



## Erzurum Bölgesinde Sığırlarda Respiratorik Coronavirus Enfeksiyonunun

### RT-PCR ile Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Mehmet Özkan TİMURKAN<sup>1</sup>✉, Hakan AYDIN<sup>1</sup>, Sema BELEN<sup>1</sup>

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.07.2015	06.10.2015	20.12.2015

**Özet:** Sığırların coronavirusları (BCoV) dünya genelinde sığırcılık işletmelerini etkileyerek ciddi solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu çalışmada, sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerinde coronavirusların varlığını/yaygınlığını göstermek ve tespit edilen virusların diğer coronaviruslarla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Erzurum ili ve ilçelerinde solunum sistemi semptomları gösteren, farklı ırk ve yaş gruplarında 54 adet sığır çalışmaya dahil edildi. Materyal olarak hayvanlardan burun sıvabı ve mezbahada kesilen hayvanlardan pnömonili akciğer dokusu alındı. Toplanan örneklerde viral nükleik asit ekstraksiyonu, RT-PCR ve nested-PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Bölgeyi temsilen bir amplicon dizi analizine tabi tutuldu. Yöremize ait coronavirus suşu ile gen bankasından sağlanan aşı ve çeşitli coronavirus suşlarına ait nükleik asit dizilimi karşılaştırılarak karakterize edildi. Coronavirus yönünden yapılan moleküler incelemeler sonucunda solunum sistemi enfeksiyonu bulunan 54 sığırdan alınan akciğer doku ve sıvab örneğinin 11 (%20.4)'inde etken pozitif olarak belirlenmiştir. Ayrıca dizi analizi sonucu bölgede sirküle olan virusun *Betacoronavirus A* grubunda yer aldığı ve aşı suşuyla aynı clusterda yer aldığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile bölgemiz ve ülkemiz açısından mevcut durum güncellenerek epidemiyolojik verilere katkıda bulunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Erzurum, Respiratorik Coronavirus, RT-PCR, Sığır.

## The Detection and Molecular Characterization of Bovine Respiratory Coronavirus Infection by RT-PCR in Erzurum

**Abstract:** Bovine coronavirus (BCoV) cause severe respiratory and gastrointestinal infections affecting the animal breeding industry worldwide. In this study, we aimed to evaluate the presence/currency of coronavirus, and to identify the relationship with other coronaviruses. Fifty-four cattle (in different breeds and ages) with respiratory symptoms that have been breeding in the surrounding districts and Erzurum were included in this study. Samples of nasal swap and lung tissue with pneumonia were taken, as material, from the animals slaughtered. The samples collected were subjected to viral nucleic acid extraction, RT-PCR and Nested-PCR. The amplicon representing the region was sequenced. Coronavirus strains that were identified in our region and those obtained from the Gene Bank (as vaccine and reference strains) were compared by sequencing process. As a result of molecular analyses, 11 (20.4 %) samples (swap and lung tissue) collected from 54 cattle with respiratory system infection were positive. Moreover, it was determined that the circulating virus in the region was belonging to the group of betacoronavirus A and it was in the same cluster with the vaccine strain. By this study, the current situation has been updated both in our region and the country and also contributed to the epidemiological data.

**Keywords:** Cattle, Erzurum, Respiratory Coronavirus, RT-PCR.

## GİRİŞ

Coronavirus enfeksiyonları solunum ve sindirim sistemini etkileyerek sığır yetiştiriciliği açısından ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (1). Bu enfeksiyonların başında da pnömoniler gösterilebilir. Pnömonilerin oluşmasında kötü ahır koşulları, transportlar, yem değişiklikleri ve kötü bakım - besleme gibi fiziksel şartlar rol oynamaktadır. Ayrıca bakteriler, virüsler ve parazitlerde pnömonilerin oluşmasında etiyolojik ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanı sıra hastalığın seyrinde aktif ve pasif bağışıklık düzeyleri de önemli rol oynar (2). Enfeksiyöz ajanlar içerisinde viral ajanlar; tedavilerinin çok güç olması, bulaşmalarının hızlı olması ve sekonder etkenlere zemin hazırlaması gibi nedenlerden dolayı daha da önem kazanmaktadır. Solunum sistemini etkileyen viral etkenler içerisinde Bovine Respiratorik Sinsityal Virus, Parainfluenza Virus-3, Bovine Herpes Virus 1, Bovine Viral Diyare Virus, Bovine Adenovirus ve Bovine Respiratory Coronaviruslar sayılabilir (3, 4).

Bovine coronaviruslar sindirim sistemine yerleşerek yeni doğan buzağılarda kış dizanterisine, yine buzağılarda ve besi sığırlarında solunum sistemine yerleşerek solunum sistemi enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (5). Ayrıca son yıllarda ülkelerin korkulu rüyası haline gelen coronavirusların sebep olduğu SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) (6) ve deve-yarasa-insan üçgeni teorileriyle gündeme oturan zoonoz karakterli MERS (Middle East Respiratory Syndrome) orta doğuda birçok insanı etkileyerek ölümlere yol açmıştır (7,8).

Coronaviruslar, *Coronaviridae* ailesinde bulunan hem insan hem de hayvanları etkileyen zarlı, pozitif polariteli RNA viruslarıdır. Bu virüsler genetik olarak 4 gruba ayrılır. Bunlar alfa, beta, gama ve delta gruplarıdır. Coronaviruslar, 5 önemli proteinden oluşur. Bunlar nükleocapsit proteini (N), transmembran proteini, spike proteini (S), small membran ve hemaglutinin/esterazdır (HE) (9).

Virolojik çalışmalarda teşhis amaçlı olarak bazı genler hedef alınarak PCR yapılabilir. Bu genler genellikle mutasyonel açıdan korunaklı gen bölgeleridir. Coronaviruslar açısından Center for Disease Control and Prevention (CDC) kuruluşunun belirttiği gibi virüsün teşhisi açısından nükleoprotein (N) geni hem izleme hem de doğrulama amaçlı olarak PCR çalışmalarında kullanılabilir. Betacoronaviruslar; başta sığır ve insan olmak üzere, domuz, köpek, deve, ve tavşanları etkileyen, SARS ve MERS gibi zoonotik potansiyele sahip virüsleri de kapsayan bir gruptur (10).

Dünyada ve ülkemizde coronavirusların enterik sisteme olan etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunsa da (1,2,5,11), respiratorik sisteme yerleşim gösteren virüsün teşhisi ve karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar sınırlıdır. (12,13). Güncel veriler kapsamında Alkan ve ark. (12) en detaylı çalışmayı yapmış ve ülke genelinde elde edilen virüslardan S gen bölgesi düzeyinde sadece gaitadan moleküler karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmişlerdir.

Bu çalışmada, Erzurum yöresinde coronavirus varlığının araştırılması, yaygınlığının belirlenmesi ve ayrıca tespit edilen suşun diğer sığır kökenli coronaviruslarla ve aşı suşuyla benzerliğinin genomik düzeyde ortaya konulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Örnekler

Çalışmanın materyalini Eylül 2013 – Mart 2014 yılları arasında, Erzurum ili (Mezbaha, n=8; hayvan pazarı, n=7; tuzcu köyü, n=5, Atatürk Üniv. Vet. Fak. Klinikleri, n=2) ve ilçelerinden (Merkez, n=2; Tekman, n=2; Oltu, n=5; Şenkaya, n=1; Horasan, n=10; Hasankale, n=12) farklı hayvanlara ait toplam 54 adet akciğer dokusu ve burun sıvab örnekleri oluşturmuştur. Çalışmanın materyalini oluşturan örnekler anabilim dalımıza rutin tanı faaliyetleri çerçevesinde gelen örneklerdir. Rutin tanı faaliyetleri

kapsamında gelen örneklerin yaş, ırk ve cinsiyet bilgileri elde edilememiştir. 54 adet örneğin 8 adedi akciğer dokusu geri kalan örnekler nasal sıvab örnekleridir.

### RNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon öncesi nasal sıvab örnekleri 1 ml steril su ile sulandırılıp, bir ependorf tüpe konuldu. 3000 rpm'de santrifüj sonrası süpernant alınarak ekstraksiyona geçildi. Akciğer doku örnekleri ise ekstraksiyon öncesinde 100 mg olarak küçültüldü ve bir ependorf tüpe konuldu. Üzerine manyetik boncular konularak TissueLyser LT (Qiagen, Almanya) doku homojenizatörü ile 5000 rpm'de 15 dk boyunca parçalandı. Süre sonunda santrifüj edilen örneklerin sıvı kısmı toplanarak ekstraksiyon işlemi uygulandı. Çalışma materyalini oluşturan 54 adet örnekten coronavirus RNA'sının izolasyonu Chomczynski ve Sacchi (14) tarafından bildirilen yöntemine uygun olarak gerçekleştirildi. İzolasyon sonunda 37°C de kurutulan nükleik asit pelleti 20µl DNAaz-RNAaz

içermeyen su ile re-süspanse edilerek cDNA eldesi için kalıp olarak kullanmak için hazır hale getirildi.

### Viral RNA'nın Revers Transkripsiyonu (RT)

RT-PCR amacıyla kullanılacak olan viral RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi işlemi amacıyla Revertaid First Strand cDNA kiti (Thermo Scientific, Almanya) kullanıldı. Firmanın öngördüğü şekilde yapılan prosedür sonunda cDNA elde edildi.

### PCR

PCR reaksiyonu için Cho ve ark., (15) tarafından bildirilen primerler ve yöntem kullanıldı. Etkene spesifik primer dizileri, PCR sonrası agaroz jelde ki ürün büyüklükleri ve PCR bağlanma derecesi tablo 1'de gösterilmiştir. Reaksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutularak moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılıp ardından UV ışık altında 406 bp büyüklüğünde bantlar coronavirus N geni yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

**Tablo 1.** PCR amplifikasyon ürünleri, primer dizileri ve uzunlukları.

**Table 1.** PCR amplification products, primer sequences and lengths.

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Büyükük (bp)	Bağlanma Derecesi	Literatür
N gen-F	GCAATCCAGTAGTAGAGCGT	700	50 °C	Cho ve ark., 2001
N gen-R	CTTAGTGGCATCCTTGCCAA			
N gen-nestedF	GCCGATCAGTCCGACCAATG	406	55 °C	
N gen-nestedR	AGAATGTCAGCCGGGGTAG			

### Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

PCR ve elektroforez işlemleri sonrası elde edilen ampikonlardan dizi analizi için uygun olan, yöreyi temsilen bir örnek sekans reaksiyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla hizmet alımı şeklinde (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Genetik Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye) DNA dizi analizi yaptırıldı. Dizi analizi sonrası elde edilen işlenmemiş veriler ile gen bankasından elde edilen referans suşlara ait nükleik asit dizisinin BioEdit version 7.0.5 (16) bioinformatik programlarla Clustral W yazılımı kullanılarak karşılaştırıldı. Aynı

programın çoklu hizalama (multiple alignment) özelliğinden yararlanılarak gen bankasından elde edilen diğer referans viruslarla ve referans olmayan diğer ülkelerde bildirilen yerel virusların kısmi ve komple genom dizileri ile hizalandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Ardından MEGA v6.0 (17) programı ile filogenetik analizi gerçekleştirildi (Şekil 1). Bu amaçla fasta formatına çevrilen tüm verilere Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Analizde Tamura'nın 2'li parametresi kullanıldı ve bootstrap değerleri filogenetik harita üzerinde gösterildi.

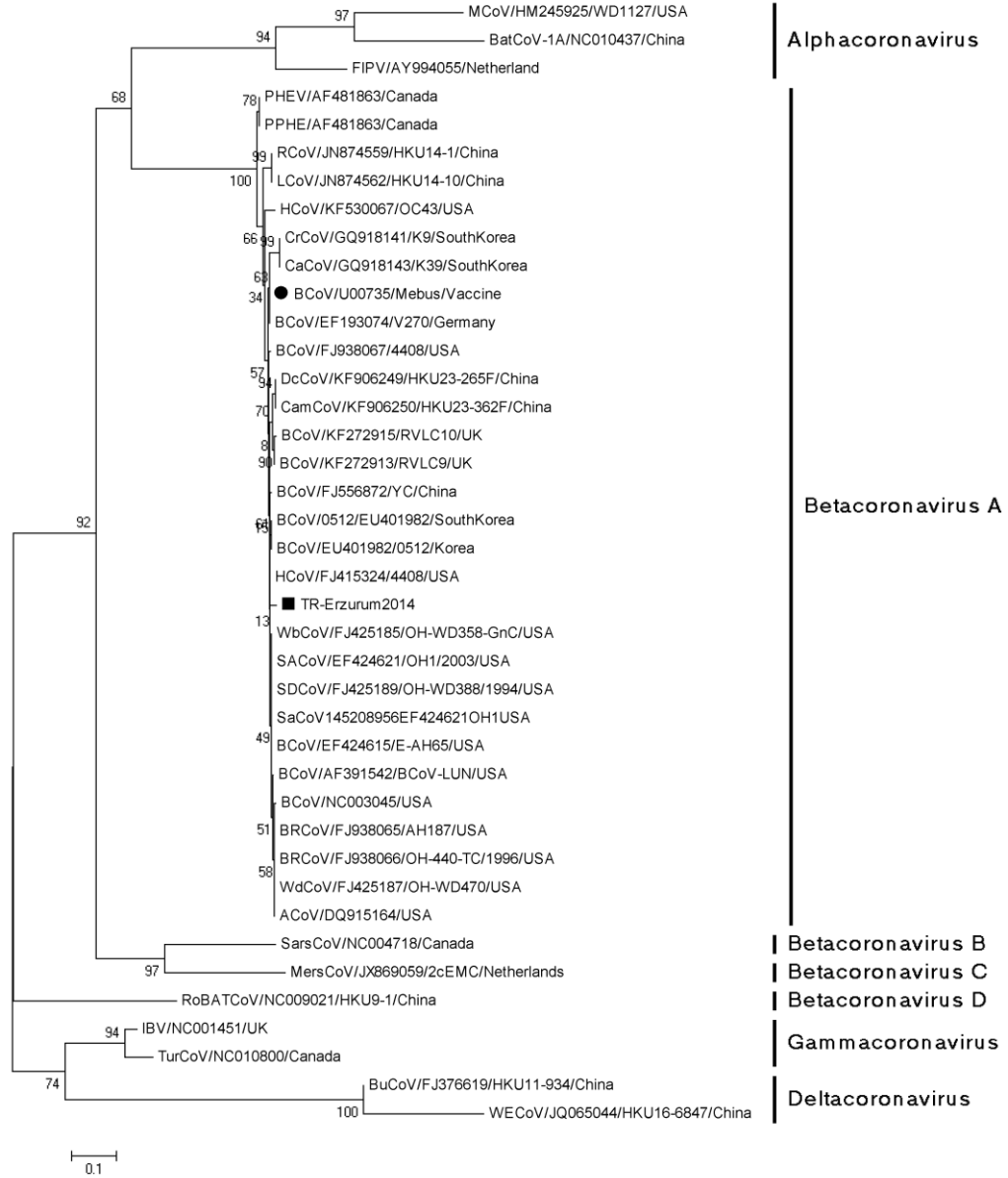
**BULGULAR**

Erzurum ve çevresinde bulunan 6 farklı bölgeden sağlanan (Merkez, Oltu, Şenkaya, Tekman, Horasan, Hasankale) 54 örnekte yapılan PCR sonuçlarına göre nasal sıvab ve doku örneklerinden 11 (11/54, %20.4) tanesinde coronavirus nükleik asidi tespit edildi (Hayvan pazarı, 1/7 (%14.3); Merkez ilçe 2/2 (%100); Tuzcu köyü, 3/5 (%60); Şenkaya ilçesi 1/1 (%100) ve Horasan ilçesi, 4/10 (%40). Yapılan

incelemede akciğer doku örneklerinin hiç birinde pozitiflik elde edilemezken, pozitiflik sadece sıvab örneklerinde bulunmuştur (11/46, %23.9). PCR sonrası elde edilen amplikonun dizi analizi sonrası filogenetik analizi gerçekleştirildi. Coronavirusların 4 genogruba ayrıldığı gerçeğiyle, elde edilen suşun genelde sığır coronaviruslarının da bulunduğu grup olan betacoronavirus A genogrubunda olduğu tespit edildi (Şekil 1).

**Şekil 1.** Coronavirusların gen bankasından alınan referans suşları ile elde edilen virusun filogenetik analizi.

**Figure 1.** The phylogenetic analysis of coronavirus novel virus and reference strains obtained from Gene Bank.



## TARTIŞMA ve SONUÇ

Bovine Herpesvirus-1 (BHV1), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Parainfluenza virus-3 (PIV-3), Bovine adenovirus (BAV-1), BAV-3, ve Sığır Coronavirus enfeksiyonları tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de yaygın olarak gözlenmekte ve meydana gelen ekonomik kayıplar nedeniyle özellikle geçimini hayvancılıkla sağlayan bölgelerde daha da önem kazanmaktadır. Türkiye’de ve dünyada sözü edilen enfeksiyonların ayrı ayrı ya da bir arada incelendiği birçok araştırma bulunmaktadır (1,18).

Bu çalışmada Erzurum ili ve ilçelerinden anabilim dalımıza gönderilen 8 adet akciğer örneği ve 46 adet nasal sıvab örneğine nested-RT-PCR testi yapılmış ve % 20.4 pozitiflik elde edilmiştir. Ayrıca bu örneklerden birinin dizi analiz sonrası coronavirus ailesinin *Betacoronavirus A* grubunda olduğu filogenetik olarak tespit edilmiştir. Alkan ve arkadaşlarının (12) İç Anadolu bölgesinde yaptığı çalışmada 199 sıvab örneğinden 2 tanesinde respiratory coronavirusu tespit etmişlerdir. Bu durum bizim sonucumuzla kıyaslandığında yöremizin respiratorik coronavirus varlığı açısından endemik bir bölge olduğu sonucunu düşündürmektedir.

Ülkemizde özellikle enterik coronavirusla mücadelede gebe ineklere gebeliğin son döneminde *Corona*, *Rota* ve *E. coli* kombine aşuları uygulanmaktadır. Ancak ülkemizde direkt respiratorik coronavirus’a yönelik aşı bulunmamaktadır (19). Yaptığımız N geni tabanlı filogenetik analiz sonucunda hem enterik hem de respiratorik sistemi etkileyen sığır coronavirusu yakın ilişkili olarak bulunmuş olması mevcut enterik aşının solunum sistemi enfeksiyonları içinde koruyucu olabileceğini düşündürse de diğer gen bölgelerinin de değerlendirileceği geniş kapsamlı deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Mevcut çalışmada BCoV nükleik asit varlığı, çalışma materyali olarak seçilen akciğer doku örneği ve nasal sıvab örneklerinde araştırıldı. Bu örneklerden sadece nasal sıvablarda pozitiflik tespit

edildi. Bu yönüyle önceki çalışmalarla tutarlı olduğu tespit edildi. (12, 13).

Bovine coronaviruslar, Amerikada, birçok Avrupa ülkesinde (2,4,20,21) ve Japonya’da (22) erişkin sığırlar ve yenidoğan buzağılarda solunum sistemi enfeksiyonu ve/veya diyare etkeni olarak tanımlanmıştır. Türkiye’de de sığırlarda coronavirus enfeksiyonu ile ilişkili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (12,13). Bu çalışmalarda virusun varlığı ve yaygınlığı serolojik ve virolojik olarak araştırılmıştır. Bu çalışmalardan moleküler olarak en kapsamlı çalışma Alkan ve ark.’nın (12) yaptığı çalışmadır. Moleküler tabanlı olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda bölgede elde edilen suşun genel sığır ve insan suşlarının olduğu *Betacoronavirus A* grubunda olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bazı ülkelerde aşı suşu olarak kullanılan mebus suşuda bu clusterda yer almıştır. Nükleotid benzerliği olarak insan suşuyla %94.3 (HCoV/KF530067/OC43/USA), aşı suşuyla %96.8 (BCoV/U00735/Mebus/Vaccine) ve diğer sığır coronaviruslarıyla en yakın %97.7 (BCoV/EU401982/0512/Korea) olarak tespit edilmiştir. Filogeni üzerinde farklı bir clusterda yerleşim göstermediğinden ve grup olarak da hem tespit edilen suş hem de aşı suşunun aynı grupta yerleşim gösterdiğinden dolayı, ülkemizde solunum sistemi karma aşularına coronavirus mebus suşu eklenerek bölgemizde korunma sağlanabileceği kanısına varılabilir.

Bu araştırma ile yöremizde solunum sistemi enfeksiyonları içerisinde coronavirusların yeri, yaygınlığı ve genetik karakterizasyonu moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda saha örneklerinin BCoV yönünden hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi, bu enfeksiyonun kontrolünde oldukça önemlidir. Moleküler tekniklerin ilerlemesi ile BCoV enfeksiyonunun hızlı ve duyarlı teşhisi, hastalığın kontrolünde alınacak aşılama ve karantina gibi tedbirlerin hızlı bir şekilde uygulanmasında oldukça değerlidir. Böylece salgınların neden olduğu ciddi ekonomik kayıpların önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma coronavirusların moleküler olarak irdelendiği Türkiye’de ikinci ve ilimizde (Erzurum) ilk çalışma olması açısından da önem arz etmektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında BCoV’un ilimiz hayvancılığı açısından önemli bir problem olduğu ve ekonomik olarak yöremiz çiftçisini etkileyebileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca prototip olarak Doğu Anadolu bölgesi içerisinde sadece bir ilde (Erzurum) yapılan bu çalışmanın perspektifinin genişletilerek tüm Doğu Anadolu’yu kapsayacak şekilde yapılması düşüncesindeyiz. Solunum sistemi viral aşı içeriklerinde bulunmayan coronavirusların özellikle bölgesel olarak geliştirilebilecek karma aşı mixlerinde olması gerektiği kanısındayız.

#### KAYNAKLAR

1. Alkan F., 1998. Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 45, 29-37.
2. Decaro N., Campolo M., Desario C., Cirone F., D’Abramo M., Lorusso E., Greco G., Mari V., Colaianni ML., Elia G., Martella V., Buonavoglia C., 2008. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 28-32.
3. Kirchhoff J., Uhlenbruck S., Goris K., Keil GM., Herrler G., 2014. Three viruses of the bovine respiratory disease complex apply different strategies to initiate infection. *Veterinary Research*, 18, 20-32.
4. O’Neill R., Mooney J., Connaghan E., Furphy C., Graham DA., 2014. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Veterinary Record*, 11, 351-355.
5. Cho KO., Halbur PG., Bruna JD., Sorden SD., Yoon KJ., Janke BH., Chang KO., Saif LJ., 2000. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery- like disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217, 1191-1194.
6. To KKW., Hung IFN., Chan JFW., Yuen K-Y., 2013. From SARS coronavirus to novel animal and human coronavirus. *Journal of Thoracic Disease*, 5, 103-108.
7. Corman VM., Ithete NL., Richards LR., Schoeman MC., Preiser W., Drosten C., Drexler JF., 2014. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *Journal Virology*, 88, 11297-11303.
8. Chu DK., Poon LL., Gomaa MM., Shehata MM., Perera RA., Abu Zeid D., El Rifay AS., Siu LY., Guan Y., Webby RJ., Ali MA., Peiris M., Kayali G., 2014. MERS coronavirus in dromedary camels, Egypt. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 1049-1053.
9. Lai MMC., Holmes KV., 2001. Coronaviridae: the viruses and their replication. In “Fields virology”, Ed., DM. Knipe, PM. Howley, DE. Griffin, MA. Martin, RA. Lamb, B. Roizman, SE. Straus, 4th ed., 1163–1185, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
10. Woo PCY., Lau SKP., Wernery U., Wong EYM., Tsang AKL., Johnson B., Yip CCY., Lau CCY., Sivakumar S., Cai JP., Fan RYY., Chan KH., Mareena R., Yuen KY., 2014. Novel betacoronavirus in dromedaries of the Middle East. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 560-572.
11. Akgül G., Mecitoğlu Z., Ertürk A., Çatık S., Temizel EM., Gülyaz V., Gülaçtı İ., Özdemir S., Onat K., Şenlik B., Şentürk S. 2013. Isolation of first local coronavirus from cattle with winter dysentery in Turkey. *Uludag University Journal of Faculty Veterinary Medicine* 32, 63-69.
12. Alkan F., Ozkul A., Bilge-Dagalp S., Karaoglu T., Oguzoglu TC., Caliskan E., Burgu I., 2011. The detection and genetic characterization based on the S1 gene region of BCOVs from respiratory and enteric infections in Turkey. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 179-185.
13. Hasöksüz M., Kayar A., Dodurka T., Ilgaz A., 2005. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronavirus in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53, 137-146.

14. Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
15. Cho KO., Hasöksüz M., Nielsen PR., Chang KO., Lathrop S., Saif LJ., 2001. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Archives of Virology*, 146, 2401-2419.
16. Hall T., 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Bioscience*, 2, 60-61.
17. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
18. Yavru S., Simsek A., Yapkiç O., Kale M., 2005. Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract. *Acta veterinaria*, 55, 219-226.
19. Altuğ N., Özdemir R., Cantekin Z. 2013. Ruminantlarda Koruyucu Hekimlik: I. Aşı Uygulamaları. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 10, 33-44.
20. Liu L., Hägglund S., Hakhverdyan M., Alenius S., Larsen LE., Belák S., 2006. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 957-960.
21. Hasöksüz M., Hoet AE., Loerch SC., Wittum TE., Nielsen PR., Saif LJ., 2002. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 308-313.
22. Kanno T., Hatama S., Ishihara R., Uchida I., 2007. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *Journal of General Virology*, 88, 1218-1224.