL, Firehammer BD, Border MM and Shoop DS (1984) *Prevalence of enteric pathogens in the feces of healthy beef calves*, Am J Vet Res, 45, 8, 1544-1548.

Oxford JS, Bossurt S and Lam (2003) *A new infectious disease challenge : Urbani severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus*, Immunology, 109, 326-328.

Reynolds DJ, Chasey D, Scott AC and Bridger JC (1984) *Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces*, Vet Rec, 114, 397-401.

Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JC, Debney TG and Bunch KJ (1986) *Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain*, Veterinary Record, 119, 34-39.

Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD and Theil KW (1986) *Experimentally induced coronavirus infections in calves: Viral replication in respiratory and intestinal tracts*, Am J Vet Res, 47, 7, 1426-1432.

Saif LJ (1987) *Development of nasal, fecal and serum isotype-specific antibodies in calves challenged with bovine coronavirus or rotavirus*, Vet Immunol Immunopathol, 17, 425-439.

Saif LJ, Heckert RA, Miller KL and Tarek MM(1988) *Cell culture propagation of bovine coronavirus*, J Tiss Cult Methods, 11, 139-145.

Saif LJ (1990) *A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: An enigma resolved ?*, Cornell Vet, 80, 303-311.

Saif LJ and Heckert R.A.(1990) Enteric Coronaviruses, In: Viral diarrheas of man and animals, pp 82-252

Saif LJ (1993) *Coronavirus immunogens*, Vet Microbiol, 37, 235-297.

Saif LJ (2004) *Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome?*, Rev sci tech Off int Epiz, 23, 643-660.

Sato M and Akashi H (1993) *Detection of bovine coronavirus by ELISA using monoclonal antibodies*, J Vet Med Sci, 55, 5, 771-774.

Schoenthaler SL and Kapil S (1999) *Development and applications of a bovine coronavirus antigen detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, Clin Diagn Lab Immunol, 6, 130-132.

Shultz B, Gross HJ, Brossmer R and Herrler G (1991) *The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant*, J Virol, 65, 6232-6237.

Siddell S, Helmut W and Meulen VT (1983) *The biology of coronaviruses*, J Gen Virol, 64, 761-776.

Smith DR (1997) *Winter dysentery in dairy cattle: An epidemiological investigation of the role of bovine coronavirus and other risk factors*, Thesis, The Ohio State University, Ohio.

Toth TE (1982) *Trypsin-enhanced replication of neonatal calf diarrhea coronavirus in bovine embryonic lung cells*, Am J Vet Res, 43, 967-972.

Traven M, Björnerot L and Larsson B (1999) *Nationwide survey of antibodies to bovine coronavirus in bulk milk from Swedish dairy herds*, Vet Record, 144, 527-529.

Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai T, Kudo T, Oneo S, Mort K and Shimizu M (1991) *Isolation of bovine coronavirus from feces and swabs of calves with diarrhea*, J Vet Med Sci, 53, 3, 433-437.

Van Kruiningen HJ, Khairallah LH, Sasseville VG, Wyand MS and Post JE (1987) *Calfhood coronavirus enterocolitis: A clue to the etiology of winter dysentery*, Vet Pathol, 24, 564 -567.

Verbeek A and Tijssen P (1988) *Biotinylated and radioactive cDNA probes in the detection by hybridization of bovine enteric coronavirus*, Mol Cell Probes, 2, 209-223.

White D and Fenner F (2000) *Coronaviridae 'Medical Virology'* Çeviri: Doç.Dr. Mehmet Ziya Doymaz, 451-455, Acedemic Pres.

Zhang Z, Andrews GA, Chard-Bergstrom C, Minocha HC and Kapil S (1997) *Application of immnohistochemistry and in situ hybridization for detection of bovine coronavirus in paraffin-embedded, formalin-fixed intestines*, J Clin Microbiol, 35, 11, 2954-2955.

9. ÖZGEÇMİŞ

17.03.1973 tarihinde Kahramanmaraş'ın Göksun ilçesinde doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise eğitimini Türkiye'nin çeşitli şehirlerinde tamamladıktan sonra 1990 yılında kazandığı Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1995 yılında mezun oldu. 1997- 1998 yılları arasında Bingöl ilinde öğretmenlik yaptı ve 1998 yılında Tarım Bakanlığı'na geçiş yaptı. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu doktora sınavını kazanarak S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 1999 yılında Bingöl Tarım İl Müdürlüğü'nden Malatya Tarım İl Müdürlüğü'ne tayin oldu ve 5 yıl Malatya'da görev yaptı. 2004 yılından itibaren Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde veteriner hekim olarak görev yapmaktadır.

10.TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında her zaman yardımlarından ve bilgilerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK, Prof. Dr. Sibel YAVRU, Yrd. Doç. Dr. Orhan Yapkiç'a, sevgili arkadaşlarım Dr. Oya Bulut ve Araş. Gör. Oğuzhan Avcı'ya, numune toplanması esnasında özverili yardımlarını benden esirgemeyen Malatya Tarım İl Müdürlüğü Hayvan Sağlık Şubesi'nde görevli Hayvan Sağlık Teknisyenleri değerli Mehmet SEYHAN, Osman KÜÇÜK, Rıfat TUNCER ve Cumali AVCI'ya, tez konumla ilgili önemli bilgi alışverişinde bulunduğum İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Mustafa Hasöksüz'e, HRT-18 hücre kültürünün temininde yardımlarını gördüğüm Ankara Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Feray Alkan ve Doç. Dr. Seval Bilge Dağalp'e ve tezim esnasında yaşanan tüm sıkıntılarında bana hep destek olan sevgili annem Gülser HASIRCIOĞLU ve sevgili babam Kazım HASIRCIOĞLU'na sonsuz teşekkürler.