



Buzağı İshallerinde Coronavirusun Nukleoprotein Gen ve Rotavirusun VP7/VP4 Gen Bölgelerinin Kısmi Sekansı ve Filogenetik Analizi

Hakan AYDIN^{1✉}, Mehmet Özkan TİMURKAN¹

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

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
28.01.2018	09.03.2018	25.10.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Aydın H, Timurkan MÖ: Buzağı İshallerinde Coronavirusun Nukleoprotein Gen ve Rotavirusun VP7/VP4 Gen Bölgelerinin Kısmi Sekansı ve Filogenetik Analizi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 13 (2): 211-218, 2018. DOI: 10.17094/ataunivbd.372439

Öz: Dünya genelinde yaygın olarak gözlenen rotavirus ve coronavirus enfeksiyonları, yeni doğan buzağı ishallerinin etiyolojik ajanları arasındadır. Yirmi birinci yüzyılda enfeksiyon ajanlarının incelenmesi, moleküler tabanlı genetik çalışmalarla hız kazanmıştır. Günümüzde enfeksiyonlardan sorumlu rotavirusun bilinen en az 27 farklı G ve 37 farklı P genotipi tespit edilmiştir. Coronaviruslar ise genetik yakınlıklarına göre; dört genotipik gruba ayrılmaktadır. Bu çalışmada, buzağı ishallerine sebep olan rotavirus ve coronavirus enfeksiyonlarının moleküler düzeyde incelenmesi amaçlandı. Coronavirusun nukleoprotein gen bölgesi ve rotavirusun VP4 ile VP7 gen bölgelerine yönelik spesifik primerler kullanılarak kısmi sekansları ve ardından filogenetik analizleri yapıldı. Filogenetik analiz için GenBank'tan elde edilen referans suşlar kullanıldı. VP7 gen bölgesinin analizi sonucunda Erzurum suşlarının G6 ve G10 genotipine, VP4 gen bölgesine göre ise tüm suşların P[5] genotipine ait olduğu tespit edildi. Coronavirus yönünden yapılan filogenetik analiz sonuçlarına göre ise Erzurum suşları; geyik, zürafa, yarasa, siğir ve insan coronavirus suşları ile birlikte beta-coronavirus genogrubu içerisinde toplandı. Sonuç olarak bu çalışma ile Erzurum'da ilk kez enterik coronavirus ve rotavirus moleküler olarak araştırılmış olup sonraki çalışmalar için bir temel oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: Coronavirus, Erzurum, Moleküler karakterizasyon, Rotavirus, Siğir.

Partial Sequence and Phylogenetic Analysis of The Nucleoprotein Gene of Coronavirus and VP7/VP4 Gene of Rotavirus in Calf Diarrhea

Abstract: The rotavirus and coronavirus are etiological agent of neonatal calf diarrhea and they are widespread in the world. In the twenty first century, investigation of infectious agents have accelerated with molecular-based genetic studies. So far as is known, at least 27 distinct G genotypes and 37 distinct P genotypes have been identified. Coronaviruses are divided into four genotypic groups based on their genetic distance. The aim of this study, we investigate the rotavirus and coronavirus infections in calf diarrhea based on molecular analysis. Partial sequencing of the coronavirus nucleoprotein gene fragment and rotavirus VP4 and VP7 gen fragment was performed using specific nested primer pairs and followed phylogenetic analyses. Phylogenetic tree was constructed using reference strains obtained from GenBank. The Erzurum rotavirus strains were involved in G6 and G10 genogroup based on VP7 coding gen region and all rotavirus strain was involved in P[5] genogroup based on VP4 coding gen region. The phylogenetic analysis of coronavirus strains showed that Erzurum strains, deer, giraffe, bat, bovine and human coronavirus strains take part in Beta-coronavirus genogroup. As a conclusion, this is the first investigation of enteric coronavirus and rotavirus based on molecular analyses in Erzurum. This study will provide an advantage for the further studies.

Keywords: Bovine, Coronavirus, Erzurum, Molecular characterization, Rotavirus.

✉ Hakan AYDIN

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: hakanaydin.dr@gmail.com

GİRİŞ

Buzağı ishalleri dünya genelinde sık gözlenen hastalıklar arasında olmakla beraber hayvan yetiştiriciliği yapılan işletmeler ve ülke ekonomisi açısından önem arz etmektedir. Ekonomik kayıp özellikle buzağı kaybı ile ilişkilidir (1). Gelişmiş ülkelerde dâhil olmak üzere buzağı kaybında ilk sırayı yeni doğan buzağı isalleri almaktadır. Buzağı ishallerinde enfeksiyöz olmayan faktörler de etkili olmasına rağmen enfeksiyöz ajanların payı çok daha büyüktür. İshal etiolojisinde enfeksiyöz faktörler arasında yer alan grup A rotaviruslar ve coronaviruslar sık rastlanan ajanlar arasında yer almaktadırlar (1,2). Rotaviruslar, *Reoviridae* ailesinde yer alan, çift zincirli ve 11 segmentten oluşan RNA genomuna sahip zarfsız viruslardır. Genomik segmentler, altısı yapısal (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 ve VP7) ve altısı yapısal olmayan (NSP1–NSP6) toplam 12 protein kodlamaktadır (1,3). Rotavirusların dış kapsid proteini olan VP4 (viral protein 4) ve VP7 (viral protein 7), konakta nötralizan antikor üretimini tetiklemekle beraber, bu proteinleri kodlayan nükleotid sekansına göre virusun P (proteaz) ve G (glikoprotein) genotipleri belirlenebilmektedir. Şimdiye kadar rotavirusun bilinen en az 27 farklı G ve 37 farklı P genotipi tespit edilmiştir (1,3-5). Diğer bir enterik patojen olan coronaviruslar genetik yakınlıklarına göre; Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gamacoronavirus ve Deltacoronavirus olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (6). Sığır coronavirusları, *Coronaviridae* ailesinde yer alan zarlı, pozitif polariteli RNA viruslarıdır. Coronaviruslar nucleoprotein (N), transmembran (M), spike (S), small membran (E) ve hemaglutinin esteraz (HE) olmak üzere beş temel proteinden oluşur. Klinik olarak yaşamın ilk haftalarında ishal ile karakterize olmakla beraber özellikle erginlerde ileri dönemlerde kış dizanterisi ve solunum sistemi enfeksiyonlarından oluşan üç farklı enfeksiyonla karşımıza çıkmaktadır (1,5,6). Oldukça geniş konakçı aralığına sahip olan coronaviruslar kanatlı ve memeli hayvanları etkilemektedir. Ancak son yıllarda özellikle insanlarda ortaya çıkan zoonotik kaynaklı “Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) ve Middle-East respiratory

syndrome coronavirus (MERS-CoV)” enfeksiyonları dikkatleri coronaviruslar üzerine çekmiştir (7). Bu tür patojenlerin biyolojisi ve genetiğini bilmek onlarla mücadele ve korunma stratejisi geliştirilmesinde anahtar rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, Erzurum ili ve ilçelerinde tespit edilen buzağı ishallerinde viral ajanların araştırılması ve tespit edilen bu virüslerin moleküler karakterizasyonlarının yapılarak genetik düzeyde irdelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Gaita Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi

Erzurum il ve ilçelerinden 2016 yılı içerisinde 0-1 aylık 33 adet ishali buzağı gaita örneği Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji laboratuvarına getirildi ve analiz edilinceye kadar -20°C’de muhafaza edildi. Gaita örnekleri 1/10 oranında distile su ile süspanse edilerek iyice vortekslendi. Elde edilen bu gaita süspanسیونlarında kaba partiküllerin çöktürülmesi amacıyla 3000 rpm de 5 dk. santrifüj edildi ve ardından tüplerin üstünden 300µl sıvı alınarak nükleik asit izolasyonu için yeni ependorf tüplere aktarıldı.

Nükleik Asit İzolasyonu

Gaita süspanسیونundan elde edilen süpernatant örneklerinden, “GF-1 Viral Nucleic Acid Extraction” kiti (Vivantis Technologies, Malezya) kullanılarak nükleik asit izolasyonu gerçekleştirildi. Bu işlem kısaca, tüm hücrel ve protein yapıların lizisi amacıyla 50 µl proteinaz K solüsyonu, Buffer VL ve 300 µl süpernatant örneği iyice karıştırıldıktan sonra 65°C’de 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyonu tamamlanan lizat, 280 µl saf etanol ile muamele edildi ve filtreli tüplere aktararak 5.000 g de 1 dk. santrifüj yapıldı. Filtreli tüpler yıkama solüsyonuyla (500 µl) art arda 3 kere yıkandı ve her santrifüj sonunda filtreli tüpün altında biriken kısım uzaklaştırıldı. Son olarak 30 µl elüsyon solüsyonu ile santrifüj edilerek tüpün alt kısmında toplanan nükleik asit süspanسیونu elde edilerek analiz edilinceye kadar -20 C de saklandı.

Revers Transkripsiyon (RT) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Nükleik asit izolatlarından komplementer DNA'nın (cDNA) eldesi amacıyla First Strand cDNA

Synthesis kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı. Coronavirus ve rotavirusun tespiti ve sekansı için nested-primerler kullanıldı. PZR için hedef bölgeler, ürün büyüklükleri ve nested-primer listesi tablo 1 de yer almaktadır.

Tablo 1. Rotavirus ve coronavirus tespiti ve sekansı için kullanılan primerler.

Table 1. The primers for the detection and sequencing of rotavirus and coronavirus.

Hedef Gen	Primerler (F: Forward, R: Reverse)	Ürün (bp)	Referanslar
N	F: GCAATCCAGTAGTAGAGCGT R: CTTAGTGGCATCCTTGCCAA	730	Cho ve ark. 2014 (8)
N Nested	F: GCCGATCAGTCCGACCAATG R: AGAATGTCAGCCGGGGTAG	407	
VP7 Beg9-End9	F: GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG R: GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1062	Aydın ve Aktas 2017 (3)
Nested VP7F-VP7R	F: ATGTATGGTATTGAATATAACCAC R: AACTGCCACCATTTTTTCC	881	
VP4 Jenerik Con3-Con2	F: TGGCTTCGCTCATTTATAGACA R: ATTCGGACCATTTATAACC	876	
Nested VP4F-VP4R	F: TATGCTCCAGTNAATTGG R: ATGCATTCTTTCCATAATG	663	

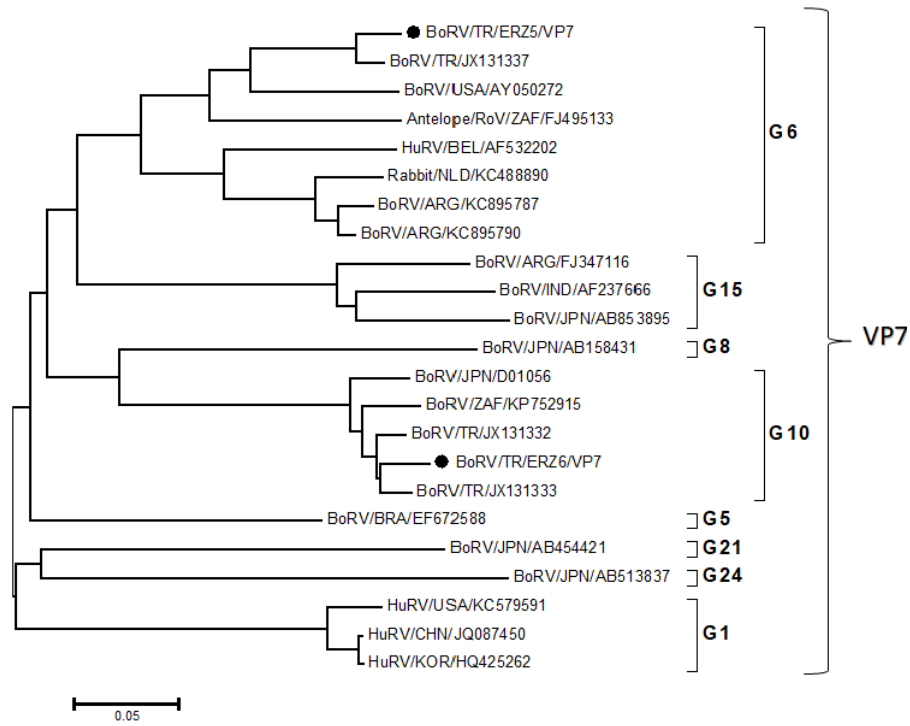
PZR Ürünlerinin Saflaştırılması ve SekansAnalizi

PZR ile elde edilen coronavirus ve rotavirus pozitif amplikonlar, "QIAquick PCR Purification" Kiti (Qiagen) ile üretici firma önerileri doğrultusunda saflaştırıldı. Bu işlem sonrasında PZR ürünlerinin Sanger sequencing metodu yoluyla (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems, USA; ABI 3110xl DNA analyzer, Applied Biosystems, USA) dizi analizi gerçekleştirildi. Her bir örneğin dizi analizi çift yönlü olarak gerçekleştirildi. Sekans sonrası elde edilen ham veriler BioEdit version 7.2.5 yazılım ve MEGA 5.1 programları kullanılarak bioinformatik analizleri gerçekleştirildi (9, 10). Bu analizler sonunda Gen Bankası (NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)) verileri referans alınarak çalışmamızdan elde edilen suşlarla filogenetik analizi gerçekleştirildi.

Bu çalışma; 2018/29 nolu karar sayısı ile Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Birim Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

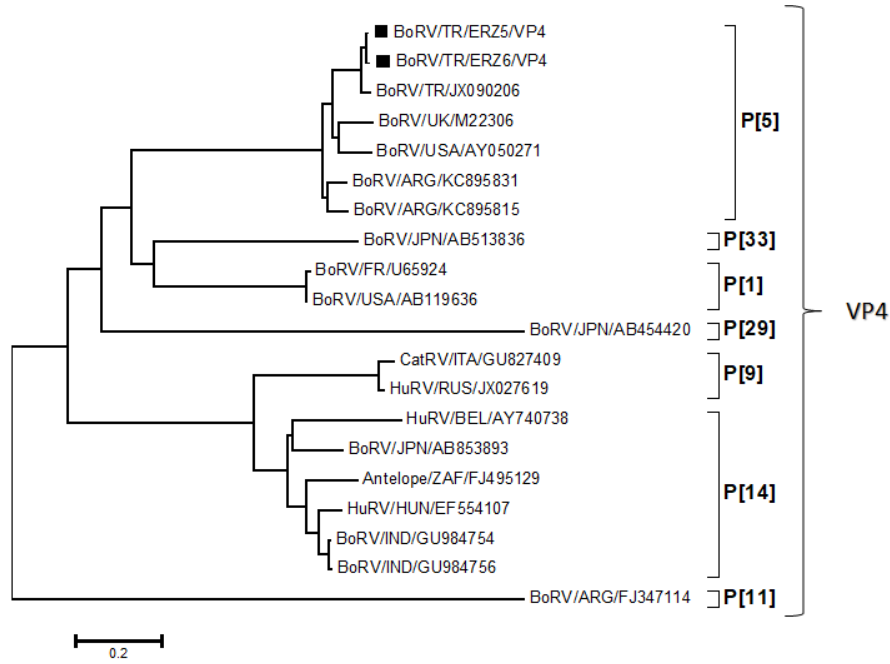
BULGULAR

Çalışmamızda, Erzurum il ve ilçelerinden toplanan gaita örneklerinde rotavirus ve coronavirus kaynaklı ishal vakaları araştırıldı. Rotavirusun dış kapsid proteinlerini kodlayan gen bölgesinin PZR testi sonucunda, iki buzağıda (%6,1, 2/33) rotavirus tespit edildi. Rotavirusun VP7'yi kodlayan gen bölgesinin sekans ve filogenetik analizinde, G6 (BoRV/TR/ERZ5) ve G10 (BoRV/TR/ERZ6) genotipleri tespit edildi (Şekil 1). Rotavirusun VP4'ü kodlayan gen bölgesinin yapılan filogenetik analizinde ise her iki örneğin P[5] genotipine ait olduğu gözlemlendi (Şekil 2). Rotavirus G ve P genotip kombinasyonuna bakıldığında ise enfeksiyondan sorumlu virusların G6P[5] ve G10P[5] genotiplerine sahip olduklarını tespit edildi.



*Siyah noktalarla belirtilen örnekler Erzurum suşlarını göstermektedir.

Şekil 1. Rotavirusun VP7 kodlayan gen bölgesinin filogenetik analizi.
Figure 1. Phylogenetic analyses of rotavirus VP7 coding region.

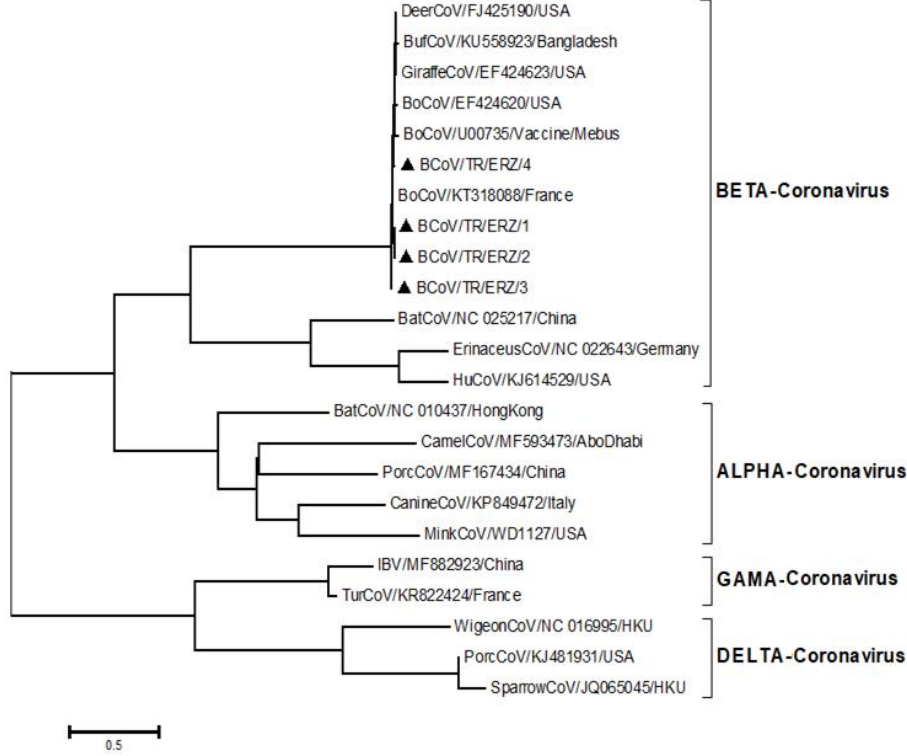


*Kare şeklinde belirtilen örnekler Erzurum suşlarını göstermektedir.

Şekil 2. Rotavirusun VP4 kodlayan gen bölgesinin filogenetik analizi.
Figure 2. Phylogenetic analyses of rotavirus VP4 coding region.

Coronavirusun nukleoproteinini kodlayan gen bölgesinin hedef alındığı PZR testi sonucunda dört farklı buzağıda (%12.1, 4/33) pozitiflik tespit edildi. Yapılan filogenetik analiz sonucunda coronavirusların Alfa-Beta-Gama ve Deltacoronavirus olmak üzere dört farklı geno-grup oluşturduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda elde edilen suşların tamamı; Fransa, Bangladeş, Amerika ve Mebus (aşı suşu) izolatları ile birlikte Betacoronavirus grubunda yer aldı (Şekil 3). Rotavirus ve coronavirusun Filogenetik analizi için kullanılan referans suşlara ait NCBI erişim numaraları şekil 1, 2 ve 3'te belirtilmiştir.



*Üçgen şekilde belirtilen örnekler Erzurum suşlarını göstermektedir.

Şekil 3. Coronavirusun N proteini kodlayan gen bölgesinin filogenetik analizi.
Figure 3. Phylogenetic analyses of coronavirus N protein coding region.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya’da yaygın olarak gözlenen viral ishal etkenleri canlılarda yaşam kalitesini düşürmekle birlikte tedavi ve korunma-kontrol harcamaları dikkate alındığında ülke ekonomilerine ciddi yük getirmektedir. Son yıllarda genetik alanda yapılan umut verici çalışmalar insan da dâhil olmak üzere birçok canlının gen haritasını çıkarmakla kalmayıp patojenlerin biyolojisinin anlaşılması, genotip dağılımlarının belirlenmesi, tedavi ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesi anlamında büyük yol kat edilmiştir. Ülkemizde hali hazırda “Bovine rotacoronavirus” aşısı kullanılmasına rağmen yeterince

başarılı olunamamasının sebebini bilinçsiz yetiştiricilik ve aşı kullanımının yaygın olmayışı olarak sayabiliriz. Çalışmamız da, buzağı isallerine sebep olan etiyolojik ajanlar arasında sık gözlenen coronavirus ve rotavirusu moleküler yöntemlerle araştırarak, elde edilen virusların genetik olarak filogenetik yerini belirlemek amaçlanmıştır. Dünya genelinde yapılan çeşitli araştırmalarda rotavirusun VP7 kodlayan gen bölgesine göre G6 ve G10 genotipi yaygın olarak, daha az oranda ise G1, G2, G3, G7, G11 ve G8 genotipleri, çok nadir de olsa G15 genotipi sığırlarda tespit edilmiştir (11-15). Çalışmamızda gözlemlediğimiz buzağı ishallerinden sorumlu

rotavirus genotipi G6 ve G10 içerisinde yer almaktadır. VP4 kodlayan gen bölgesine bakıldığında ise P[5] ve P[11]'in sık olarak, P[1]'in ise daha seyrek gözlemlendiği bildirilmiştir (13). Grup A rotavirusların sık gözlenen ikili genotip kombinasyonunun ise G6P[1], G6P[5], G10P[11] ve G8P[1] den oluştuğu bildirilmiştir (12). Çalışmamızdan elde ettiğimiz rotavirus G6P[5] ve G10P[5] genotip kombinasyonu literatür verileriyle uyum göstermektedir. Alkan ve ark. (12) tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada G6P[11] ve G10P[11] genotiplerinin baskın olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma, bizim çalışmamızda tespit edilen G6 genotipi yönüyle uyumluluk gösterse de, P genotipi yönünden çalışmamız suşların da P[5] genotipi tespit edilmiştir. Türkiye de buzağı rotavirus ishalini araştırmak üzere çoğunluğunu serolojik analizlerin oluşturduğu çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda rotavirusun ülkemizdeki seroprevalansı %8.5 ile %25 arasında olduğu bildirilmiştir (16-19). Ülkemizde hali hazırda yapılan G6, G10 ve P[1] genotiplerinin yer aldığı rotavirus aşısı bulunmaktadır. Yeni doğmuş buzağuları rotavirus enfeksiyonlarından korumak için bakım, besleme, hijyen kurallarına uyulması, dezenfeksiyon ve bunun yanı sıra buzağılarda pasif bağışıklığın sağlanması için gebe hayvanların aşılanması önem arz etmektedir (12). Ülkemiz genelinde rotavirus sürveyans çalışmasının bulunmayışı, hayvan yetiştiriciliği problemleri ve aşı etkinlik çalışmalarının bulunmaması gibi nedenlerden ötürü ülkemizde rotavirus kaynaklı buzağı ölümleri hala yadsınamayacak düzeydedir. Ülkemizde insan rotavirus G ve P genotiplerini belirleyerek temel bir veri oluşturmaya yönelik 2014 yılı itibarıyla Durmaz ve ark. (20) tarafından yürütülen bir sürveyans çalışması bulunmaktadır. Benzer bir çalışmanın ülkemiz sığır rotaviruslarına yönelik başlatılması hastalıkla kontrol ve mücadele açısından önem taşıyacak bir adım olabilir.

Sığırlarda coronavirus kaynaklı ishalinde araştırıldığı çalışmamızda dört farklı hayvanda coronavirusa rastlanmıştır. Filogenetik analiz yoluyla, Gen Bank'tan elde edilen referans suşlar ve

çalışmamızdan elde edilen izolatlar değerlendirilmiştir. Filogenetik ağaçta dört farklı gruba ayrılan coronaviruslar içerisinde Erzurum suşları ile birlikte aşı suşu olan "Mebus" Beta-coronavirus grubunda yer almıştır. Beta-coronavirusun kendi içerisinde iki alt gruba ayrıldığı filogeni'de, insan coronavirusu (MERS-CoV/ Middle East respiratory syndrome coronavirus, erişim no: KJ614529) ve yarasa coronavirusu (erişim no: NC_025217) bir alt grup oluştururken, ruminant suşlarının diğer bir alt grupta toplandığı gözlenmiştir. Özellikle son yıllarda insanlarda korku salan MERS ve SARS coronavirus enfeksiyonlarının hayvanlardan insana bulaştığı gerçeği bu virusun türler arası geçişine dikkatleri çekmiştir (21). Filogenetik analizde de görüldüğü üzere sığır, geyik, zürafa, bufalo ve kirpi coronavirusları, insan coronavirusları ile birlikte Beta-coronavirus grubunda toplanmıştır. Bu durum insanları enfekte eden coronavirusla genetik yakınlığını ifade etmektedir.

Enterik ve solunum formu olmak üzere iki şekilde ortaya çıkan coronavirus enfeksiyonu fekal/oral ve hava yolu ile hayvanlar arasında saçılmaktadır. Kontamine gıda ve gereçler en önemli risk kaynaklarıdır (5,22). Ülkemizde coronavirus ishalinin oldukça yaygın olduğu bilinmekle birlikte antikör pozitifliğinin %90'ın üzerinde olduğu bildirilmiştir (22). Alkan tarafından ishali buzağılarda yapılan bir çalışmada %61.4 oranında rota/coronavirus pozitifliği tespit edilmiştir (23). Hasöksüz ve ark. (24) tarafından yapılan bir çalışmada ise yeni doğan buzağılarda enterik coronavirus oranı %37.1 olarak bulunmuştur. Ülkemizde 11 ilde coronavirusun S gen bölgesinin moleküler düzeyde irdelendiği bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada coronavirusun Türkiye'de yaygın olarak gözlemlendiği ve buzağı isallerinin etiyolojik ajanı olduğu vurgulanmıştır (25). Daha önce Erzurum'da coronavirusun solunum sistemi enfeksiyonlarındaki yeri araştırılmış olup, enterik coronavirus hakkında bilgi verilmemiştir (5). Bu çalışma ile Erzurum'da ilk kez enterik coronavirus araştırılmış olup virusun N gen bölgesi moleküler düzeyde incelenmiştir.

Rotavirus ve coronavirus kaynaklı buzağı ishallerinde saha suşlarının belirlenmesi ve aşı suşları ile genetik ilişkisinin değerlendirilmesi, enfeksiyonun kontrolü ve eradikasyonu açısından büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak; Erzurum'da buzağı isallerinin etiyolojik ajanları olan coronavirusun N gen bölgesi, rotavirusun ise VP4 ve VP7 gen bölgelerine ait genotipik veriler literatüre kazandırılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cho YI., Yoon KJ., 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci*, 15, 1-17.
2. Singh DD., Kumar M., Choudhary PK., Singh HN., 2009. Neonatal calf mortality - an overview. *Intas Polivet*, 10, 165-169.
3. Aydın H., Aktas O., 2017. Rotavirus genotypes in children with gastroenteritis in Erzurum: first detection of G12P[6] and G12P[8] genotypes in Turkey. *Gastroenterology Rev*, 12, 122-127.
4. Yandle Z., Coughlan S., Drew RJ., O'Flaherty N., O'Gorman J., De Gascun C., 2017. Circulating rotavirus genotypes in the Irish paediatric population prior to the introduction of the vaccination programme. *Ir J Med Sci*, 186, 1003-1007.
5. Timurkan MO., Aydın HA., Belen S., 2015. Erzurum bölgesinde sığırlarda respiratorik coronavirus enfeksiyonunun RT-PCR ile tespiti ve moleküler karakterizasyonu. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 10, 186-192.
6. Park SJ., Jeong C., Yoon SS., Choy HE., Saif LJ., Park SH., Kim YJ., Jeong JH., Park SI., Kim HH., Lee BJ., Cho HS., Kim SK., Kang MI., Cho KO., 2006. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *J Clin Microbiol*, 44, 3178-3188.
7. Kin N., Miszczak F., Diancourt L., Caro V., Moutou F., Vabret A., Ar Gouilh M., 2016. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. *Infect Genet Evol*, 40, 186-91.
8. 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 Virol*, 146, 2401-2419.
9. Hall T., 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Bioscience*, 2, 60-61.
10. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-2729.
11. Masuda T., Nagai M., Yamasato H., Tsuchiaka S., Okazaki S., Katayama Y., Oba M., Nishiura N., Sassa Y., Omatsu T., Furuya T., Koyama S., Shirai J., Taniguchi K., Fujii Y., Todaka R., Katayama K., Mizutani T., 2014. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol*, 171, 66-73.
12. Alkan F., Ozkul A., Oguzoglu TC., Timurkan MO., Caliskan E., Martella V., Burgu I., 2010. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997–2008. *Vet Microbiol*, 141, 231-237.
13. Pourasgari F., Kaplon J., Karimi-Naghlani S., Freymy C., Otarod V., Ambert-Balay K., Mirjalili A., Pothier P., 2016. The molecular epidemiology of bovine rotaviruses circulating in Iran: a two-year study. *Arch Virol*, 161, 3483-3494.
14. Ennima I., Sebbar G., Harif B., Amzazi S., Loutfi C., Touil N., 2016. Isolation and identification of group A rotaviruses among neonatal diarrheic calves, Morocco. *BMC Res Notes*, 9, 261.
15. Hassine-Zaafraane M., Ben Salem I., Sdiri-Loulizi K., Kaplon J., Bouslama L., Aouni Z., Sakly N., Pothier P., Aouni M., Ambert-Balay K., 2014. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A

- bovine rotaviruses from Tunisian calves with diarrhoea. *J Appl Microbiol*, 116, 1387-1395.
16. Duman R., Aycan AE., 2010. Prevalence of rotavirus infections in calves with diarrhea in Konya region. *J Anim Vet Advances*, 9, 136-138.
17. Gumusova SO., Yazıcı Z., Albayrak H., Meral Y., 2007. Rotavirus and coronavirus prevalence in healthy calves and calves with diarrhoea. *Medycyna wet*, 63, 62-64.
18. Içen H., Arserim NA., IŞIK N., Özkan C., Kaya A., 2013. Prevalence of four enteropathogens with immunochromatographic rapid test in the feces of diarrheic calves in east and southeast of Turkey. *Pak Vet J*, 33, 496-499.
19. Yilmaz V., 2016. Investigation of rotavirus infection in calves with diarrhea in northeast Turkey. *Anim and Vet Sci*, 4, 1-4.
20. Durmaz R., Kalaycioglu AT., Acar S., Bakkaloglu Z., Karagoz A., Korukluoglu G., Ertek M., Torunoglu MA., 2014. Prevalence of rotavirus genotypes in children younger than 5 years of age before the introduction of a universal rotavirus vaccination program: Report of rotavirus surveillance in Turkey. *PLoS One*, 9, e113674.
21. Lu G., Wang Q., Gao GF., 2015. Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends Microbiol*, 23, 468-478.
22. Yavru S., Yapici O., Kale M., Sahinduran S., Pehlivanoglu F., Albay MK., Avci O., 2016. Bovine coronavirus (BoCV) infection in calves with diarrhoea and their dams. *Acta Sci Vet*, 44, 1405.
23. Alkan F., 1998. Buzağı ishallerinde rotavirus ve corona virusların rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 45, 29-37.
24. Hasoksuz M., Kayar A., Dodurka T., Ilgaz A., 2005. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in northwestern Turkey. *Acta Vet Hung*, 53, 137-146.
25. 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. *Transbound Emerg Dis*, 58, 179-185.