

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ (VETERİNER) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**BUZAĞILARDA *NOROVİRUS* ENFEKSİYONUNUN VİROLOJİK
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Tevhide AYDIN DÖNMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nural EROL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-22039 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilim Dalı (Veteriner) Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Tevhide AYDIN DÖNMEZ tarafından hazırlanan “Buzağılarda Norovirus Enfeksiyonunun Virolojik Olarak Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04.08.2023

Üye (T.D.) : Doç.Dr. Nural EROL Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇABALAR Harran Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Sevin KIRDAR Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım, hoşgörüsünü esirgemeyen, saygıdeğer, çok değerli danışmanım Doç. Dr. Nural EROL'a, bana her konuda yardımcı olan ve desteğini eksik etmeyen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Tolga TAN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sevin KIRDAR'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Lisans ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca bana yol gösterip, yardımlarını eksik etmeyen Doç. Dr. B. Taylan KOÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için sevgili eşim Fatih DÖNMEZ'e, sevgili annem Emine AYDIN ve sevgili babam Mustafa Kemal AYDIN'a, tezimin laboratuvar çalışmaları için gerekli örnekleri toplamamda yardımcı olan Metin BOZAN'a, sevgili mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Etiyoloji.....	5
2.2.1. Sınıflandırma.....	5
2.2.2. Morfolojii	9
2.2.3. Genom Yapısı.....	11
2.2.4. Viral Proteinler.....	12
2.2.5. Replikasyon.....	15
2.2.6. Virus Stabilitesi.....	17
2.3. Epizootiyoloji.....	18
2.3.1. Dünya’da Durum.....	18
2.3.2. Türkiye’de Durum.....	21
2.3.3. Konakçı Spektrumu ve Zoonotik Özellik	23
2.4. İmmunite	25

2.5. Patogenez, Patoloji ve Klinik.....	25
2.6. Tanı	28
2.7. Bovine Enteric Calicivirüslerde Tedavi.....	31
2.8. Korunma/Kontrol	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Gereç	34
3.1.1. Dışkı Örnekleri.....	34
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Dışkı Örneklerinin Hazırlanması	35
3.2.2. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu	35
3.2.3. Viral RNA'nın Reverse Transkripsiyonu.....	36
3.2.4. Nested PCR.....	37
3.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.....	38
3.2.6. Sekans Analizi.....	39
3.2.7. Sekans sonuçlarının Filogenetik Analizi.....	39
3.2.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	39
4. BULGULAR.....	41
4.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntüsü.....	41
4.2. İllere Göre Pozitiflik Oranları	42
4.3. Yaşlara Göre Pozitiflik Oranları	43
4.4. Irklara Göre Pozitiflik Oranları.....	44
4.5. Cinsiyete Göre Pozitiflik Oranları	44
4.6. Dizi Analizi	45
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	57
EKLER.....	68

EK 1 HADYEK ETİK KARAR	69
EK 2 Kullanılan Malzemeler	70
BİLİMSEL ETİK BEYANI	72
ÖZ GEÇMİŞ	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3CLPro	: 3C-like protease
A	: Adenin
aa	: Aminoasit
BCoV	: Bovine coronavirus
BEC	: Bovine Enteric Caliciviruslar
BNoV	: Bovine Norovirus
Bp	: Base pair
BRVA	: Bovine rotavirus group A
BVD	: Bovine Viral Diarrhea
C	: Sitozin
cDNA	: Tamamlayıcı DNA, Komplementer DNA
Cscl	: Sezyum Klorür
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: Double Stranded RNA (Çift iplikçikli RNA)
E. coli	: Escherichia coli
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EM	: Elektron Mikroskop
FCV	: Feline Calicivirus
FDA	: Food and Drug Administration
G	: Genotip
G	: Guanin
HBGA	: Histo Blood Group Antigens (Histo-Kan Grubu Antijenleri)
HNoV	: Human norovirus (insan norovirusu)

ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG	: İmmunglobulin G
IV	: İntra venöz
İM	: İntramuskucular
JV	: Jena virus
Kb	: Kilo baz
kDa	: Kilodalton
MEGA6	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MNV	: Murine Norovirus
MPa	: Megapascal
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
Na	: Sodyum
NB1	: Newbury Agent 1
NB2	: Newbury Agent 2
nm	: Nanometre
NoV	: Norovirus
NSAID	: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Steroidal olmayan Antienflamatuar İlaçlar)
nt	: Nükleotit
ORF	: Open Reading Frame (Açık Okuma Bölgesi)
P	: Protruding
PBS	: Phosphate Bufferes Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

pH	: Power of Hydrogen
ppm	: parts per million
RdRp	: RNA-dependent RNA polymerase
RHDV	: Rabbit Hemorrhagic Disease Virus
RIA	: Radioimmunoassay
RNA	: Ribonükleik asit
rNB2	: Rekombinant Newbury Agent 2
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RT-qPCR	: Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (Ters transkripsiyon- Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu)
S	: Shell
ssRNA	: Single Stranded (tek iplikçikli) RNA
T	: Timin
TAE	: Tris-Asetik Asit-Ethylen Diamin Tetra Acetic Asit
U	: Ünite
UTR	: Untranslated Region (Kodlanmayan Bölge)
UV	: Ultraviyole
VLP	: Virus Like Particle (Virus benzeri partikül)
VP1	: Virion proteini 1
VPg	: Viral Protein Genomu
Xray	: X ışını
α	: Alfa
β	: Beta
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsan Norovirusunun moleküler yapısı	10
Şekil 2. <i>Caliciviridae</i> ailesinin şematik genom organizasyonu	14
Şekil 3. MNV replikasyon döngüsü	17
Şekil 4. Türler arası bulaş tablosu	24
Şekil 5. Aksaray ve Aydın ilinde saptanan Bovine Norovirusların Neighbor-Joining unrooted filogenetik ağacı. “■” Aksaray örnekleri, “●” Aydın örnekleri	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Koyun dışkı örneğinde bulunan norovirus (GIII.3) partiküllerinin elektron mikroskop görüntüsü	8
Resim 2. Calicivirusların kriyo-elektron mikroskopisinde kapsid yapısı	9
Resim 3. BNoV GIII.2'nin Solid faz immulelektron mikroskopik görüntüsü.....	10
Resim 4. P bölgesinin 3 boyutlu modellemesi	15
Resim 5. JV ile enfekte buzağılarda ince bağırsak morfolojisi. (A-C) enfeksiyondan 18-21 saat sonrası. (B-D) enfeksiyondan 4 gün sonrası.....	28
Resim 6. Aksaray ili Norovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıkta görüntüsü.	41
Resim 7. Aydın Norovirus örnekleri-Aksaray Nebovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıkta görüntüsü (örnek no: 42-45 nebovirus pozitif).	42
Resim 8. Aydın Norovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıkta görüntüsü.....	42
Resim 9. Aydın Norovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıkta görüntüsü.....	42

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. BEC sınıflandırması	5
Tablo 2. Calicivirus taksonomik özellikleri.....	5
Tablo 3. İshalli buzağılarda dehidrasyon durumunun değerlendirilmesi.....	32
Tablo 4. cDNA sentezi için uygulanan sıcaklık ve zaman	36
Tablo 5. PCR Testinde Kullanılan Primerler	37
Tablo 6. PCR protokolü	38
Tablo 7. Aydın ve Aksaray bölgesindeki BNoV pozitiflik oranları.	43
Tablo 8. Aydın ve Aksaray bölgesindeki nebovirus pozitiflik oranları.....	43
Tablo 9. Aksaray ve Aydın illerindeki tüm sığırlarda yaşlara göre BNoV pozitiflik oranları.	43
Tablo 10. Aydın ilindeki sığırlarda yaşlara göre BNoV pozitiflik oranları.....	44
Tablo 11. Aksaray ve Aydın ili BNoV pozitif ırklara göre oranları.....	44
Tablo 12. Aksaray ve Aydın ili BNoV pozitif cinsiyete göre oranları	45

ÖZET

BUZAĞILARDA NOROVİRUS ENFEKSİYONUNUN VİROLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Aydın Dönmez T. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Viroloji (Veteriner) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Bovine Norovirus (BNoV) ve Nebovirus (BNeV) birlikte Bovine Enteric Calicivirus olarak isimlendirilir. Bovine Norovirus buzağılarda duodenum ve jejunum villöz epitel hücrelerini etkileyerek hemorajik olmayan enterit, diyare, iştahsızlık, anoreksi ve malabsorpsiyon gibi semptomlara sebep olur. Fekal-oral yolla bulaşan bu viruslar genellikle mix enfeksiyon şeklinde seyreder. Buzağı ishalleri gelişim geriliği, bu açığı kapatmak için kullanılan tamamlayıcı yemler, ölüm, ilerleyen dönemde düşük süt verimi gibi ciddi ekonomik kayıplara neden olur. Bu çalışmada, Aksaray ve Aydın illerinde bulunan ve ishal vakaları görülen sığırlarda bovine norovirus (BNoV) ve ayrıca nebovirus enfeksiyonlarının moleküler virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Buna ek olarak hastalığın görülmesinde yaş, cinsiyet, ırk faktörlerinin etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Aksaray ve Aydın illerinde sığır yetiştiriciliği yapan küçük aile işletmeleri ve entansif işletmelerdeki ishal klinik belirtisi olan buzağılardan ve 1 yaş üstü sığırlardan toplam 103 adet dışkı örneği alındı. Aksaray ilindeki buzağılardan 71 adet, Aydın ilinden ise ishal vakaları gözlenen bir organize süt sığırcılığı işletmesinden bir yaş altı ve bir yaş üstü sığırlardan 32 örnek alındı. Alınan örnekler virusların RdRp bölgelerini hedef alan nested RT-PCR yöntemi ile test edildi. Pozitiflik saptanan örneklerden seçilen 8 adet örneğin PCR ürününden Sanger yöntemi ile kısmi RdRp bölgesinin dizi analizleri gerçekleştirildi.

Bulgular: Nested RT-PCR yöntemiyle test edilen toplam 103 örneğin 26 tanesi (%26,2) BNoV yönünden, 2 tanesi ise nebovirus yönünden pozitif bulundu. Aksaray ilinden toplanan 71 örnekten 3 adedi (%4,3) BNoV yönünden, 2 adedi (%2,9) BNeV yönünden pozitif tespit edildi. Aydın ilindeki ishal vakaları gözlenen bir organize süt sığırcılığı işletmesinden alınan 32 örneğin 23 adedinin (%71,8) BNoV yönünden pozitif olduğu saptandı. Aksaray ilinde tespit edilen 3 BNoV ve 2 adet nebovirus pozitif örneğin Sanger dizileme analizi sonucu BNoV GIII-

genotip I ve Nebraska suşu olduğu belirlendi. Aydın ilinde ise BNoV GIII genotip 2 olarak belirlendi. İstatistik analizleri ile yaş, cinsiyet, ırk yönünden enfeksiyon oranları incelendiğinde 6 aydan büyük hayvanlarda ve dişilerde BNoV enfeksiyon oranının arttığı görülürken, ırklar arasında anlamlı bir farklılık saptandı.

Sonuç: Aksaray ve Aydın illerinde sırasıyla BNoV'nin GIII-1 ve GIII-2 tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmada buzağuların bir enfeksiyonu olarak kabul edilen BNoV enfeksiyonunun, ırklar arasında duyarlılık farklarının olabileceği, dişilerde enfeksiyonun daha fazla görülebileceği ve virus, konakçı ve çevre faktörlerine bağlı olarak her yaştaki hayvanlarda rastlanabileceği, gözlenmiştir. Çalışma ve literatür verileri ışığında BNoV enfeksiyonlarına her geçen gün daha sıklıkla karşılaşıldığı ve büyükbaş yetiştiriciliği için önemli bir potansiyel tehlike olabileceği kanısına varılmıştır. İshal vakalarında BEC enfeksiyonlarının göz ardı edilmemesi gerektiği ve bu enfeksiyonlara karşı önlemlerin alınması ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu virusların diğer enfeksiyöz ajanlarla birlikte bulunduğu durumlarda daha kolay yayılma ve daha şiddetli seyretme ihtimali dolayısıyla çiftliklerde bakım ve hijyen şartlarına dikkat edilmesi gerektiği önerilebilir.

Anahtar kelimeler: Buzağı, ishal, Nebovirus, Norovirus, RT-PCR.

SUMMARY

VIROLOGICAL INVESTIGATION OF NOROVIRUS INFECTION IN CALVES

Aydın Dönmez T. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Virology(Veterinary) Program, Master Thesis, Aydın, 2023.

Objective: Bovine Norovirus (BNoV) and Nebovirus (BNeV) collectively constitute the Bovine Enteric Calicivirus. Bovine Norovirus affects the villous epithelial cells of the duodenum and jejunum in calves, giving rise to symptoms such as non-hemorrhagic enteritis, diarrhea, anorexia, reduced appetite, and malabsorption. These viral agents, primarily transmitted via the fecal-oral route, tend to manifest as mixed infections. The development of calf diarrhea leads to growth retardation, necessitating supplementary feeding to address nutritional deficits, and culminating in outcomes such as mortality and subsequent diminished milk yield, thereby engendering substantial economic losses. In the present study, a molecular virological investigation was undertaken with the aim of elucidating the prevalence of bovine norovirus (BNoV) and nebovirus infections in cattle exhibiting diarrheal symptoms, within the geographical locales of Aksaray and Aydın provinces. Furthermore, the influence of demographic variables including age, gender, and breed on the incidence of the disease was scrutinized.

Materials and Methods: A total of 103 fecal samples were collected from cattle exhibiting clinical symptoms of diarrhea in both small family-operated farms and intensive enterprises in the provinces of Aksaray and Aydın. Among these, 71 samples were sourced from calves in Aksaray, while 32 samples were obtained from calves and adult cattle (both under and over one year of age) in an organized dairy farm in Aydın where cases of diarrhea were observed. The collected samples were subjected to molecular analysis using the nested Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (nested RT-PCR) method, targeting the RdRp regions of the viruses. Among the samples that exhibited positivity, 8 selected samples underwent partial RdRp region sequence analysis through the Sanger sequencing method.

Results: A total of 103 samples subjected to the nested RT-PCR method revealed that 26 samples (26.2%) were positive for Bovine Norovirus (BNoV), while 2 samples tested positive

for Nebovirus. Among the 71 samples collected from Aksaray province, 3 samples (4.3%) were identified as positive for BNoV, and 2 samples (2.9%) were positive for Nebovirus. From the 32 samples obtained from the organized dairy cattle farm in Aydın province, where cases of diarrhea were observed, it was determined that 23 samples (71.8%) were positive for BNoV. Through Sanger sequencing analysis, the 3 BNoV-positive and 2 Nebovirus-positive samples from Aksaray province were identified as BNoV GIII-genotype I and Nebraska strain, respectively. In Aydın province, BNoV was identified as GIII genotype 2. Upon statistical analysis of factors such as age, gender, and breed, it was observed that the prevalence of BNoV infection increased in animals older than 6 months and in female individuals, while significant differences were noted among different breeds.

Conclusion: In the provinces of Aksaray and Aydın, Bovine Norovirus (BNoV) of genotypes GIII-1 and GIII-2, respectively, were detected. Moreover, the study suggested that BNoV infection, considered as a calf-associated infection, might exhibit sensitivity variations across different breeds, potentially presenting a higher prevalence among female individuals. The virus was found to be capable of affecting animals of all ages, contingent upon host, virus, and environmental factors. In light of both the study's findings and existing literature, the escalating frequency of BNoV infections has underscored the potential threat it poses to cattle husbandry, emphasizing the necessity for comprehensive measures. The study emphasizes the need to acknowledge Bovine Enteric Calicivirus (BEC) infections in cases of diarrhea and underscores the importance of instituting preventative measures and developing strategies for combating these infections, particularly considering their propensity to coexist with other infectious agents, thereby potentially leading to heightened transmission and more severe outcomes. Consequently, strict adherence to farm hygiene and care practices is advisable.**Key words:** Calf, diarrhea, Norovirus, Nebovirus, RT-PCR.

1. GİRİŞ

Sığır yetiştiriciliğinde, gastrointestinal hastalıklar özellikle buzağı ishalleri bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu ekonomik kayıpların altında yatan başlıca sebepler özellikle yaşamlarının erken dönemlerinde olan buzağılarda meydana gelen ölümler, tedavi masrafları, gelişme geriliğinin görülmesidir. Bu durum hayvanın değerinden daha düşük fiyata satılmasına sebep olur. Buna ek olarak ilerleyen dönemlerde buzağuların gelişimini tamamlaması için harcanan yem miktarı daha uzun vadede ise süt üretiminin azalmasına kadar giden olumsuz bir tablo görülür. Buzağılarda ishal sebepleri olan enfeksiyöz etkenler viral, bakteriyel, protozoon kaynaklı olabilir. Yetersiz kolostrum alımı, ahırların havalandırması, hijyeni, bakım ve barındırma, stres faktörleri gibi durumlar hayvanların hastalanmasını kolaylaştırmaktadır. *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Parvovirus*, ishal olgularında en sık rastlanan ajanlardır. Bu ajanlar hayvanda tek başına veya genellikle mix enfeksiyon şeklinde seyrederek (Şahal ve diğerleri, 2018).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Norovirus (genogrup III) ve Nebovirus olmak üzere iki cins içerisinde yer alan ve Bovine Enteric Calicivirus (BEC) olarak isimlendirilen virüsler da yeni doğan buzağılarda önemli ishal etkenleri olarak kabul edilmeye başlanmıştır (Hacıoğlu ve Alkan 2018). BEC'ler, sığırlarda genellikle mide-bağırsak sistemini etkileyen ve ishal, villus atrofi gibi sindirim sistemi sorunlarına yol açabilen ribonükleik asit (RNA) genomuna sahip virüslerdir. Noroviruslar, insanlarda da gastroenterit nedeni olarak dünya çapında sık görülen etkenlerdir. Ayrıca gıda kaynaklı hastalıkların önemli bir nedenidir. İnsan ve sığırların yanı sıra, kemirgenler, domuz, kedi, köpek, koyun gibi çeşitli memeli konakçılarda da enfeksiyon oluştururlar. Buna ek olarak yarasa, denizaslanları ve liman yunuslarında yeni sınıflandırılmamış noroviruslar tanımlanmıştır (Chhabra ve diğerleri, 2019).

Nebovirusların da buzağılarda bovine noroviruslar (BNoV) gibi tek başına veya diğer enterik patojenlerle birlikte özellikle gastroenterit ve ishal gibi sindirim sorunlarına neden olduğu bilinmektedir (Hacıoğlu ve Alkan 2018).

Türkiye'de BNoV ve neboviruslar üzerine moleküler virolojik ve epizootiyolojik araştırmalar oldukça sınırlıdır (Dik ve diğerleri, 2023; Hacıoğlu ve Alkan, 2019; Turan ve diğerleri, 2018; Yılmaz ve diğerleri, 2011). Bu çalışmada Aydın ve Aksaray illerinde büyük

baş hayvan yetiştiriciliği yapan büyük çiftlikler ve küçük aile işletmelerinde BNoV enfeksiyonunun moleküler virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, BNoV enfeksiyonunun görülmesi üzerine cinsiyet, ırk, yaş faktörünün etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Buna ek olarak aynı hayvanlarda nebovirus enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İlk kez 1929 yılında, Danimarka ve Amerika'daki insanlarda bakteriyel olmayan gastroenterit salgınından bahseden J. Zahorsky, bu salgını kış kusma hastalığı olarak tanımlamıştır. Kasım ve mart aylarında yaygınlık gösteren bu hastalık ishalin yanı sıra kusma ve bulantı ile karakterize olup bireyler arasında bulaşıcılık göstermiştir (Adler ve Zickl, 1969; Anonim, 1965). 1935 yılında Danimarka'da bulantı ve kusma şeklinde salgınlar tekrar görülmüştür (Bradley, 1943). Rischel tarafından 1935 yılında ilk defa epidemik bulantı adı altında raporlanmıştır (Miller ve Raven, 1936).

1936 yılında Thanet-Londra-İngiltere'de ani bulantı ve kusma ile başlayan 3-4 saat içinde ishalin eşlik ettiği bazı olgularda ateş, sersemlik, baş ağrısı, abdominal ağrı, vertigo gibi belirtilerin görüldüğü klinik belirtiler özellikle okul çağındaki kızlarda raporlanmıştır (Anonim, 1965).

1942 yılında İngiltere'de okul çağındaki öğrencilerde tekrar kusma ve ishal vakaları patlak vermiştir. Bu döneme kadar yaşanan bu salgınlarda gıda zehirlenmesi veya dizanteri gibi hastalıklar teşhiste kafa karışıklığına sebep olmuştur. Fakat yapılan araştırmalar bu durumun gıda kaynaklı bir zehirlenme ihtimalini ortadan kaldırmıştır. (Bradley, 1943)

1943-1944 yılında Philadelphia ve çevresinde meydana gelen geniş çaplı bir salgında semptom gösteren kişilerden alınan faringeal örneklerde herhangi bir bakteriye ve parazite rastlanamamıştır. Bu durum akıllara ilk olarak hastalığın virusla ilişkili olabileceğini ve virusların bağırsaklara da yerleşebileceğini getirmiştir. Bu yüzden hastalığa viral dizanteri (Gippy tummy) denmiştir (Reimann ve diğerleri, 1945).

1968 yılında Norwalk Ohio'da bir ilköğretim okulunda kış kusma hastalığına benzer klinik özelliklere sahip gastrointestinal rahatsızlıklar tekrar meydana gelmiştir (Adler ve Zickl, 1969). Hastalığın etiyolojisinin belirlenmesi 1972 yılına kadar mümkün olmamıştır (Kapikian ve diğerleri, 1972).

Norwalk'ta meydana gelen bu salgın norovirusnun ilk temellerinin atıldığı ve bu zamana kadar enfeksiyöz ajanın en iyi karakterize edildiği salgın olmuştur (Blacklow ve diğerleri, 1972). İlk kez 1972 yılında virus immun elektron mikroskopu ile görüntülenmiştir (Kapikian, 2000). Yapılan bu görüntüleme tekniği ile Ohio'daki salgının altında yatan sebebin norovirus benzeri bir parçacık olduğu kesinleşmiştir (Kapikian ve diğerleri, 1972). Böylece bu salgında tespit edilen genotip insan noroviruslarının protitipi olmuştur (Kapikian, 2000). Virusun elektron mikroskopu görüntüsü picornavirus veya parvoviruslara benzetilmiştir. Ardından insan dışkı materyalinden saflaştırılan bu parçacıklar caliciviruslar ile ilişkilendirilmiştir. Norovirusların hücre kültüründe üretilmemesi virionun ayrıntılı karakterizasyonunu engellemiştir (Green ve diğerleri, 2000).

1990 yılında yapılan bir çalışma ile norovirus komplementer DNA (cDNA)'sı başarıyla üretilmiştir. Üretilen cDNA norovirusların diğer caliciviruslar ile sekans ilişkisi gösterilerek daha iyi tanınmasını sağlamıştır (Jiang ve diğerleri, 1990).

Sığırlarda ise norovirus ilk kez 1978 yılında İngiltere'de ishalleri bir buzağıda tespit edilmiş olup Newbury agent 2 suşu (NB2) olarak isimlendirilmiştir (Woode ve Bridger, 1978). Ardından Almanya'da 1980 yılında ise ishalleri yenidoğan buzağılardan alınan dışkılarda elektron mikroskopu ile Jena suşu (JV) izole edilmiştir (Liu ve diğerleri, 1999). 1999 yılında ise moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Tespit edilen iki genotip günümüz suşlarının protipi olarak değerlendirilir (Hacıoğlu ve Alkan 2018). Böylece bovine noroviruslar iki farklı suş şeklinde sınıflandırılmıştır (Di Felice ve diğerleri, 2016) Şu ana dek açıklanan tüm BNoV suşları ise genogrup III (GIII) içinde bulunur (Ferragut ve diğerleri, 2016).

Neboviruslar ise Newbury agent I suşu (NB1) 1978 yılında NB2 ile birlikte İngiltere'de ishalleri bir buzağıda saptanmıştır (Woode ve Bridger, 1978). 1984 yılında karakterize edilmiştir (Dastjerdi ve diğerleri, 1999). 1980 yılında Amerika'da ise nebovirusun Nebraska suşu tespit edilmiştir (Smiley ve diğerleri, 2002). Neboviruslar, Caliciviridae ailesinin cinsi olarak ilk defa 2010 yılında tanımlanmıştır (Carstens, 2010).

2.2. Etiyoloji

2.2.1. Sınıflandırma

Sığırlarda gastroenterik enfeksiyonlara yol açan bovine noroviruslar, neboviruslar ile birlikte ‘Bovine Enteric Caliciviruslar (BEC)’ olarak tanımlanmaktadır. BEC’ler *Picornavirales* takımında *Caliciviridae* ailesinin içerisinde sınıflandırılmaktadır. Uluslararası virus taksonomi komitesinin 2019’da yayınladığı raporuna göre; *Caliciviridae* ailesi *Bavovirus*, *Lagovirus*, *Minovirus*, *Nacovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Recovirus*, *Salovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus*, *Vesivirus* genuslarından oluşmaktadır. Bavovirus ve Nacovirus kanatlılarda, Minovirus ve Salovirus balıklarda, diğerleri ise memelilerde hastalık oluşturmaktadır. Ayrıca, kazlarda, sarı yüzgeçli çipurada, büyük yeşil yılanda, arktik abanozlarda, kurbağalarda ve çeşitli Avustralya kuşlarında sınıflandırılmamış caliciviruslar tespit edilmiştir (Vinjé ve diğerleri, 2019). (Tablo 1, Tablo 2).

Tablo 1. BEC sınıflandırması (ICTV,2019 .

Sınıflandırma	
Diyar	<i>Riboviria</i>
Krallık	<i>Ortornavirae</i>
Şube	<i>Pisuviricota</i>
Sınıf	<i>Pisoniviricetes</i>
Dizin	<i>Picornavirales</i>
Aile	<i>Caliciviridae</i>
Cins	<i>Norovirus</i>
Cins	<i>Nebovirus</i>

Tablo 2. Calicivirus taksonomik özellikleri (Vinjé ve diğerleri, 2019)

Taksonomik Özellikler	
Genom	Pozitif polariteli, lineer, tek iplikçikli, +ssRNA
Kapsid	İkozahedral simetri
Zarf	Yok

Çok önceleri yapılan erken çalışmalarda; noroviruslar, parvoviruslar ya da caliciviruslar ile yakın ilişkili olduğu hipotezi ileri sürülmüştür. Ancak virusun morfolojisi ve genomik yapısı

incelendiğinde caliciviruslar ile norovirusların arasında parvoviruslara nazaran daha fazla benzerliğin olduğu saptanmıştır (Jiang ve diğerleri, 1993). Caliciviruslarda birden fazla ORF bulunması, en az bir tane subgenomik RNA oluşturması ve yapısal olmayan proteinleri 5' ucundan kodlamaya başlarken, yapısal proteinleri 3' ucundan kodlamaya başlaması calicivirusları kendi takımından yani *Picornavirales* takımından ayıran özelliklerdir (Jiang ve diğerleri, 1993). Calicivirusların genomik yapıları aşağıda açıklanmıştır.

BNoV filogenetik olarak kapsid proteini olan viral proteinin (VP1) aminoasit dizilimine ya da RNA bağımlı RNA polimeraz (RNA depended RNA polymerase; RdRp) kodlayan gen bölgesinin nükleotid dizilimine bağlı olarak farklı genogrup ve genotiplere ayrılmaktadır. Bazı araştırmacı grupları ise genotipleri sınıflandırmak için C bölgesi olarak adlandırılan VP1'in 5' bölgesinin belirli bir nükleotid bölgesinin dizilimini kullanmıştır (Chhabra ve diğerleri, 2019). Yeni bir genotip sınıfının oluşturulabilmesi için VP1 aminoasit diziliminin kendisine en yakın genotipten en az %15 dizilim farkı olması gerekmektedir (Kroneman ve diğerleri, 2013). Ancak, VP1 amino asit dizilimine dayalı genotipleme, rekombinasyonun en sık olarak ORF1-ORF2 bölgesine yakın bölgelerde meydana geldiği göz önüne alındığında, doğal olarak oluşan rekombinant norovirüsleri tanımlamak için yeterli olmayabilir. Bu nedenle yalnızca kapsit bölgesinin dizilenmesi, rekombinant norovirüslerin gözden kaçmasına yol açabilir (Bull ve diğerleri, 2007; Villabrana ve diğerleri, 2019). Araştırmacıların birçoğu en fazla sayıda suş çeşitliliğini bulabilmek için genellikle RdRp gibi korunmuş bölgelerden hazırlanan primerleri tercih edilmektedir. Bu tip kısa korunmuş dizilerin kullanımı sonucunda bazı suşlar birbirinden ayırt edilemez ve sınıflandırmanın tam anlamıyla yapılamaması gibi dezavantajı vardır (Zheng ve diğerleri, 2006).

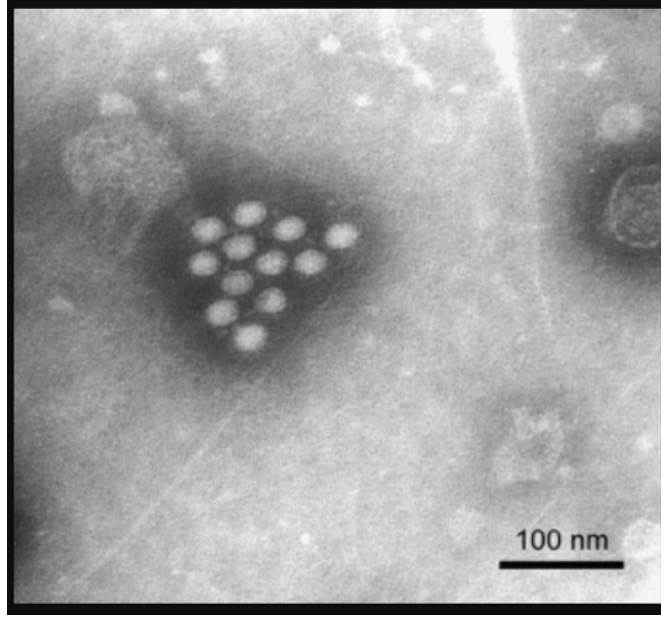
Tüm bu bilgilere rağmen norovirusların sınıflandırması için kabul edilmiş bir standartın olmaması tutarsız raporlamalara sebep olmuştur. Bunun sonucunda evrensel terminoloji ve sınıflandırmanın geliştirilebilmesi için norovirus araştırma grubu kurulmuştur (Winder ve diğerleri, 2022). BNoV'lerin çeşitliliğinin rekombinasyon yoluyla artması ve dolaşıma katılması sebebiyle dünya çapında birçok laboratuvarında rutin olarak Dual tiplleme kullanılmaktadır (Chhabra ve diğerleri, 2019). Bu tipllemede VP1 sekans verileri genogrup ve genotip sınıflandırmasında kullanılırken RdRp sekans verileri ise polimeraz gruplarına göre sınıflandırma için kullanılmıştır (Winder ve diğerleri, 2022). BNoV hücre kültürlerinde üretilmedikleri için Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ve genomik dizileme ile karakterize edilir. Böylece tespit edilen norovirus suşları arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenir (Ferragut ve diğerleri, 2016).

Noroviruslar kapsid proteini aminoasit dizilimine göre kendi içerisinde en az 10 genogruptan oluşmaktadır. Bu on genogrup Dual tiplere göre VP1'in aminoasit dizilimine bağlı olarak 49 doğrulanmış kapsit genotipine ve RdRp bölgesinin kısmi nükleotit dizilimine bağlı olarak 60 doğrulanmış P-tipine bölünür (Chhabra ve diğerleri, 2019).

Genogrup (G) GI, GII, GIV insanları enfekte eder. GI'de 14 P tipi, 9 kapsit genotip tipi geliştirilmiştir. GII'de 27 P tipi, 22 kapsit genotipi belirlenmiştir (Chhabra ve diğerleri, 2019). GII, çocuklarda akut diyareye sebep olan en yaygın genogruttur (Lu ve diğerleri, 2019). GII domuz dışkı örneklerinde tespit edilen (GII.11, GII.18 ve GII.19) genotiplerini içerir (Chhabra ve diğerleri, 2019).

Norovirus GIII sığırları enfekte eder ve Nebovirus genusu ile beraber BEC olarak isimlendirilirler (Hacıoğlu ve Alkan 2018). BNoV'nin yani Norovirus Genogrup III'ün genetik analizine göre GIII.1, GIII.2 olmak üzere iki genotipi vardır. Buna ek olarak önerilen GIII.3 bulunmaktadır (Wolf ve diğerleri, 2009). GIII.1'in prototip suşu Jena virus (JV), GIII.2'nin prototip suşu Newbury Agent 2 (NB2)'dir (Ferragut ve diğerleri, 2016). GIII.3'ün prototip suşu olarak Ov/NZL/2007/GIII.3/Norsewood30 önerilmiştir (Wolf ve diğerleri, 2009).

Yeni Zelanda'da koyunlardan ve domuzlardan alınan dışkı örneklerinde GIII ile yakın ilişkili bir norovirus tespit edilmiş olup GIII.3 (Ov/NZL/2007/GIII.3/Norsewood30) olarak tanımlanması önerilmiştir. Koyunlardan alınan bu dışkı örneklerinde tespit edilen suşun sekans analizinde JV'ye %77,1 aa ve NB2 suşuna %76,3 aa benzerlik taşıdığı saptanmıştır. Sekanslanan RdRp bölgesinin nükleotit ve aminoasit dizileri kapsid dizisine kıyasla her iki prototip suşa daha fazla benzerlik gösterir. Bunun sebebi, RdRp bölgelerinin nispeten kısa olması ve yüksek oranda korunan ORF1-ORF2 bölgesinde yer alması olabilir. Filogenetik araştırmalara göre Resim 1'de bu suşun JV ve NB2 suşlarından genetik olarak farklı olduğu tespit edilmiştir (Wolf ve diğerleri, 2009).



Resim 1. Koyun dışkı örneğinde bulunan norovirus (GIII.3) partiküllerinin elektron mikroskop görüntüsü (Wolf ve diğerleri, 2009).

Arjantin’de yapılan bir çalışmada ise sığırlarda olası GIII.4 suşu (Bo/AR/2012/B4881) bildirilmiştir (Ferragut ve diğerleri, 2016).

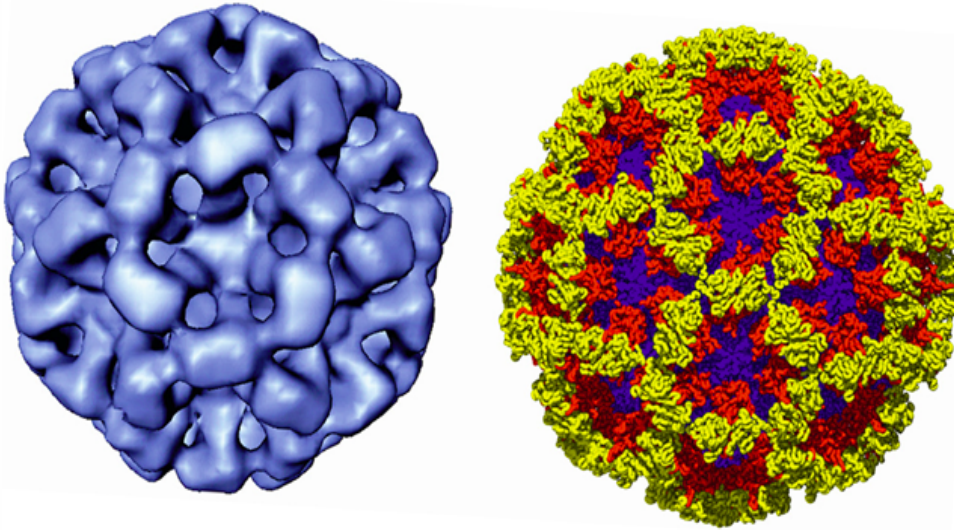
GIV, 2 genotipten oluşur; GIV-1 insanları, GIV-2 kedi ve köpekleri enfekte eder (Vinjé 2015). GV Murine Norovirus 1 (MNV-1) ise kemirgen türlerini enfekte eder. Kuzey Amerika’daki araştırmalarda MNV-2,3 ve 4 izole edilmiştir. MNV-1’de geçici bir enfeksiyon gözlenirken diğer suşların daha uzun süreli ishale (1-8 hafta) ve kronik doku enfeksiyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Scipioni ve diğerleri, 2008). GVI kedi ve köpeklerde bildirilmiştir. GVII köpeklerde, GVIII ve GIX insanda, GX ise yarasalarda tespit edildiği doğrulanmıştır (Chhabra ve diğerleri, 2019).

Neboviruslar bugüne kadar sadece buzağılarda tespit edilmiştir (Smiley ve diğerleri, 2003). RdRp geni analizlerine göre üç genotip önerilmiştir. Newbury Agent I, Nebraska ve Dijon’dur (Kaplon ve diğerleri, 2011). Kapsid geni analizlerine göre ise iki genotipe ayrılmıştır. (Bo/DijonA216/06/FR) ve Bo/LZB-1/17/CH suşlarıdır (Guo ve diğerleri, 2018b). Fakat yine de genetik mesafelerin hesaplanması üzerine yeterli çalışma olmadığı için sınıflandırmada net bir tanım yoktur (Guo ve diğerleri, 2019). Ayrıca yakın zamanda neboviruslar ile akraba olan Kırklareli suşu bildirilmiştir (Alkan ve diğerleri, 2015). Filogenetik çalışmalara göre bu suşların kapsid protein nt dizilerine göre %98 benzerlik olduğu görülmüştür (Turan ve diğerleri, 2018). Dünya çapında en yaygın suşun Newbury Agent I olduğu bildirilmiştir (Guo ve diğerleri, 2019).

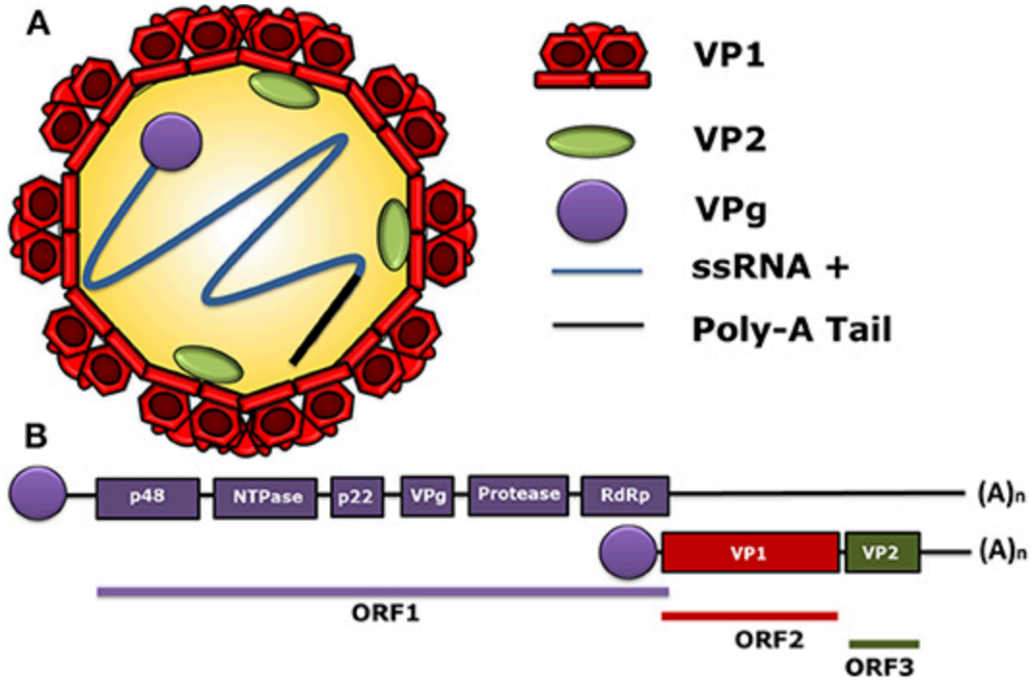
2.2.2. Morfolojii

Caliciviruslar ikozahedral simetrlili ve zarfsız olup yaklaşık 27-40 nm çapındadır (Vinjé ve diğlerleri, 2019). Tipik bir calicivirus kapsidi 90 VP1 dimerlerinden oluşur. Bu çıkıntılı VP1 dimerleri elektron mikroskopi altında fincan şekilli (kaliks) karakteristik bir görünümde olmasına sebep olur (Richard ve diğlerleri, 2019). Norwalk benzeri caliciviruslar (Norwalk Like Virus; NLV) olarak da adlandırılan BNoV diğler enterik viruslardan farklı olarak düzensiz kenarlı amorf bir yapıya sahiptir. Bu sebeple morfolojik yapı olarak kolayca ayırt edilebilir (Liu ve diğlerleri, 1999). Neboviruslar bovine noroviruslardan farklı olarak virion çapı 36.6 nm olup belirsiz bir yüzeye sahiptir (Dastjerdi ve diğlerleri, 2000).

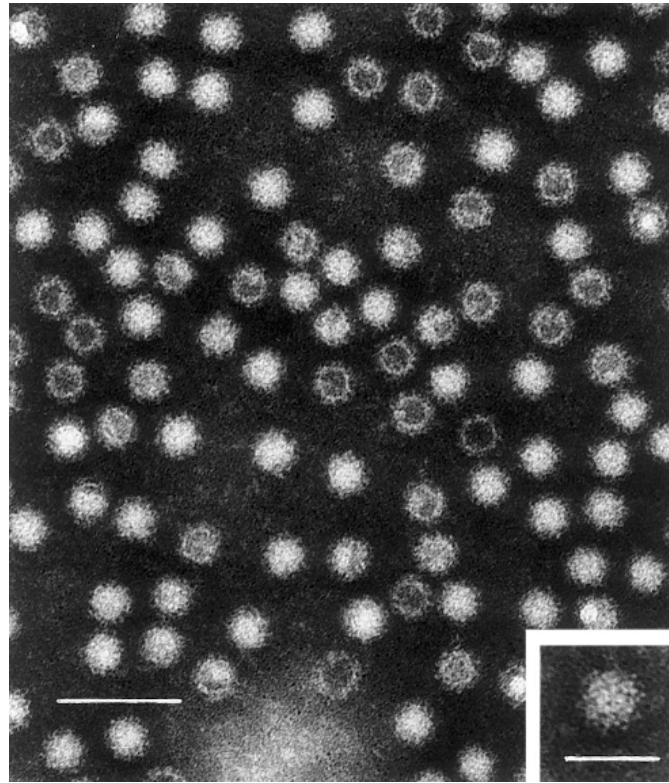
Calicivirus morfolojileri resim 1, 2 ve 3'te görölmektedir. Calicivirus kapsidi ismini aldığı kupa veya kadeh benzeri şekilde 32 farklı çöküntüye sahiptir. Bu kapsit ana yapısal protein olan VP1'den oluşur. Noroviruslarda VP1; kabuk (S) alanı ve çıkıntılı (P) alandan oluşur. P alanı kendi içinde P1 ve P2 olmak üzere iki alt alandan oluşur (Vinjé ve diğlerleri, 2019). Norovirusların genomik ve şematik yapısı şekil 1'de görölmektedir. P2 subdomaini kapsomerlerin dış kısmına yerleşir ve virionun yüzeyine yayılarak kupa benzeri çöküntü şeklini oluşturur (Altay ve Aylin, 2012).



Resim 2. Calicivirusların kriyo-elektron mikroskopisinde kapsid yapısı (Vinjé ve diğlerleri, 2019).



Şekil 1. İnsan Norovirusunun moleküler yapısı (Véliz ve diğerleri, 2020).



Resim 3. BNoV GIII.2'nin Solid faz immulelektron mikroskopik görüntüsü (Dastjerdi ve diğerleri, 1999).

2.2.3. Genom Yapısı

Caliciviridae ailesinin üyeleri tek iplikçikli, segmentsiz, pozitif polariteli, lineer yapılı RNA'dan oluşmaktadır (Clarke ve Lambden, 1997). Calicivirusların genom büyüklüğü de 7.4-8.4 kilobazdır (kb) (Plavsic ve diğerleri, 2011). Bir veya daha fazla kopyası bulunan yaklaşık 2 kb'lık bir subgenomik RNA'ya sahiptir (Richard ve diğerleri, 2019). Norovirus genomunda 3 adet ORF bulunur ve ORF1, ORF2 ve ORF3 olarak adlandırılır (Han ve diğerleri, 2005). Neboviruslarda ise 2 adet ORF bulunur (Clarke ve Lambden, 2000).

Genomun, 3' ucu poliadenillenmiştir (Hardy ve Estes, 1996). 5' ucu viral protein genomu (Vpg) olarak adlandırılan viral proteine kovalent bağ ile bağlanmıştır (Thorne ve Goodfellow, 2014). Bu viral protein proteinaz k ile muamele edilip RNA'dan ayrıştırıldığında virusun enfektivitesini kaybettiği saptanmıştır (Burroughs ve Brown, 1978). Viral proteinaz, poly-A proteinini parçalayarak hücrel translasyonu engelleyebilir. BNoV RNA genomunun sezyum klorür (CsCl) çözeltisindeki yüzer yoğunluğu (buoyant density) 1.33–1.41 g/cm³'tür (Scipioni ve diğerleri, 2008). Gliserol potasyum tartrat gradyanlarında genomun yoğunluğu 1.29 g/cm³'tür. Sedimantasyon katsayısı ise 170–187 S'dir (Plavsic ve diğerleri, 2011).

BNoV genomunun tam sekanslaması norovirus cDNA'sı kullanılarak yapılmıştır. Toplamda 7642 nükleotit içeren viral genomun 3' sonlama kısmı 110 baz poly A içermektedir. Viral genomun poly A kuyruğunu içermeyen diğer bölgesinde ise %27,6 adenin (A), %24,4 timin (T), %24,6 guanin (G), %23,4 sitozin (C) bazı bulunmaktadır. G ve C ise toplam bazın %48'ini oluşturmaktadır (Jiang ve diğerleri, 1993).

Newbury agent 2 suşu ile jena virus suşu kapsid genleri arasında %68 aminoasit benzerliği, ORF3 diziliminde ise %63 aminoasit benzerliği tespit edilmiştir. NA2 suşunun JV'ye göre kapsid ve ORF3 genleri daha uzun ancak 3' çevrilmemiş bölge daha kısadır. Ayrıca ORF1 ile ORF2 genlerin katlanması her iki suş içinde benzer uzunluktadır (Oliver ve diğerleri, 2003).

Nebovirusları diğer calicivirus cinslerinden ayıran dört temel özellik belirlenmiştir. Bu özellikler; 5' untranslated region (UTR) diğer herhangi bir calicivirustan en az üç kat daha uzundur, ORF1 ve ORF2 örtüşmediği ama tek bir nükleotid ile ayrıldığı görülmüştür, 3C-proteaz proteini tipik calicivirus motifine sahip değildir ve son olarak ORF2 bazı caliciviruslardan en az 60 kalıntı daha uzundur. Bu özellikleri sayesinde farklı bir calicivirus olduğu kanıtlanmıştır (Oliver ve diğerleri, 2006).

2.2.4. Viral Proteinler

BNoV genomu üç adet ORF içerir (Clarke ve Lambden, 1997). ORF1 1.789 aa, ORF2 530 aa, ORF3 212 aa kodlar (Hardy ve Estes, 1996). *Caliciviridae* ailesi içerisinde bulunan virusların genom organizasyonları Şekil 2’de gösterilmiştir. ORF1 yapısal olmayan proteinleri kodlar, ORF2 subgenomik mesajcı ribonükleik asitlerden (mRNA) eksprese edilir. Bölünme bölgeleri bazı cinsler için tam konumlarında farklılıklar gösterebilir (ICTV, 2019).

ORF1, 5100 baz uzunluğunda olup genomik RNA’nın 5’ ucunda bulunur ve yapısal olmayan 195 kilodaltonluk (kDa) poliproteini kodlar. Bu yapısal olmayan protein 3C benzeri viral proteinaz (3CLPro) tarafından en az altı adet proteine bölünür. Bu proteinler; NS1/2 (p48); hücre içi protein sentezinden sorumlu, NS3 ve NS4 (NTPase ve p22); hücre membranı giriş çıkışları ve replikasyon kompleksinde görevlidir. NS5 (VPg); proteinaz enzimi ile konakçı protein sentezini inhibe edebilir (Scipioni ve diğerleri, 2008; Winder ve diğerleri, 2022). Ayrıca genom replikasyonu için primer görevine sahip olabilir (Richard ve diğerleri, 2019). NS6; Viral proteazdır (Winder ve diğerleri, 2022). NS7 (RdRp) ise transkripsiyondan, viral genomun replikasyonundan ve genetik bilgi kaybının önüne geçebilmek için RNA sentezinin doğru başlatılmasından sorumlu enzimdir (Wang ve diğerleri, 2019). Viral genomu virus partiküllerinin içerisine paketlemede de görev alır (Altay ve Aylin, 2012). Olgun RdRp’ler yaklaşık 60 kDa’dur. Bu proteinin kodlama dizisi ORF1’in 3’ ucundaki viral proteazın hemen ardından gelir (Richard ve diğerleri, 2019).

ORF1’in ilk translasyon başlatma kodonu nükleotit 146’da bulunduğu ve genomun 5’ ucu özellikle de ilk 20 nükleotit yüksek oranda korunduğu rapor edilmiştir (Hardy ve Estes 1996). Norovirus genomunun ilk 1100 nt içinde yedi adet translasyon başlatma kodonu bulunmaktadır. Bunlardan ilk AUG, ellinci AUG ve yetmişinci AUG favori başlatma kodonlarıdır. Eğer ki ilk AUG başlatma kodonu kullanılırsa yaklaşık 160 kDa’lık bir poliprotein sentezlendiği tespit edilmiştir. Bu sebeple yapılan çalışmalar ORF1’in ellinci AUG kodonunu kullanarak poliproteini kodladığı düşünülmektedir (Jiang ve diğerleri, 1993).

ORF2, 1600 baz uzunluğunda olup ana kapsid proteinini olan VP1’i kodlar. Bu protein yaklaşık 60 kDa’lık olup kendi kendine montaj (self-assembly) ve kapsid oluşumu, reseptörün tanınması, konak özgünlüğü, suş çeşitliliğinin belirlemesi ve immunojenite gibi fonksiyonlara sahiptir. VP1 aminoasit dizisinde varyasyonlar sıklıkla görülür ve yeni salgın suşlarının ortaya çıkmasına sebep olur (Scipioni ve diğerleri, 2008; Winder ve diğerleri, 2022). Ayrıca ORF2,

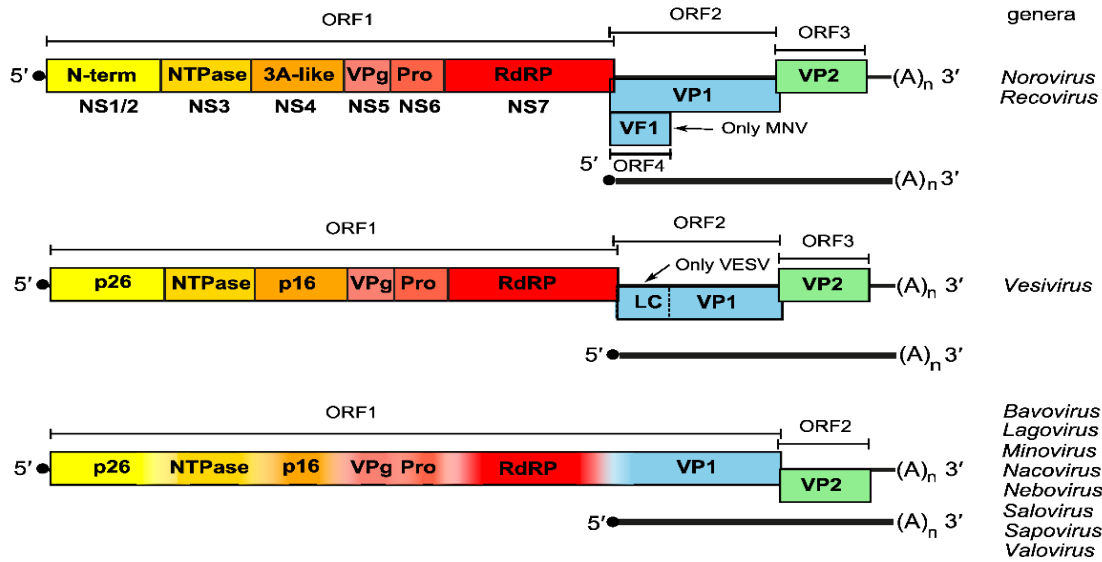
ORF1'in 3' ucundaki 14 nt ile örtüşmektedir ve 6935 nt'te sonlandırma kodonu bulunur (Jiang ve diğerleri, 1993).

BNoV ve neboviruslarda VP1 kapsid proteini kabuk (S) ve çıkıntı (P) olmak üzere iki alandan oluşur. (Resim 4) Kabuk alanı N- terminal 225 aminoasitten, çıkıntılı alan ise C-terminal kısmının son 226 aminoasitinden oluşur. P alanı ise P1 ve P2 olmak üzere iki alt alandan oluşur (Guo ve diğerleri, 2018b; Han ve diğerleri, 2005). S alanı viral RNA'yı çevreler ve ikozahedral simetri yapısının korunmasını sağlar (Plavsic ve diğerleri, 2011). Bu alan genom içinde en fazla korunan bölgedir (Han ve diğerleri, 2005). P alanı hücre bağlanması ve tür çeşitliliği belirleyicilerini içerir (Singh ve diğerleri, 2016). P2 hiperdeğişken alandır ayrıca hem hücre reseptörü hem de immünojenik determinantın işlevi ile ilgili bölgededir (Ferragut ve diğerleri, 2016). BNoV'lerin histo kan grubu antijenlerini insan noroviruslarına kıyasla daha zayıf bağlanması bovine norovirusların başka bir bağlanma reseptörü kullandığını akıllara getirmiştir (Singh ve diğerleri, 2016). Özellikle bağırsak hücre reseptörlerine bağlanmaya yatkın olduğu tespit edilmiştir (Scipioni ve diğerleri, 2008). Buna ek olarak sialik asitin NB2 suşu için bağlanma reseptörü olabileceği düşünülmüştür (Mauroy ve diğerleri, 2011). P1 alanı P2 alanına göre nispeten daha korunmuş konumdadır. Bu durum farklı viral serotipler arasında antijenik çeşitliliğe sebep olur (Plavsic ve diğerleri, 2011). NB2'nin P1 alanı tek bir alfa (α) sarmalı ve sekiz beta (β) yaprağından oluşurken P2 alt alanı fiçi benzeri yapı oluşturan altı anti-paralel β yaprağından oluşmaktadır. NB2 suşunun P alanına en yakın suşun JV'nin P alanı olduğu bu çalışmayla tespit edilmiştir (Singh ve diğerleri, 2016)

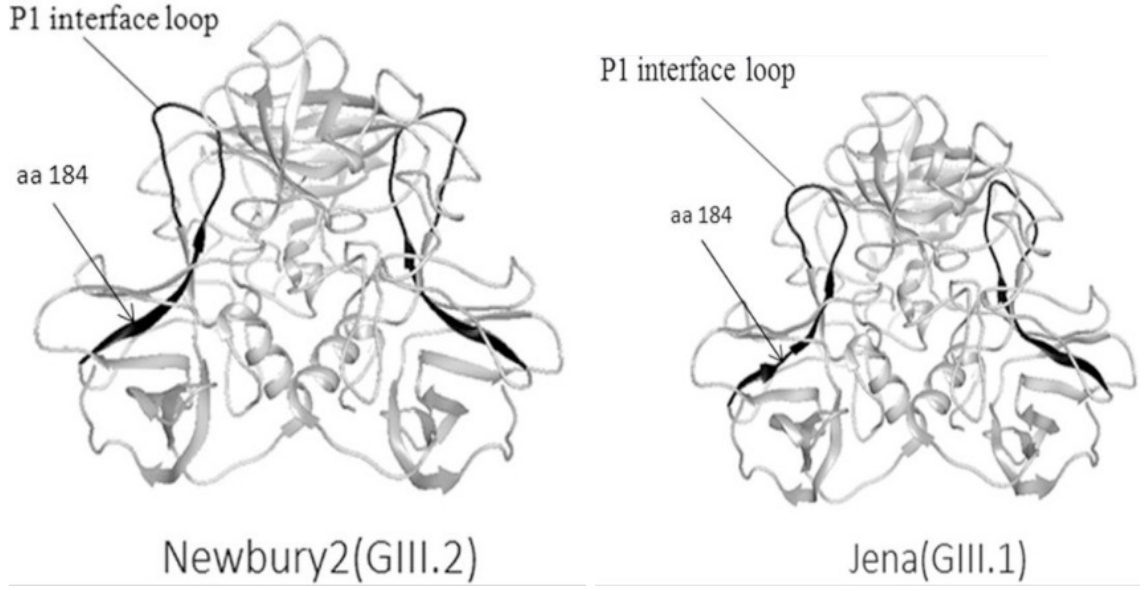
ORF3, 720 baz uzunluğunda olup genomun 3' bölgesinde bulunur ve minör kapsid proteini olan yaklaşık 20 kDa'luk VP2'yi kodlar. VP2, VP1 kapsid proteininin ekspresyonu ve stabilitesinde görev alır (Scipioni ve diğerleri, 2008; Winder ve diğerleri, 2022). Bunun yanı sıra bulaşıcı virionların üretiminde rol oynar (Thorne ve Goodfellow, 2014). Hiperdeğişken bir bölgedir (Wang ve diğerleri, 2019). ORF2-ORF3 subgenomik RNA'dan çevrilir (Thorne ve Goodfellow, 2014).

BNoV'de rekombinasyon olaylarının çoğu ORF1-ORF2 arasında tek bir bölgede meydana gelir. Bu bölgede rekombinasyon viral genomun replikasyonunda yer alan bölgeyi korur ve sadece viral kapsidin yapısının değişmesine izin verir. Bu durumun virusun sürü bağışıklığına karşı dirençli olmasına olanak sağladığı düşünülmektedir (Wang ve diğerleri, 2019).

Nebovirus genomu 7454 nükleotitten oluşur (Oliver ve diğerleri, 2006). İki adet açık okuma çerçevesi içerir. ORF1 yapısal olmayan proteinleri ve temel kapsit proteinini (VP1) kodlar. ORF2 minör yapısal proteini (VP2) kodlar (Hacıoğlu ve Alkan, 2018). Nebovirus genomu, 75 nt'ten oluşan 5' çevrilmemiş bir bölgeye, ORF1 ve ORF2'yi çevreleyen 67 nt'ten oluşan 3' çevrilmemiş bölgeye sahiptir (Oliver ve diğerleri, 2006). ORF1 2210 aa uzunluğundadır. Ana kapsid proteinini ile bitişik olan yapısal olmayan poliproteini kodlar. ORF2 genomun 3' ucunda yer alır. 678 aa uzunluğundadır. Daha küçük kapsid proteini olan VP2'yi kodlar. VP1 nebovirusların ana yapısal bileşeni olup ABO histo-kan grubu antijenlerinin bağlanmasında rol oynar. (Guo ve diğerleri, 2019). Neboviruslar 49,4 kDa'luk kapsid proteinine sahiptir. Enfeksiyon sonrası hazırlanmış olan serumlardan saflaştırılan Newbury agent 1 preparatları western blotlama yöntemi ile tespit edilmiştir (Dastjerdi ve diğerleri, 2000). Kırklareli virüsü olarak adlandırılan suşun poly-A kuyruğu hariç genomu 7484 nt uzunluğundadır. 5' UTR 67 nt uzunluğunda ve 3' UTR ise 80 nt uzunluğundadır. ORF1 6581, ORF2 ise 657 nt uzunluğundadır. ORF1'de 2C benzeri helikaz-nükleozid trifosfataz DNA bağlama, ATP hidroliz motifleri, 3D pol motifleri, VP1 kapsid motifleri sentezlenir. Neboviruslarda 2 suş içerse de rekombinasyona veya genetik sürüklenmeye bağlı heterojenliğe rastlanılmıştır (Alkan ve diğerleri, 2015).



Şekil 2. *Caliciviridae* ailesinin şematik genom organizasyonu (Vinjé ve diğerleri, 2019).



Resim 4. P bölgesinin 3 boyutlu modellemesi (Wang ve diğerleri, 2019).

2.2.5. Replikasyon

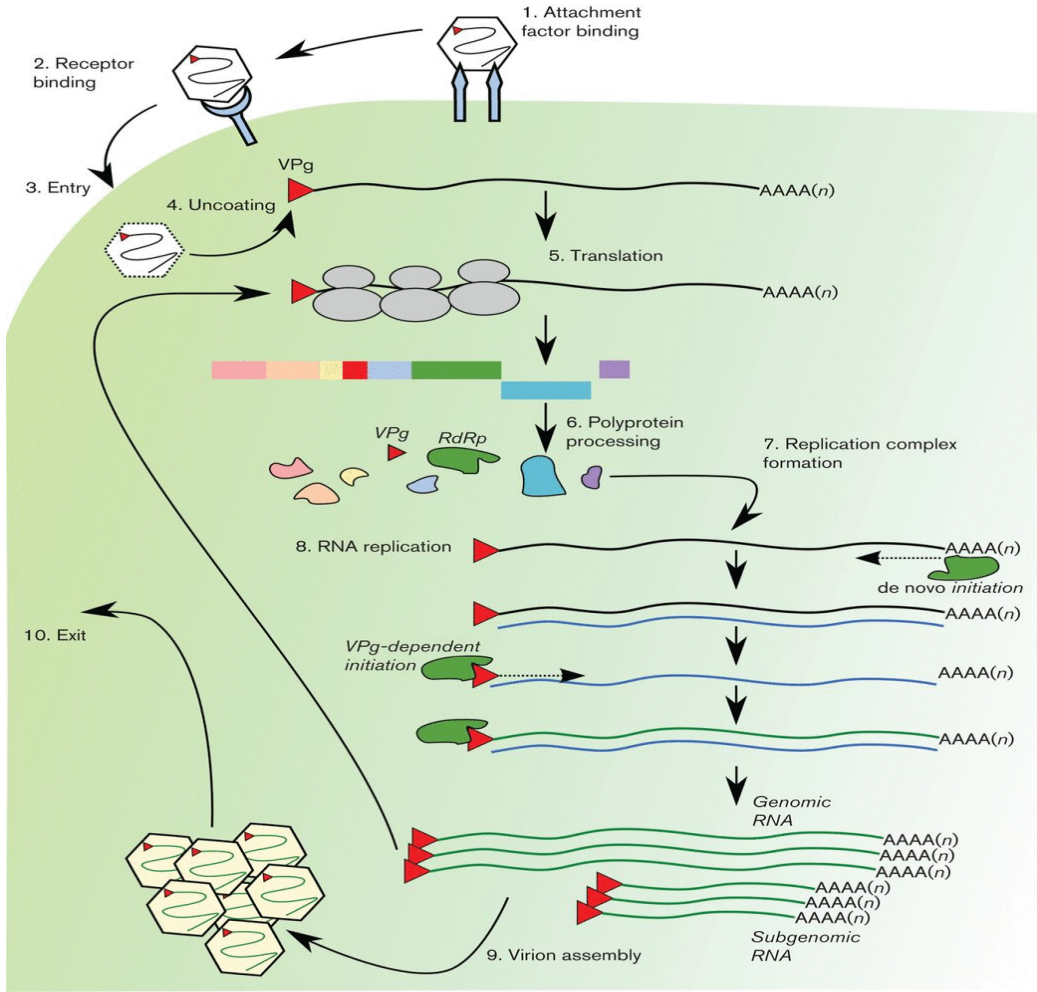
BNoV'ler ile yapılan ilk çalışmalar virus replikasyonu için muhtemel hedef hücrelerin ince bağırsağın enterositleri olduğunu göstermiştir (Liu ve diğerleri, 1999). Ancak çalışmalar bu enterositlerde BNoV'lerin varlığını kanıtlayamamıştır. Bu sebeple virus replikasyonu enterositlerle sınırlandırılmamıştır (Scipioni ve diğerleri, 2008). Hücre içinde replikasyon sitoplazmada gerçekleşir (Vinjé ve diğerleri, 2019).

Enteric calicivirüslerden şimdiye kadar domuz sapovirus cowden suşu ve MNV hücre kültürlerinde üretilebilmiştir (Flynn ve Saif, 1988; Karst ve diğerleri, 2003). MNV primer makrofaj ve fare kökenli dendritik hücre kültürlerinde üretilebilmektedir. Virus makrofaj hücrelerinde plak oluşumu meydana getirerek ürer (Plavsic ve diğerleri, 2011). Bu yüzden replikasyon mekanizması olarak MNV model olarak kullanılmaktadır (Thorne ve Goodfellow, 2014). Şekil 3'te calicivirus replikasyon mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.

MNV'ler çeşitli karbonhidrat bağlanma faktörleri kullanarak hücre yüzeyine bağlanır. MNV'nin hücrelere giriş mekanizması net olmasa da dinamin ve kolestrole bağlı olduğu bilinmektedir. VPg-bağlı RNA genomu hücrenin stoplazmasına endositoz yoluyla giriş yapar. Pozitif polariteli genom, viral proteinlerin sentezi için mRNA görevi görür. Viral genom; 5'

ucundaki VPg aracılığıyla translasyona uğrar. Translasyon sonrası ORF1 poliproteini viral proteaz tarafından bölünür ve RdRp, tek ve çift iplikli RNA ara ürünleri, viral enzimler, konak hücre replikasyon faktörlerini içeren stoplazmik zarla çevrili replikasyon kompleksini oluşturur. Genomik ve subgenomik RNA sentezi de VPg'ye bağlı bir şekilde gerçekleşir. Bu işlem için RdRp VPg'yi primer olarak kullanır ve RNA sentezini başlatır. Viral protein olan VP1 ve VP2'nin translasyonu subgenomik RNA'dan meydana gelir. BNoV'nin subgenomik RNA'sı birden fazla proteinin genetik koduna sahip olduğu için VP2'nin translasyonu, sonlandırma ve yeniden başlatma mekanizması ile gerçekleşir. ORF2'nin translasyonunun ardından ORF3'ün translasyonunu başlatmak için ribozomun viral RNA ile bağlantı halinde kaldığı düşünülür. Bu durum ORF2 ve ORF3 bitirme ve başlatma kodonlarının çakışmasıyla kolaylaşır. BNoV RNA'sı için ORF1 ve ORF2 arasında benzer bir sonlandırma ve yeniden başlatma ilişkisi vardır. Subgenomik RNA enfekte hücrelerde viral RNA'dan daha yüksek seviyelerde bulunur. Böylece daha fazla ana kapsid proteini üretilir. Genom replikasyonu negatif zincirli ara ürün aracılığıyla gerçekleşir. Genomik ve subgenomik RNA, RNA sentezinin hem de novo hem de VPg'ye bağlı mekanizmalarını kullanarak viral RdRp (NS7) oluşturur. Replike olan genomlar, virion montajı ve çıkışı için kapsid ile çevrilir. Olgunlaşan virus partikülleri hücre dışına atılır veya salınır (Thorne ve Goodfellow, 2014; Winder ve diğerleri, 2022).

Genom replikasyon mekanizması net bir şekilde anlaşılamamış olsa da RdRp'nin de novo ve Vpg'ye bağlı olmak üzere 2 farklı replikasyon başlatma mekanizması tanımlanmıştır. Fakat negatif anlamlı RNA'nın Vpg'ye bağlı olduğunu gösteren herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Virus, replikasyonunu gerçekleştirebilmek için konakçı hücre yolağını bozduğu tahmin edilmektedir. Hücre yolağının bozulması ve yüzey proteini ekspresyonunun engellenmesi, BNoV enfeksiyonu sonucu antijen veya sitokin salgılanmasına müdahale etme gibi avantajlar sağlar (Thorne ve Goodfellow, 2014).



Şekil 3. MNV replikasyon döngüsü (Thorne ve Goodfellow, 2014).

2.2.6. Virus Stabilitesi

Genel olarak RNA viruslarının genomlarında RdRp'nin DNA polimeraz gibi düzeltme etkilerinden (proofreading mekanizması) yoksun olması dolayısıyla mutasyonel değişimlere açıktır. RNA viruslarında her replikasyon döngüsü başına bir hata ile karşılaşılır. Hata çalışmaları değerlendirmek zor olsada bazı eğilimler ortaya çıkmıştır. MNV için ortalama hata oranı 6.8×10^{-4} 'tür. Doğruluk ve replikasyon hızı virus evrimini oluşturan önemli faktörlerdir. Artan replikasyon oranı sonucu daha fazla genom kopyası üretilir. Böylece hata oranı aynı kalsa bile daha fazla varyant oluşur (Richard ve diğerleri, 2019).

BNoV lipit zarfları olmadığı için hafif deterjanlar, eter veya kloroform gibi çözücülere karşı duyarlı değildir. 10 mg/L klor ile muameleden sonra ancak inaktive olur (Plavsic ve diğerleri, 2011).

Calicivirusları temsilen vesiviruslarda yapılan çalışmalara göre yüzeylerde ve solüsyonlarda 7 gün sonra oda sıcaklığında inaktif hale gelir. Çözeltide 50-56 °C'de ve 30 dk ve üzeri muamele edilmesi sonucu inaktivasyonu gerçekleşir fakat 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda daha tutarlı sonuçlar alınır. Formaldehit; oda sıcaklığında ≥ 30 dk ve ≥ 7000 ppm'da, serbest klor; ≥ 2500 ppm, ≥ 30 dk teması, yüksek basınçta ise 4 °C'de ≥ 5 dk ve ≥ 200 MPa' da virus inaktif hale gelir. Yüzeylerin dezenfeksiyonu ise gluteraldehit; oda sıcaklığında ≥ 5 dk ve ≥ 2500 ppm basınç, hidrojen peroksit buharı 15dk'dan fazla ve ozon, plastik üzerinde 20 dk ve üzeri 20-25 ppm'da uygulanması inaktivasyonu sağlar (Nims ve Plavsic, 2013). Caliciviruslar pH 5'e oldukça dayanıklıdır ancak pH 3'te inaktive olurlar (Güzel, 1994).

2.3. Epizootiyoloji

2.3.1. Dünya'da Durum

Dünya çapında en yaygın olan BNoV suşu Newbury agent 2'dir (Mauroy ve diğerleri, 2011). Jena virus suşunun daha az görülmesinin sebebi ise viral saçılımının kısa olmasıdır (Hacıoğlu ve Alkan, 2019).

Sığırlarda norovirusların varlığı öncelikle ABD, Birleşik Krallık, Almanya ve Hollanda'da araştırılmıştır. Buna ek olarak BNoV Kanada, Belçika, Slovakya, Macaristan, Güney Kore, Türkiye, Yeni Zelanda ve Venezuela gibi ülkelerde de rapor edilmiştir (Yılmaz ve diğerleri, 2011). 2007 yılında Asya'da, 2012 yılında ise Afrika'da çalışmalar yapılmıştır (Di Felice ve diğerleri, 2016).

Hollanda'da dana buzağı çiftliklerinden alınan dışkı örneklerinin %32'si (77/243) ve bireysel süt sığırlarından alınan dışkı örneklerinin %4'ünün (13/312) NB2 bakımından pozitif olduğu bildirilmiştir (Van Der Poel ve diğerleri, 2003).

Almanya'da süt ineklerinden alınan ishal dışkı örneklerinin %8,9'u (381/34) ELISA'da JV için antikor pozitif olduğu bulunmuştur (Deng ve diğerleri, 2003).

İngiltere'de Veterinary Laboratories Agency'nin havuzunda bulunan çiftliklerden toplanmış 3 günlükten 2 yıllık yaşa (%72'si 1 aylık yaşta, %80'i 6 aydan küçük) kadar olan 398 hayvandan alınan örneklerde RT-PCR ile %11'i (44/398) norovirus pozitif bulunmuştur. En

fazla şubat ayında gönderilen örneklerden pozitiflik çıktığı ancak belirgin bir eğilim olmadığı tespit edilmiştir. 15/168 pozitiflik gösteren örneklerin 12'si %80'inde klinik belirtiler 3 günden az sürmüştür (Milnes ve diğerleri, 2007).

Güney Kore'de ishali buzağılardan alınan dışkı örneklerinin %9,3 BNoV için pozitif bulunmuştur. Bu örneklerin %5,9'unda coronavirus, BVD, torovirus, rotaviruslar, nebraska benzeri calicivirus ve *Escherichia coli* gibi etkenlerin varlığı tespit edilmiştir (Park ve diğerleri, 2007).

Belçika'da, yaşları 1 hafta ile 6 ay arasında olan ishali buzağılardan 2007 yılı boyunca toplanan 74 adet dışkı örneklerinin %7,5'i NB2 suşu yönünden için pozitif bulunmuştur. Dört farklı primerle çalışılmış ve CBECU primeri ile daha fazla izolat tespit edilmiştir. 439 buzağı ve yetişkin sığırlardan alınan kan numuneleri üzerinde yapılan ELISA testinde ise %93,2 NB2 suşuna karşı seroprevalans belirlenmiştir (Mauroy ve diğerleri, 2009).

Norveç genelindeki 15 ilçeden 2004-2006 yılları arasında yıl boyunca yaklaşık 1 yaşa kadar olan ishali buzağılardan (buzağuların %90'ı 2-90 günlük yaştadır) 272 örnek, 90 günden küçük klinik belirti göstermeyen buzağılardan ise 147 örnek toplanmıştır. Yapılan RT-PCR ile sırasıyla %49,3 (134/272), %50,3 (75/147) oranlarında norovirus pozitif bulunmuştur. GIII.1 genotipi ile enfekte olan buzağuların ortalama yaşının 35 gün, GIII.2 genotipi ile enfekte buzağuların ortalama yaşı 44 gün olarak tespit edilmiştir (Jor ve diğerleri, 2010).

Tunus'ta 2006-2010 yılları arasında 3-90 günlük ishali buzağılardan 169 dışkı örneği toplanmıştır. Bölgedeki buzağuların %80'i holstein ırkına sahiptir. RT-PCR ile %16,6 (28/169) pozitiflik bulunmuştur. Bu pozitiflikle norovirus prevalansı kışın %30 (12/40), ilkbaharda %16,7 (8/48), sonbaharda %10 (4/40) ve yazın %9,8 (4/41) bulunmuştur. Bu durumda hastalığın kış mevsiminde daha fazla görüldüğü sonucuna ulaşılmış olup mevsimsel bir farklılık öne sürülmüştür. Bazı ülkelerde sürüler kış sonunda toplu doğum yapmaya programlanmış olabilir fakat Tunus'ta böyle bir programlanın olmayışı akıllara mevsimsellik durumunu getirmiştir. Yapılan filogenetik analizlerde pozitif suşların GIII.2 ile daha yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Hassine-Zaafrane ve diğerleri, 2012).

İtalya'da, rotaviruslarla mix enfeksiyon şeklinde seyreden ishali sığırların %7,9'unda ve klinik olarak sağlıklı buzağuların %8,6'sında BNoV NB2 suşu tespit edilmiştir (Di Felice ve diğerleri, 2016). İtalya'da klinik olarak sağlıklı buzağuların %10,5'inde (11/104) BNoV saptanmıştır. Bu durum genetik direnç mekanizmaları ya da kazanılmış bağışıklık ile ilişkilendirilmiştir. Bu durumda asemptomatik hayvanlardaki BNoV'lerin varlığı, duyarlı

hayvanların sürü içinde etkene sürekli olarak maruz kalmasına sebep olur (Di Martino ve diğerleri, 2014).

ABD’de ise BNoV yayılımının eyaletlere göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Wise ve diğerleri, 2004). Yapılan çalışmalarda Ohio'daki dana ve buzağılarda %72 (Smiley ve diğerleri, 2003), Michigan'da %80 yayılım görülmüştür. Wisconsin'deki buzağılarda BNoV tespit edilmiştir fakat prevalansının belirlenebilmesi için yeterli veri elde edilememiştir (Wise ve diğerleri, 2004). New Mexico, Arkansas ve Ohio’daki ishalleri buzağılarda yapılan çalışmaya göre NB2 suşuna karşı antikorlar için %94-100 seroprevalans tespit edilmiştir (Thomas ve diğerleri, 2014).

Arjantin’deki bir çalışmada 1 ila 90 günlük buzağılardan 2008-2012 yılları arasında toplanan dışkı örneklerinde RT-PCR ile %3,33 (3/90) GIII.1 suşu için 2 adet pozitiflik, GIII.2 suşu için 1 adet pozitiflik bulunmuştur. Aynı örnekler *BCoV*, *BRVA*, *Salmonella ssp*, *Cryptosporidium ssp*. bakımından negatif bulunmuştur. PCR tanı yöntemiyle bulunan pozitifliklerin kıtaya, ülkeye, test stratejisine, kullanılan primerlere göre değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir (Ferragut ve diğerleri, 2016).

BNoV’un JV suşu NB2 suşuna göre daha az rastlanır. Bu durumda JV suşunun küçük kümeler halinde hastalık meydana getirdiği çıkarımı yapılabilir. Avrupa’da bildirilen JV suşu prevalansı Macaristan’da %2,1, Belçika’da %0,3, İtalya’da %2,9, Fransa’da %5 tespit edilmiştir (Di Felice ve diğerleri, 2016).

İran’da 253 ishalleri buzağılardan toplanan numunelerde CBECU primerleriyle yapılan PCR testinde 100/253 %39,5 pozitiflik bulunmuştur. NBU-F/NBU-R primerleri ile yapılan PCR testinde 38/253 %15 pozitiflik bulunmuştur. 13/253 %5,1 hem norovirus hem nebovirus pozitif bulunmuştur. Bulunan norovirus suşun GIII.2 suşu ile daha yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Mevsimsel olarak yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Pourasgari ve diğerleri, 2018).

Mısır’da yaşları 3 hafta – 3 ay olan ishal klinik belirtileri bulunan buzağılardan 29 örnek toplanmıştır. CBECU primerleriyle yapılan PCR’da 8/29 %27,6’sı bovine norovirus pozitif çıkmıştır. İzolatların GIII.2 suşu ile daha yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Mohamed ve diğerleri, 2018).

Çin’de 3-4 aylık yaştaki 28 ishalleri buzağıdan dışkı örnekleri toplanmıştır. CBECU primerleriyle yapılan PCR testinde 3/28 pozitiflik bulunmuştur. Sekans analizinde her iki suşa yakın nükleotit benzerliği göstermesi izolatın bağımsız bir kolda kümelenmesine sebep

olmuştur (Guo ve diğeri, 2018a). Çin’de yapılan başka bir çalışmada ise 3 aydan küçük yaşta ishalleri buzağılardan alınan 211 örneğin 43’ü norovirus pozitif (%20,4) bulunmuştur. Bu oran ile norovirusların Çin’de sık rastlanıldığı sonucuna varılmıştır. Yapılan sekanslama da GIII.2 suşu yaygın olarak görülmüştür (Wang ve diğeri, 2019).

İsveç’te 50 farklı sürüden toplanan 250 dışkı örneğinde J11U/CBECU-R primerleri kullanılarak yapılan PCR testinde 50/250 %20 pozitiflik bulunmuştur. Daha yaşlı sığırların test edildiği başka bir sürüde 5-6 aylık iki düve pozitif bulunmuştur. 6 aylık yaştan daha büyük sığırlarda pozitiflik bulunmamıştır. Neboviruslar için yapılan tanı testinde 13/250 %5,2 pozitiflik bulunmuştur. Nebovirus pozitif buzağılar negatif buzağılardan daha yaşlı olma eğilimine sahipti (Trávén ve diğeri, 2022).

Pakistan’da 6 aydan küçük buzağılarda toplanan 200 adet örnek CBECU primerleri kullanılarak PCR testi uygulanmış olup tüm örneklerin negatif olduğu saptanmıştır. Kullanılan PCR protokolü: 35 döngüde optimize edildi, 94°C’de 3 dk, 94°C’de 30 sn, 50°C’de 30 sn ve 72°C’de 45 sn, extension 72°C’de 10 dk uygulanmıştır (Yasir ve diğeri,2023).

2.3.2. Türkiye’de Durum

Türkiye’de sığırlarda norovirusun varlığı ilk defa 2011 yılında rapor edilmiştir. Marmara bölgesindeki farklı işletmelerden yaşları 1-60 günlük olan 70 ishalleri buzağıdan dışkı örnekleri toplanmış olup bu örneklerde RT-PCR ile %8,5 (6/70) oranında pozitiflik bulunmuştur. Dizi analizine göre elde edilen ampliconların GIII.2 suşu ile yakın ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (Yılmaz ve diğeri, 2011). Bu suşun yaygınlığının %8,57 olduğu bildirilmiştir. Türkiye’de Jena suşu varlığı ise ilk defa 2019 yılında yapılan bir çalışma ile kanıtlanmıştır. Aynı çalışma ile rekombinant BNoV varlığı ilk kez bildirilmiştir (Hacıoğlu ve Alkan, 2019).

2016 yılında yapılan bir çalışmaya göre ise Türkiye’de Balıkesir, Düzce, Sivas, Adıyaman illerine ait 28 farklı kırsal bölgeden toplanan 235 dışkı örneği toplanmıştır. Bu örneklerin sadece 4 tanesinde (%1,7) nested RT-PCR ile GIII.2 yönünden pozitif bulunmuştur (Gülaçtı ve diğeri, 2016).

2018 yılında yapılan çalışmada ise Sivas, Malaya, Elazığ’dan 1 aylıktan küçük ishalleri buzağılardan alınan 127 dışkı örneği RT-PCR ile %3,93’ü (5/127) BNoV pozitif bulunurken 32/127 (%25,19) nebovirus pozitif bulunmuştur. Yapılan filogenetik analize göre BNoV suşu

GIII.2 iken nebovirus suşu ise Newbury agent 1olarak tespit edilmiştir (Turan ve diğerleri, 2018).

Türkiye’de yapılan çalışmalara göre BEC’lerin yaygın olduğu, tek başına veya *rotavirus*, *coronavirus* ve *Cryptosporidium spp.* gibi diğer ajanlarla birlikte enfeksiyon meydana getirdiği tespit edilmiştir (Hacıoğlu ve Alkan, 2019). Son BNoV çalışmaları, önceki raporlara kıyasla, BNoV enfeksiyonunun ishal vakalarıyla ilişkili olarak daha yaygın (%33,5) bir şekilde ortaya çıktığını belirtmiştir (Hacıoğlu ve Alkan, 2018). Yazarlar, BNoV’un oldukça sık görülebilir olmasının nedenini calicivirusların inaktivasyona dirençli olmaları ve NB2 suşunun dışkı ile uzun süre saçılması olarak açıklamışlardır (Hacıoğlu ve Alkan 2018).

Hacıoğlu ve Alkan (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, Türkiye’nin 10 farklı ilinden 1 ila 7 günlük yaştaki ishallerli buzağılardan 167 dışkı örneği toplanmıştır. BEC için yapılan RT-PCR ile %45,5 (76/167) oranında pozitiflik bulunmuştur. Bovine noroviruslar 56 (%33,5), neboviruslar ise 37 (%22,1) dışkı örneğinde tespit edilmiştir. 17 (%10,1) adet dışkı örneğinde ise BNoV ve neboviruslar mix enfeksiyon şeklinde seyrettiği bulunmuştur. Moleküler analize gönderilen ve tesadüfi seçilen 34 BNoV pozitif örnekten 9’u GIII.1 suşuna 25’i ise GIII.2 suşuna ait olduğu, 20 nebovirus pozitif örneğin RdRp gen analizine göre Nebraska suşu ile Newbury agent 1’e oranla daha yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Fakat Aksaray bölgesindeki suşun tam uzunluktaki kapsid genine göre NB1 suşu ile %85.4 nt benzerlik olduğu tespit edildiği bildirilmiştir. Buna ek olarak BNoV pozitif dışkı örnekleri ELİSA kiti ile *bovine rotavirus group A (BRVA)*, *BCoV*, *Escherichia coli (E. coli)* ve *Cryptosporidium spp.* gibi diğer enterik patojenler için de taranmış olup, *Cryptosporidium spp.* (%46,5), *BRVA* (%31,9), *BCoV* (%20,8) tespit edilmiştir. Fakat numunelerin hiçbirinde *E. coli* tespit edilmemiştir.

Konya’da 2019-2020 yılları arasında kesimhaneye sevk edilen cinsiyet ve klinik belirtiler farketmeksizin 2-5 yaşındadaki 80 adet sığırdan dışkı örnekleri toplanmış olup %7,5 (6/80) pozitiflik bulunmuştur (Dik ve diğerleri, 2023).

Türkiye’de ilk defa neboviruslar ile uzaktan akraba olan Trakya bölgesinde kırklareli suşu tespit edilmiştir (Alkan ve diğerleri, 2015).

2.3.3. Konakçı Spektrumu ve Zoonotik Özellik

İnsan ve hayvan noroviruslarının genetik ve antijenik akrabalığı, Kanada'da sığırlarda GII-4 suşuna yakın sekansların saptanmasıyla gösterilmiştir. Bu da ilk olarak türler arası bulaşma olasılığını akla getirmektedir (Zakhour ve diğerleri, 2009). İnsan norovirusu (HNoV) ile enfekte edilen gnotobiyotik buzağılarda ishal, bağırsak lezyonları, jejunum enterositlerinde viral kapsit antijenine rastlanmıştır (Souza ve diğerleri, 2008). BNoV insanlardan henüz izole edilmemiş olsa da Hollanda'daki veteriner hekimlerde BNoV'e karşı immunglobulin G (IgG) antikörlerinin varlığı olası bir insan enfeksiyonunu olabileceği hipotezini ortaya koymuştur (Widdowson ve diğerleri, 2005).

İnsan ve sığır norovirus kapsit proteinlerinin çapraz epitoplari paylaştığı tespit edilmiştir. Çapraz epitoplari varlığı enfekte insanların virusu çiftlik hayvanlarına bulaştırabilme ihtimalini göstermiştir (Mattison ve diğerleri, 2007). Ayrıca insanlarda hayvan noroviruslarına karşı antikörlerin saptanmasını da açıklayabilir (Zakhour ve diğerleri, 2009).

Filogenetik olarak korunan hüresel reseptörlerin kullanılması türler arası bulaşma için risk faktörü oluşturur. Birkaç tür arasında korunan reseptörleri kullanan virusler tarafından, bu türlerin enfekte olma ihtimalinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bunun sebebi yeni konakçı türüne hızlı adaptasyon sağlaması ve hızlı evrimleşmesine neden olan mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Zakhour ve diğerleri, 2009). NB2 suşunun kapsid proteininin korunmuş S alanındaki 116 aminoasitlik bölge incelendiğinde insanlar ve hayvanlarda ortak bulunan suşlar için herhangi bir kanıt bulunamamıştır. Bu durum BEC'lerin insan sağlığını tehdit etmediğini akıllara getirmiştir (Oliver ve diğerleri, 2003).

Calicivirus virus benzeri partüküllerinin (VLP) karbonhidrat epitoplariına bağlanması immunohistokimya yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Korunmuş karbonhidrat ligantları kullanılarak sığır sindirim sistemi epitel hücrelerine rekombinant Newbury agent 2 (rNB2) suşu VLP'si bağlanabilmektedir. rNB2 VLP'leri duodenumda, mukozanın yüzeyinde bulunan lieberkühn kriptlerinin epitel hücrelerine bağlanmasının yanı sıra diğer calicivirusların aksine epitel hücrelerde sınırlı kalmamış olup, endotel hücreleri ve eritrositler üzerinde de gözlenmiştir. Sığır bağırsağında A ve H histo kan grubu epitoplariına ek olarak yeni bir aGal epitopu saptanmıştır. Fakat insanlarda aGal epitopunun bulunmaması sebebiyle rNB2 VLP'ler insan tükürüğüne veya duodenal mukozaya bağlanamamıştır. Bu yüzden rNB2 VLP'ler insanları enfekte edememiştir. αGal epitopu, histo-kan grubu antijeni B tip 2 ile yapısal olarak

2.4. İmmunite

Sığırlarda plasenta yapısı yavruya maternal antikörlerin geçişine izin vermez bu yüzden doğum sonrası kolostrum alımı çok önemlidir (Hacıoğlu ve Alkan, 2018). Doğumdan sonraki 6 saat içinde ortalama 2 ila 4 lt arası kolostrum alımı buzağının bağışıklığı açısından önemlidir. Kolostrum antikörler açısından zengindir özellikle IgG birincil antikör izotipidir (Cho ve Yoon, 2014). Fakat kolostrum alımının enfeksiyonun seyri üzerindeki etkisi hala belirsiz olsa da kolostrum alan bir buzağıda JV'ye özgü antikör tespit edilmiştir. Buna rağmen deneysel olarak enfekte edilen buzağı hastalıktan tamamen korunamamıştır. Kolostrum alan buzağıda maternal antikörlerin ancak enfeksiyonun yayılmasını sınırlayabileceği ve ishalin şiddetini, süresini azaltabileceği düşünülmektedir (Otto ve diğerleri, 2011).

Buzağılarda, deneysel enfeksiyondan sonra ortaya çıkan antikör yanıtı, HNoV ile enfekte olmuş insanlarda gözlenen serolojik yanıtına benzerdir. Virusla enfekte edilen buzağılarda serum IgG antikoru 5 gün sonra düşük titrelerde tespit edilmeye başlanmıştır. Fakat inokulasyondan 3 hafta sonra antikörler maksimum seviyeye ulaşarak 45 güne kadar devam ettiği bildirilmiştir. BNoV enfeksiyonlarında mukozal ve sistemik bağışıklık tepkisi konusunda bilgi sınırlıdır, bu nedenle daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Han ve diğerleri, 2005).

NB2 ile aşılanan buzağılar, ilk aşılardan 3 hafta sonra gelişen homolog bir bağışıklık göstermiştir (Scipioni ve diğerleri, 2008). NB1 ile NB2 arasında çapraz koruma olmadığı bildirilmiştir (Hacıoğlu ve Alkan, 2018).

2.5. Patogenez, Patoloji ve Klinik

BEC'ler fekal-oral yolla bulaşan, viral ishalin başlıca sebeplerinden biridir. Bu virusların patogenezi henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Di Felice ve diğerleri, 2016; Hacıoğlu ve Alkan, 2018).

BEC'lerin enfekte ettiği hayvanlarda klinik olarak görülen en önemli tablo ishaldir (Di Felice ve diğerleri, 2016). BNoV'ler özellikle yenidoğan buzağılarda ishale sebep olan viral ajanlardır (Dik ve diğerleri, 2023). Klinik olarak hemorojik olmayan enterit, hafif diyare, anoreksi ve malabsorbsiyon gibi belirtiler gözlemlenir (Gülaçtı ve diğerleri, 2016). Buna ek

olarak sığır türlerinde solunum yolu enfeksiyonuna neden olduğu doğrulanmıştır (Zakhour ve diğerleri, 2009). BNoV'ler klinik olarak ishal tablosu görülmeyen buzağılarda da yüksek oranda tespit edilmiştir (Jor ve diğerleri, 2010). JV ve NB2 suşları genellikle ince bağırsağın villöz epitel hücrelerini özellikle duodenum ve jejunumda enfeksiyon meydana getirerek yıkıma neden olur (Souza ve diğerleri, 2008). Bağırsak lezyonları genel olarak; villus epitelinin kaybı ve zayıflaması, şiddetli villus atrofi ile karakterize edilmiş olup ince bağırsakta hemorajik odaklar gözlemlenmiştir (Otto ve diğerleri, 2011; Woode ve Bridger, 1978). Lezyonlar en şiddetli ince bağırsağın ön %33'lük kısmında seyretmiştir. İnce bağırsakta enfeksiyondan sonra 3 ila 10 gün arasında kript derinliği artmıştır. Virus parçacıkları enfeksiyondan bir ila dört gün sonra da dışkıda tespit edilmiştir (Hall ve diğerleri, 1984).

NB2 ile enfekte buzağılarda ise JV'ye nazaran daha uzun süreli ishal görüldüğü ve JV ile oluşan enfeksiyonların daha genç yaştaki hayvanları etkileyerek kısa süreli, yoğun bir ishale sebep olduğu bildirilmiştir (Hacıoğlu ve Alkan, 2018). JV suşunun semptomları NB2'ye göre daha şiddetli seyretmektedir (Guo ve diğerleri, 2018a). Yapılan çalışmalarda JV'nin bağırsakta meydana getirdiği hasarın daha yıkıcı olduğu tespit edilmiştir (Jung ve diğerleri, 2014). Genel olarak BNoV'ler hafif hastalık tablosu oluştursalar da bağışıklığı baskılanmış hayvanlarda ciddi klinik belirtilere sebep olur (Scipioni ve diğerleri, 2008).

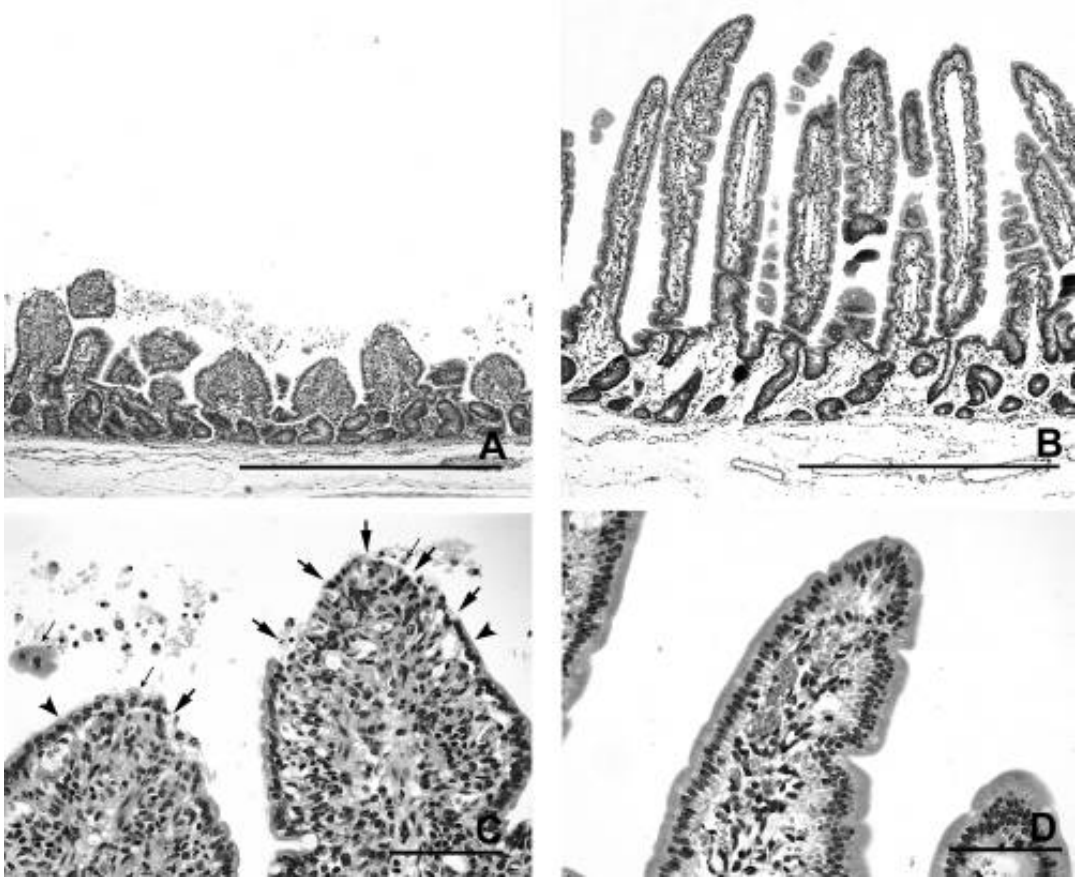
NB2 ile enfekte olan buzağılarda dışkının rengi kahverengiden sarıya dönük, sulu bir yapıya sahip olup 3 haftalık buzağılar, yenidoğanlara göre daha şiddetli ishal olgusu göstermiştir. Bu klinik tablo 2 aylık yaşa kadar benzer kalmıştır. NB2 diğer sığır enterik calicivirus olan NB1'e oranla daha hafif bir hastalık tablosu oluşturur (Scipioni ve diğerleri, 2008; Yılmaz ve diğerleri, 2011). Ayrıca BNoV'ler klinik olarak sağlıklı buzağılardan tespit edilebilmesine rağmen neboviruslar tüm buzağılar için patojendir (Hacıoğlu ve Alkan, 2018).

JV suşu ile deneysel olarak enfekte edilen yeni doğanlarda, 14.-16. saatlerde ishal belirtileri görülmeye başlanmıştır. Bu durum hastalığın çok kısa bir inkubasyon süresine sahip olduğunu gösterir. Lezyonlar ilk olarak 12. Saatte görülmeye başlansa da en yaygın semptomlar 18-19. saatlerde orta jejunumdan-ileum arasında görülmüştür. 4. günde ise bağırsak mukozası tamamen iyileşmiştir. İnce bağırsak mukozalarındaki uzun villuslar üzerindeki epitel hücrelerinin JV antijeni için pozitif olduğu gözlemlenmiştir. Bu da JV 'nin enteroabsorbtif hücreleri enfekte ettiğini göstermektedir. Fakat 18-21 saat sonra ishalin başlamasını takiben villus uzunluğunda ciddi azalma gözlemlenmiştir. Bu villuslardaki enfeksiyon durumu emme ve sindirim kapasitesi kaybına neden olmaktadır. İlk ishali dışkı 14.-16. saatte mekonyumun atılması sonrasında görülmüştür ve en fazla JV miktarını içerdiği tespit edilmiştir (Otto ve

diğerleri, 2011). Makroskopik bulgularda; sekum ve proksimal kolonda 12. Saatte yeşil, yarı sıvı bağırsak içeriği, 18. ve 21. saatlerde de mekonyum yerine sarı, yarı sıvı bağırsak içeriği bulunduğu görülmüştür. Bu durum mekonyumun normal buzağılara göre daha hızlı geçtiğinin kanıtıdır. (Otto ve diğerleri, 2011). JV ile enfekte edilmiş buzağuların ince bağırsak histopatolojisi resim 5'te gösterilmiştir.

Nebovirus prototipleri deneysel enfeksiyon sonucu ince bağırsağın ön yarısıyla sınırlı mukozal hasara, anoreksi, ishal ve ksiloz emilim bozukluğuna neden olur (Alkan ve diğerleri, 2015). Nebovirus Newbury agent 1 ile enfekte olmuş gnotobiyotik buzağılarda ise depresyon, anoreksi, maladsorbif ishal görülmüştür (Gomez ve Weese, 2017). Dışkı miktarında artış görülmüş ve mukozal hasar şiddetliyse tam enterosit kaybına kadar ilerlediği kaydedilmiştir (Oliver ve diğerleri, 2006). Virusun vücuda alınmasını takiben iki ila beş gün arasında ishal başlangıcı görülür (Guo ve diğerleri, 2018a). Bu süreçte dışkı ile virus atılımı pik seviyededir. Bu dönemde iştahta azalma ve dışkı, virus alımının 2. gününde kahverengi-sarıdan beyaz ishale döndüğü raporlanmıştır. İshal rengi 2-7 gün arası anormal seyretmiş ve ateş 39.2 °C'nin üzerine çıkmıştır (Dastjerdi ve diğerleri, 2000). Yeni doğanların Nebraska suşu ile enfeksiyonu, 3-4 günlük inkubasyon süresinden sonra daha noroviruslara göre daha uzun süreli ishale sebep olmuştur (Otto ve diğerleri, 2011). Enfeksiyondan üç gün sonrasında dahi ön ince bağırsak enterositlerin sitoplazmasında viral antijene saptanmıştır (Oliver ve diğerleri, 2006).

GIII.2 ile enfekte edilmiş gnotobiyotik buzağılarda akut uyuşukluk ve akut, aralıklı ve kalıcı ishal belirlenmiştir. Uyuşukluk sonraki günlerde giderek azalmıştır. İshalli dışkı gevşek ve bazen sulu, sarı, sarı-yeşil, renkli olup miktar olarak artmıştır. Dışkıda viral RNA'nın enfeksiyon başlangıcından bir veya iki gün sonra pik seviyede olduğu görülmüştür. Bazı buzağılarda dışkı saçılımı 20-30 güne kadar devam etmiştir. Ters transkripsiyon- Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile test edilen buzağı serumlarında düşük titrelerde viral RNA'ya rastlanmıştır. Gnotobiyotik buzağuların nebovirus ile deneysel enfeksiyonu jejunumda BNoV ile benzer lezyonlara neden olmuştur (Gomez ve Weese, 2017).



Resim 5. JV ile enfekte buzağılarda ince bağırsak morfolojisi. (A-C) enfeksiyondan 18-21 saat sonrası. (B-D) enfeksiyondan 4 gün sonrası (Otto ve diğerleri, 2011).

2.6. Tanı

Norovirusun tespiti ilk olarak 1972 yılında immunelektron mikroskopi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Virusların tespiti için dışkı örnekleri kullanılır (Scipioni ve diğerleri, 2008). İmmun elektron mikroskopi önceden teşhis için tercih edilen yöntemlerden biriydi. Bu yöntem çok hassas olmadığından yerini Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'ya bırakmıştır (Bank-Wolf ve diğerleri, 2010).

Elektronmikroskopi (EM); ilk kez norovirusların (NoV) keşfetmesini sağlamıştır. İmmuno-elektron mikroskop ve katı faz immuno-elektron mikroskop gibi bazı varyantları da vardır. Fakat teşhiste yeterli bir yöntem değildir çünkü yüksek viral yük gereklidir (dışkı gram başına >10⁶ parçacık) (Scipioni ve diğerleri, 2008). Bu yöntemin avantajı birden fazla viral patojeni tespit etme yeteneğine sahip olmasıdır. Ancak maliyetli, düşük verim ve duyarlılığa

sahiptir (Vinjé, 2015). Deneyimli personel gerektirdiği için rutin kullanımının zor olması diğer dezavantajlarından (Altay ve Aylin, 2012).

ELISA hayvanlarda bağışıklığın sağlanmasıyla üretilen hiperimmün serumların kullanıldığı yaygın bir immunassay yöntemidir. Baculovirus sisteminde bulunan NoV kapsid proteininin ekspresyonu fazla miktar VLP içerdiği için immunassayde antijen olarak kullanılır. EM'ye göre oldukça hassas yöntemdir. ELISA çok sayıda örneğin test edilmesi, hızlı ve basit olması gibi artıları vardır. Antikor tespiti antijen tespitine göre daha reaktiftir ve heterotipik NoV enfeksiyonunu tanımlamak için uygundur. Düşük özgüllüğe sahip olduğu için kullanım alanı sınırlıdır. NoV tarafından paylaşılan üç epitop vardır. Biri aynı genogruptan GI, GII-GIII arasında diğeri ise GI-GIII arasındadır. Bu keşifler ELISA'nın geliştirilmesinde önemli rol oynayabilir (Scipioni ve diğerleri, 2008).

İmmunokromatografik lateral akış testleri; özel ekipman gerektirmeyen, 15 dakika içinde sonucun alınabildiği pratik bir yöntemdir. Fakat hassasiyeti genel olarak %35-52 aralığında olup genogruba bağlı olarak değişkenlik göstermiştir (Vinjé, 2015).

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction); 1990'lı yılların ortalarına doğru geliştirilmiştir (Vinjé, 2015). Dışkıda norovirusların tespitinin hassasiyetini geliştirmek için kullanılmıştır. Bu yöntem oligonükleotid primeri olan RdRp geninin yüksek oranda korunmuş bölgesini ve ORF2 geninin başlangıcını, NTPaz/RNA helikaz (NS3) kodlama sekansını çoğaltma prensibine dayanmaktadır. BEC'lerin tespitinde rutin olarak kullanılır (Di Felice ve diğerleri, 2016). NoV'de genetik çeşitlilik fazla olduğu için NoV'lere özgü evrensel primer çifti oluşturmak imkansızdır. Ama yine de çoğu suşlar için genel primerler oluşturulmuştur ve bu primerlerin sürekli güncellenmesi gereklidir. Bu RT-PCR kullanılan en hassas yöntem olduğu için popülerliğini hala korumaktadır (Scipioni ve diğerleri, 2008).

Real time Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain (RT-qPCR); Gen tespiti ve kantitasyonu için son zamanlarda kullanılan en yaygın yöntemdir (Park ve diğerleri, 2009). Özgüllüğün ve duyarlılığın daha yüksek olması sebebiyle real time RT-qPCR daha fazla tercih edilmeye başlanmıştır. Agaroz jel elektrofez görüntülemesi gerektirmez. Birçok protokolda floresan etiketli oligonükleotid problemleri kullanılmaktadır. Real time RT-qPCR'da ters transkripsiyon ve cDNA amplifikasyonu tek bir reaksiyonda gerçekleştirilir. Böylece daha az örneğe ihtiyaç duyulur ve çapraz kontaminasyon riski de azalır. NoV genomunun genogruba özgü küçük bir bölgesi korunduğu için Real time RT-qPCR testleri ORF1-ORF2 bağlantı

bölgesini hedeflemektedir. Ayrıca viral yükü belirleyerek numunedeki nükleik asit miktarını ölçebilir (Vinjé, 2015).

SYBR Green real time RT-PCR; yöntemi diğer PCR testlerine oranla pozitifliğin daha kısa süre içinde tespit edilmesine ve miktarının tayininin daha doğru yapılmasına olanak sağlamıştır. Diğer PCR yöntemlerine kıyasla 100 kat daha düşük viral yüke sahip pozitif dışkı örneklerini tespit etmiştir. Yapılan bir çalışmada ishalleri buzağılardan toplanan 118 dışkı örneği real time RT-PCR, nested PCR ve SYBR Green real-time RT-PCR tekniğiyle analiz edilmiştir. Örnekler sırasıyla 9 (%7,6), 59 (%50) ve 91 (%77,1) şeklinde pozitif bulunmuştur. Böylece tek adımlı SYBR Green real time RT-PCR'ın diğer PCR yöntemlerine göre duyarlılık, özgüllük ve nicel doğruluk açısından daha üstün olduğu görülmüştür (Park ve diğerleri, 2009).

Son zamanlarda patojenik enterik virusların, bakterilerin ve parazitlerin eş zamanlı tespit edilebilmesi için farklı multi-gastrointestinal-patojen teşhis platformları geliştirilmiştir. FilmArray GI Panel, xTAG GPP, Verigene Enteric Pathogens Test gibi Food and Drug Administration (FDA) onaylı bu platformlar gastroenterit tanısı için kapsamlı moleküler teşhis testlerini temin etmektedir. Geniş spektrumlu patojen tespiti ve yaklaşık 2 ila 5 saat arasında testlerin sonuçlanması gibi avantajları vardır. Cihazda tek seferde yalnızca bir adet numunenin bakılması iş hacmi fazla olan laboratuvarlar için sorun teşkil etmektedir. Buna ek olarak karışık enfeksiyon ve gastrointestinal hastalıktan hangi etkenin sorumlu olduğunu belirlemek için gerekli verilerin olmaması durumunda çıkan sonuçların yorumlanması büyük bir sorunu oluşturmaktadır (Vinjé, 2015).

2.7. Bovine Enteric Calicivirüslerde Tedavi

Buzağılarda yetersiz bakım ve besleme, doğum öncesi annelerin bakımı, bağışıklığın düşmesi, çevresel faktörler özellikle soğuk mevsim koşulları ve kapalı, havasız ortamlar doğrudan hastalıkla ilişkilendirilir. Mevsimsel olarak farklılık göstermesine rağmen buzağılarda yıl boyunca hastalık seyredebilir (Hacıoğlu ve Alkan, 2018). Yenidoğan buzağı ishalleri çiftliklerde ölüme sebep olan önemli buzağı hastalıklarındandır. Ağırıklı olarak doğumdan sonraki ilk 4 hafta insidansı yüksektir. Buzağı ishallerinde ölüm oranının azalmasını etkileyen en önemli tedavi seçeneklerinden biri oral veya intravenöz sıvı tedavisidir. Dehidrasyon [%] × vücut ağırlığı [kg] formülü ile intravenöz (IV) uygulanacak sıvı miktar hesaplanır (Berchtold, 2009).

Dehidrasyon derecesi %8'den düşük, enoftalmia < 4 mm ise ve hala emme refleksi varsa oral rehidrasyon tedavisi uygulanır. Eğer ki dehidrasyon derecesi ≥ %8, enoftalmia ≥ 4 mm ve emme refleksi olmayan ishelli buzağılarda ise intravenöz sıvı tedavisine başlanmalıdır (Parlatır ve Yağcı, 2018). IV sıvı uygulaması dehidrasyonun şiddetine göre maksimum 80 mL/kg/saatlik hızla uygulanmalıdır. Bu değer 35 kg buzağı için maksimum 2,8 L/sa sıvı hacmine eşdeğerdir. Aşırı hidrasyon ve pulmoner ödemini önlemek için ortalama 30 ila 50 mL/kg/sa'lik infüzyon hızları kullanılır. Hipotermi IV tedavisi uygulanırken dikkat edilecek en önemli hususlardan biridir. Yaşamının ilk 24 saatinde emme refleksi olmayan, ishal ve dehidratasyon gözlenen buzağılarda hipotermi kaçınılmazdır. Özellikle soğuk hava dönemlerinde ve daha büyük sıvı hacim eksikliğinin olması hipotermiyi şiddetlendirebilir. Bu buzağılar ısı kaynağı bulunan bir bina içine taşınmalıdır. IV olarak verilecek olan sıvı hattı ısı lambası etrafına sarılabilir (Berchtold, 2009).

Antimikrobialerin kullanımı dehidrasyon, ateş, uyuşukluk gibi sistemik belirtileri gösteren buzağılarda endikedir. Bu durumda parenteral amoksisilin veya ampisilin (10 mg/kg, İM. her 12 saatte bir), sülfonamidler (25 mg/kg, IV veya IM. her 24 saatte bir) ve oral amoksisilin trihidrat (10 mg/kg her 12 saatte bir) kullanılabilir. İshale bağırsak krampları ve karın ağrısı eşlik edebildiği için etkili analjezi protokolü uygulanması önemlidir. Meloksikam (0,5mg/kg) ve flunixin meglumin (2.2mg/kg) gibi NSAID'lerin kullanımı ishelli buzağılarda başlangıç tedavi olarak önerilir. Parenteral elektrolit ve IV Meloksikam tedavisi sonucu buzağılarda yem alımını, hidrasyon skorunu ve dışkı kıvamını arttırdığı bildirilmiştir. Yüksek dozda ketoprofen (6 mg/kg, IV, 4 saat arayla iki kez) uygulaması ise buzağılarda dışkı çıkışının

azalttığı gözlemlenmiştir. Kortikosteroidler bağışıklık sistemini baskıladığı için kullanılması önerilmez (Constable, 2009).

Dehidrasyon derecesinin belirlenmesinde göz küresinin orbitraya çökme miktarı veya boyun ve göğüs bölgesindeki deri elastikiyetine bakılır (Tablo 3). Eğer laboratuvar imkanlarına erişim var ise plazma protein konsantrasyonunun belirlenmesi önerilmiştir (Parlatır ve Yağcı, 2018).

Tablo 3. İshalli buzağılarda dehidrasyon durumunun değerlendirilmesi (Parlatır ve Yağcı, 2018).

Dehidrasyon	Durum	Enoftalmia	Deri elastikiyeti (sn)
<5%	Normal	Yok	<1
6%-8% (hafif)	Hafif depresif	2-4 mm	1-2
8%-10% (orta)	Depresif	4-6 mm	2-5
10%-12% (şiddetli)	Komatöz	6-8 mm	5-10
>12%	Komatöz/Ölüm	8-12 mm	>10

Antiviral kullanımında ise hedef alınan enzim RdRp'dir. Bu enzimlerin replikasyon mekanizmasında anahtar role sahip olması ana hedef yapmıştır. RdRp inhibitörleri iki gruba ayrılır. Nükleosid analogları; gelişmekte olan RNA ipliğine dahil edildiklerinde RNA sentezi sonlanarak ölümcül mutasyona maruz kalırlar. 2CMC, ribavirin, favipiravir bu gruba örnektir. Nükleosid olmayan inhibitörler; RdRp'yi işlev görmeyecek alana bağlanmasına sebep olurlar. Suramin, NF023 ve PPNDS, NIC02 ve NIC04, JTK-109 bu gruba örnektir (Richard ve diğerleri, 2019).

2.8. Korunma/Kontrol

Noroviruslar; dünya çapında salgın ishal vakalarının önde gelen nedenleri arasındadır. Bu sebeple hızlı ve gelişmiş laboratuvar yöntemleri, temizlik, dezenfeksiyon protokolleri, izolasyon ve semptomlara göre hastaların gruplandırılması korunma ve kontrol açısından gereklidir (Vinjé, 2015). Sağlık bakım yerlerinde ve laboratuvarlarda yüzey dezenfeksiyonu için genellikle etanol tercih edilmiştir. İnaktivasyon için kullanılan alkol konsantrasyonu etanol için %70-%90 oranlarında ve bulunan yüzeye bağlı olarak (deri, çelik, plastik) 1-10 dk temas

halinde olmalıdır. Sodyum hipoklorit gibi serbest klor üreten ajanlarla ise 1000 ppm'i aşan, yaklaşık 30sn muamele edilmesi sonucu tamamen inaktive olduğu tespit edilmiştir (Nims ve Plavsic, 2013). Hidroalkolik solüsyonlarla eller yıkanmalıdır (De Rougemont ve diğerleri, 2010).

Caliciviruslar çevrede birkaç hafta bulaşıcı kalırlar, 60 °C sıcaklığa ve 10 ppm klorüre dayanıklıdır. İnaktivasyon için UV ışın veya y-radyasyonu kullanılır (Bank-Wolf ve diğerleri, 2010). MNV'nin %70'lik Etonal ile 30 sn muamelesi sonucu enfektivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Hall ve diğerleri, 2011). pH ile inaktivasyon, yüksek sıcaklık, etanol kullanımı ve yüksek klor konsantrasyonları virus titresini azaltmada başarılıdır (Bank-Wolf ve diğerleri, 2010). Norovirus gibi RNA viruslarının genetik evrimi göz önüne alınarak genomik dizileri düzenli olarak takip edilmelidir (Cho ve Yoon, 2014).

Şu ana kadar geliştirilmiş aşı bulunmamaktadır. Bunun en önemli nedeni görülen norovirus suşlarının rezervuarlarının belirlenmemiş olmasıdır (Karst ve Baric, 2015). Norovirusların yüksek heterojenliği ve norovirus bağışıklığının karmaşıklığı yani daha önceden maruz kalma ile değişken bağışıklık yanıtlarının karışması başka bir faktördür. Ancak tavşanların hemorajik hastalığına karşı aşı denemeleri başarılı olmuştur. Eksprese edilen rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) kapsid proteini ile aşılanan tavşan, yüksek humoral immun yanıt göstermiştir ve hastalığa karşı korunmuştur (Bank-Wolf ve diğerleri, 2010). Aşılama çalışmalarının önündeki diğer engeller ise; hastalık ile ilişkilendirilen suşların tümünü kapsayan bir aşı tasarımı bulmanın zorluğu, tanımlanmış koruyucu bağışıklık önlemlerinin eksikliği, hastalığın mekanizmasının anlaşılabilmesi için gerekli sağlam hayvan modellerinin eksikliği, kısa ve uzun vadeli bağışıklığın anlaşılabilmesidir (Donaldson ve diğerleri, 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Dışkı Örnekleri

Bu çalışmada; 2021-2022 yıl boyu Aksaray ilindeki küçük aile işletmelerinden ve yine aynı dönem aralık-şubat aylarında Aydın ilindeki bir çiftlikten toplam 103 ishali buzağıdan dışkı örnekleri toplandı. Aksaray ilinde 1-30 baş kapasiteli, 38 farklı küçük aile işletmesinden 8 aylık yaştan küçük ishal klinik belirtisi gösteren buzağılardan toplam 71 dışkı örneği alındı, Aydın ilinde ise 400 başlık ishal vakası görülen bir çiftlikten 7gün - 3 yaş aralığındaki 32 adet sığırdan örnekler toplandı. Örneklerin toplanması esnasında hayvan sahibine bilgi verilmiş olup, hayvanların kulak numarası, cinsiyet, doğum tarihi, yaş, ırk, genel klinik bulgular, hayvan sahibi ve adres bilgileri kayıt altına alınarak, TÜRKVET sisteminden kontrolü yapıldı. Çalışmada deney hayvanı kullanılmaması sebebiyle Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından Etik kurul izninin gerekli olmadığı bildirildi (EK HADYEEK)

Çalışmada kullanılan dışkı örnekleri buzağılardan toplanarak steril tüplere aktarıldı. Termal kutu ile taşınarak laboratuvara gönderilene kadar -20°C’de depolandı. Örnekler, BNoV ve BNeV yönünden incelenmesi amacıyla Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’na soğuk zincir ile ulaştırıldı ve test edilene kadar -80°C’de (Nüve 460, Türkiye) saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Dışkı Örneklerinin Hazırlanması

Toplanan dışkı örnekleri, 100ml steril distile su ile 1 tablet PBS (Amresco, Ohio, United States) oda sıcaklığında homojenize edildi. Hazırlanan PBS'e Antibiyotik karışımı; 100 U/mL Pen-Strep-Ampho.B Solution (Biological Industries, Israel) ilave edildi. Toplanan örnekler steril eppendorf tüpünde 1:10 oranında dilue edilerek 10sn vortexlendi (Nüve, Türkiye). Ardından +4 °C'de 1 saat beklemeye bırakıldı. Bu süre sonunda mini santrifüj (Alfagen, Türkiye) cihazında 3.000 devirde 3 dk santrifüj edildi ve hemen sonrasında RNA ekstraksiyon işlemine geçildi.

3.2.2. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Çalışmada, dışkı örneklerinden BNoV ve nebovirus varlığını tespit etmek amacıyla nested Reverse Transkripsiyon-Polymerase Chain Reaction (nRT-PCR) yöntemi kullanıldı. Öncelikle hazırlanan dışkı örneklerinden viral RNA'nın elde edilmesi için klasik Fenol-Kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Fenol Kloroform ekstraksiyon yöntemi aşağıdaki şekilde uygulandı.

- 400 µl solüsyon D steril eppendorf tüplere eklendi, üzerine santrifüj edilmiş süpernatantın üst kısmından 400 µl alınarak aynı tüpe ilave edildi ve 15 sn vortekslendi (Nüve, Türkiye).
- Ardından 300 µl asit fenol karışımı (alt tabakadaki berrak kısımdan alınır) ve 300 µl kloroform eklenerek 15 sn vortekslendi. Hazırlanan numunenin üzerine 100 µl 3M Na asetat eklenerek 12.000 ppm'de 10 dk santrifüj edildi (Beckman Coulter allegra X-22, Almanya).
- Yeni steril eppendorf tüplerine 700 µl izopropil alkol (-20°C'de saklanır) eklendi. Santrifüjleme sonrası elde edilen süpernatanttan 700 µl alınarak bu tüplere ilave edildi ve ardından 15 sn vortexlendi.
- Oluşan karışım nükleik asit presipitasyonu için -80°C'de 1 gece bekletildi.

- Bu süre sonunda karışımın oda sıcaklığında çözünmesi beklendi ve hemen ardından 12.000 ppm'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Bu işlem sonunda santrifüj yönüne göre tüp içerisindeki sıvı yavaş yavaş aspire edildi ve tüp dibine çöken pellet üzerine 300 µl %70'lik etanol eklenerek 12.000 ppm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Böylece tüp dibindeki pellet belli belirsiz görülür hale geldi. Tüp içerisindeki etanol aspire edildikten sonra etüvde (Nüve, Türkiye) 37°C'de kurutuldu.
- Kurutulan pelet 20 µl distile su ile resüpanse edilerek ekstraksiyon işlemi tamamlandı ve tekrar kullanılacak zamana kadar -80°C'de saklandı.
-

3.2.3. Viral RNA'nın Reverse Transkripsiyonu

Ekstrakte edilen viral RNA'dan DNA kopyası (cDNA) elde etmek amacıyla ticari RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) kullanıldı. İki aşamadan oluşan cDNA sentezinde; ilk aşamada 3 µl nuclease-free su, 0,5 µl Random Hexamer primer (100 µM), 3 µl RNA ekstraktı içeren karışım hazırlanarak ısı döngü cihazında (Miulab, Zhejiang, Çin) 65 °C'de 5 dk işlem uygulandı. Ardından cihaz 15 °C'ye indirilerek ikinci aşamaya geçildi. Bu aşamada 2 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 0,5 µl RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) hazırlanarak örneklerin üzerine eklendi. Reverse transkripsiyon işlemi ile cDNA elde edilmesi için Thermal cyclerda programlanan sıcaklık ve zaman bilgileri ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. cDNA sentezi için uygulanan sıcaklık ve zaman

Sıra		Sıcaklık(°C)	Zaman (dk)
1	1. Aşama	65	5
2		15	∞*
3		25	5
4	2. Aşama	37	60
5		70	5
6		18	5

* 2. Aşamaya kadar

3.2.4. Nested PCR

BNoV tespiti için RdRp gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak nested PCR tanı yöntemi uygulandı. Biyogüvenlikli kabin (Nüve MN 120, Türkiye) içerisinde ilk aşamada tablo 6’te değerleri verilen miktar ve ürünlerle RdRp bölgesini hedef alan CBECU-F/R primeri (Oligomer, Türkiye) kullanılarak PCR (Miulab PR-96E Gradient Thermal Cyclers, Çin) yapıldı. İkinci aşamada ise yine Tablo 6’daki verilerle birlikte nCBECU-F/R primeri (Oligomer, Türkiye) kullanılarak nested-PCR uygulandı. BNeV’lerin tespiti için ise yine RdRp bölgesi için tasarlanmış olan NBU-F/R primeri (Oligomer, Türkiye) ve nNBU-F/R primeri (Oligomer, Türkiye) kullanılarak nested-PCR uygulanmıştır.

Tablo 5. PCR Testinde Kullanılan Primerler

Primer adı	Primer dizilimi (5’-3’)	Ürün (bp)	Referans
CBECU-F	AGT TAY TTT TCC TTY TAY GGB GA	532	Smiley ve ark. (2003)
CBECU-R	AGT GTC TCT GTC AGT CAT CTT CAT		
nCBECU-F	GTC GACGGY CTK GTS TTC CT	327	Park ve ark. (2006)
nCBECU-R	CAC AGC GAC AAA TCA TGA AA		
NBU-F	TTT CTA ACY TAT GGG GAY GAY G	549	Smiley ve ark. (2003)
NBU-R	GTC ACT CAT GTT TCC TTC TCT AAT		
nNBU-F	CGC TCC GTG TGG GAT CAC GA	194	Park ve ark. (2006)
nNBU-R	GCA CGG GCT TCT TCT AGA GA		

Tablo 6. PCR protokolü

Ürün	Miktar (µl)	Termal Döngü Sıcaklık Zaman Döngü sayısı
Distile su (nuclease-free)	14	94 °C - 5dk
10x DreamTaq Buffer (20 mM MgCl ₂ içerir)	2	
MgCl ₂ (25 mM)	0,25	94 °C-1dk
dNTPmix (10 mM)	0,5	55 °C-1dk. 35döngü
Primer-F	0,5	72 °C-1dk
Primer-R	0,5	72 °C - 10dk
Dream Taq 5 U/ µl	0,25	
Ekstrakt	2	18 °C - 5dk

3.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Thermal cycler'daki PCR işlemi sonrası ürünlerini görüntülemek için öncelikle agaroz jel hazırlığı yapıldı. %1,5'lik agaroz jel hazırlamak için öncelikle toz agardan (Prona, EU) hassas tartıda 1,5 gr agaroz tartıldı. Isıya dayanıklı beherglas içerisine 100 ml 0,5X Tae (Tris-Asetik Asit-Ethylen Diamin Tetra Acetic Asit (EDTA)) ve üzerine 1.5gr toz agaroz eklendi. Ardından beherglas ısıya maruz bırakılarak (mikrodalga fırın, Beko, Türkiye) agarozun tamamen çözünmesi sağlandı. Hazırlanan jelin soğuması için bir süre beklendi. Ardından 5 µl SafeView (Hibrogen, Türkiye) eklenerek jel tarakları takılı olan jel taşıyıcısına aktarıldı. Yaklaşık 3 saat içerisinde tamamen kuruyan jelden jel tarakları dikkatlice çıkarıldı ve yürütme tankına (Major Science Mini 300, Tayvan) aktarıldı. Üzerini 0,5 cm geçecek kadar 0,5X Tae eklendi.

İlk göze 100bp'lik marker (ThermoFisher 100bp plus, MA, USA) ürünün büyüklüğünün belirlenebilmesi için 3 µl konuldu. 1 µl 6x loading dye (Thermo Scientific) ve 5 µl pcr örnekleri parafin bant üzerinde pipetaj edilerek yürütülecek olan gözlere konuldu. Ardından 100 Volt/cm'de 30 dk akıma maruz bırakıldı. İşlem sonunda mavi ışık jel görüntüleme cihazında (BLook, GeneDirex, Tayvan) pozitif-negatif kontroller ve merdiven ilerlemesi göz önünde bulundurularak örnekler değerlendirildi.

3.2.6. Sekans Analizi

PCR işlemi sonucunda pozitif olduğu belirlenen 8 adet örneğin PCR ürünlerinin nükleik asit dizileme işlemi ticari bir firmadan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Sekans analizi Sanger Dideoxy Sequencing metodu kullanılarak yapıldı.

3.2.7. Sekans sonuçlarının Filogenetik Analizi

Sekans analizinden gelen sonuçlardaki ham verilerin kontrolleri (Raw Data) FINCH TV isimli bilgisayar programı ile yapıldı. Finch TV'de temizlenen nükleotit dizileri BLAST programı kullanılarak GenBank veritabanında paralellik gösteren referans sekans taraması yapıldı. Filogenetik ağacın yapılması için 24 adet GIII genogrubuna ait sekans GenBank'tan indirildi. Referans sekanslar ve elde edilen sekanslar MEGA 6 programında multiple alignment (Clustal W) işlemine tabii tutuldu. MEGA 6 programında Neighbor Joining metod ve 1000 bootstrap tekrar ile filogenetik ağaç elde edildi (Şekil 5) (Tamura ve diğerleri, 2013).

Filogenetik ağaçlandırma - Evrimsel tarih, Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak çıkarıldı. Dal uzunluğu toplamı = 0.83256295 olan optimal ağaç gösterilmektedir.

Ön yükleme testinde (1000 kopya) ilişkili taksonların bir arada kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi, dalların yanında gösterildi. Ağaç, filogenetik ağacı anlamak için kullanılan evrimsel mesafelerle aynı birimlerde dal uzunlukları ile ölçeğe göre çizildi. Evrimsel mesafeler, maksimum bileşik olabilirlik yöntemi kullanılarak hesaplandı ve bölge başına baz ikamesi sayısı birimindedir. Analiz 27 nükleotid dizisini içeriyordu. Boşluk ve eksik veri içeren tüm pozisyonlar elendi. Nihai veri setinde toplam 276 pozisyon vardı. Evrimsel analizler MEGA6 programı ile yapıldı (Tamura ve diğerleri, 2013).

3.2.8. İstatistiksel Değerlendirme

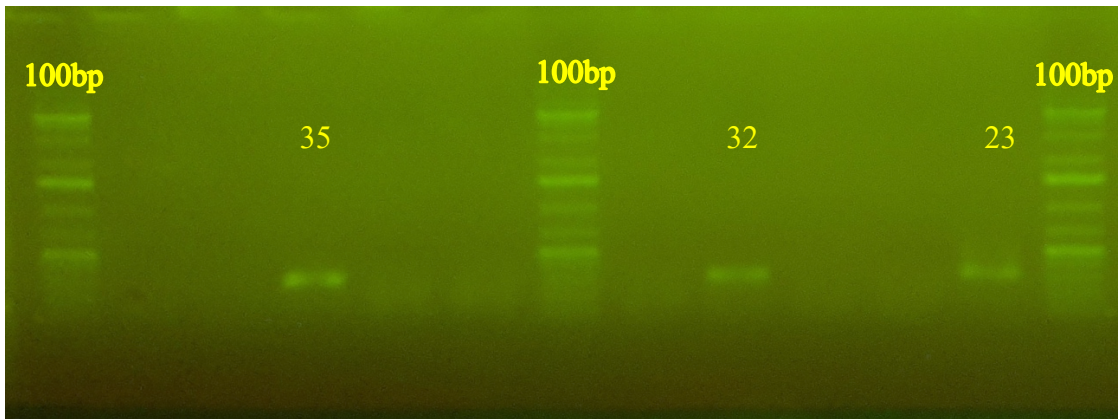
Aksaray ve Aydın illerindeki sığırlarda yaş, cinsiyet, ırk, ve mevsimlere göre pozitiflik ve negatiflik yönünden istatistiksel karşılaştırmaları için χ^2 (Ki-kare; Chi-Square) testi

kullanıldı (Steel ve Torrie, 1980). İstatistiksel analizler SPSS (Statistical package for social sciences) paket programı kullanılarak yapıldı (Özdamar, 2004). Ki- kare testinde P değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel yönden anlamlı sonuç olarak değerlendirildi.

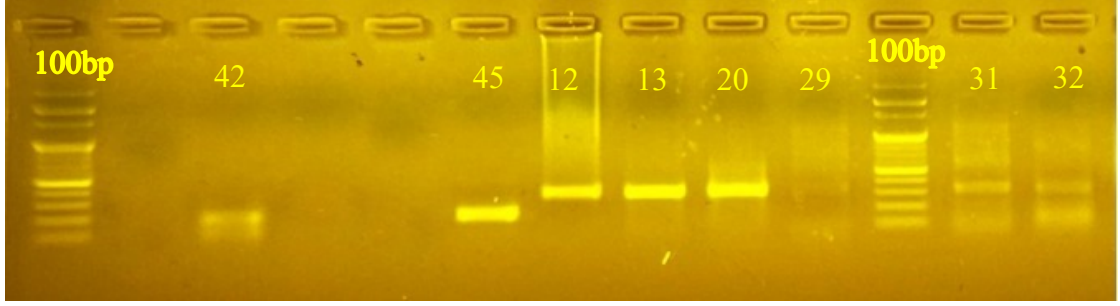
4. BULGULAR

Çalışma kapsamında, Aksaray ilinde bulunan 38 farklı küçük aile işletmesinden toplam 71 adet numune, Aydın ilinde ise 400 baş kapasiteli bir çiftlikten 32 adet olmak üzere toplam 103 adet buzağı ve sığırlardan örnekler toplandı. Bu örnekler RdRP gen bölgesini hedefleyen CBECU-F/R (532bp), nCBECU-F/R (327bp) ve NBU-F/R (549 bp) ve nNBU-F/R (194bp) primerleri kullanılarak nested PCR tanı yöntemi uygulandı. Çalışmada toplanan 103 numunenin 28 (%27,1) tanesinde BEC'ler tespit edildi. Bu örneklerin 26 tanesi (%25,2) BNoV (Tablo 7), 2 (%1,9) tanesi ise nebovirus yönünden pozitif olarak belirlendi (Tablo 8). Aydın bölgesinde, ishal salgını bulunan bir çiftlikteki 32 adet ishallerli hayvandan alınan örneğin 23 tanesi (%71.8) BNoV pozitif bulundu. Aksaray bölgesinden toplanan 71 numunenin 3 tanesi (%4.2) BoNV, 2 tanesi (%2.8) ise nebovirus yönünden pozitif olarak saptandı. Aksaray ilinde BNoV pozitif bulunan 3 örnek farklı çiftliklere aitti. Örnek toplanan hiçbir buzağıda ölüm görülmedi. Aydın ilinde işletme veteriner hekiminden alınan anamnezde hayvanların bakım ve hijyenin yetersiz olduğu ve hayvanların sağlık durumlarının iyi olmadığı, örnek alınan pozitif hayvanlarda hiç ölüm görülmediği, yapılan testlerde hayvanlarda bovine coronavirus (*BCoV*) tespit edilmediği *Cryptosporidium spp.* tespit edildiği belirtilmiştir. Her iki ilde örnek alınan tüm buzağuların kolostrum aldığı hayvan sahipleri tarafından bildirildi.

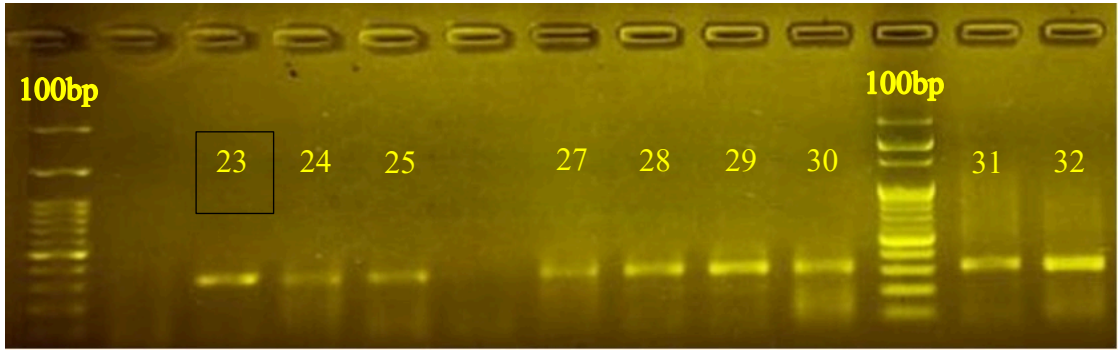
4.1. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroförezinde Görüntüsü



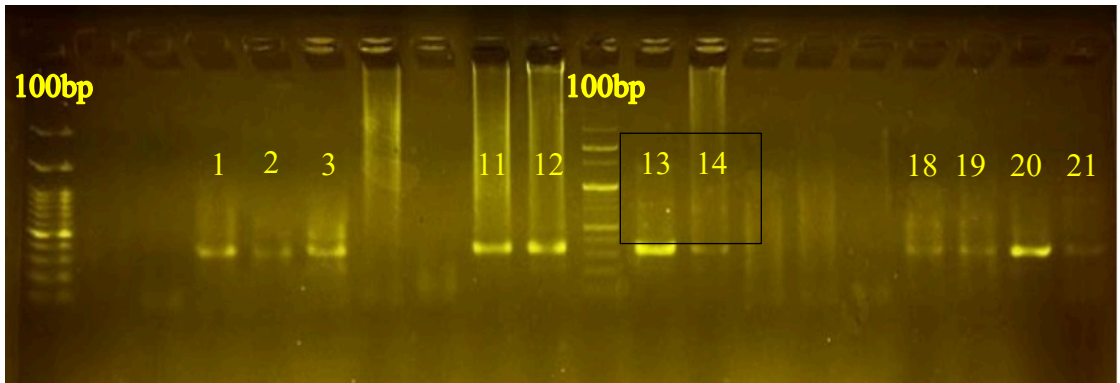
Resim 6. Aksaray ili Norovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıktaki görüntüsü.



Resim 7. Aydın Norovirus örnekleri-Akarav Nebovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıkta görüntüsü (örnek no: 42-45 nebovirus pozitif).



Resim 8. Aydın Norovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıkta görüntüsü.



Resim 9. Aydın Norovirus PCR ürünlerinin elektroforez sonrası mavi ışıkta görüntüsü.

4.2. İllere Göre Pozitiflik Oranları

Akarav ve Aydın illerindeki tüm örneklerde %25,2 oranında BNoV yönünden pozitiflik bulundu. Akarav ilinde %4,2 oranında, Aydın ilinde ise %71,8 oranında pozitiflik tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7. Aydın ve Aksaray bölgesindeki BNoV pozitiflik oranları.

Şehir	n	Pozitif	%
Aydın	32	23	71.8
Aksaray	71	3	4.2
Toplam	103	26	25.2

n: test edilen hayvan sayısı. pozitif: pozitif hayvanların sayısı

Aksaray ve Aydın illerine toplanan tüm örneklerde BNeV pozitiflik oranı %1,9 olarak hesaplandı. Aksaray ilinde %2,8 oranında nebovirus pozitif olarak tespit edilirken, Aydın ilindeki tüm örnekler nebovirus yönünden negatif bulundu.

Tablo 8. Aydın ve Aksaray bölgesindeki nebovirus pozitiflik oranları.

Şehir	n	Pozitif	%
Aydın	32	0	0
Aksaray	71	2	2.8
Toplam	103	2	1.9

n: test edilen hayvan sayısı. pozitif: pozitif hayvanların sayısı

4.3. Yaşlara Göre Pozitiflik Oranları

Çalışmada örneklenen tüm sığırlarda pozitiflik oranlarının 6 ay üzeri hayvanlarda arttığı görüldü (Tablo 9 ve 10). Aksaray ve Aydın illerindeki örneklenen hayvanların yaşlara göre pozitiflik oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olduğu görüldü (Tablo 9). Ancak Aydın ilindeki sığırlarda yaşlara göre pozitiflik oranları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 10).

Tablo 9. Aksaray ve Aydın illerindeki tüm sığırlarda yaşlara göre BNoV pozitiflik oranları.

Yaş	n	Pozitif	%	χ^2
0-1 ay	52	8	16	29,89
1-6 ay	28	3	10,7	
6ay-1 yıl	11	8	72,7	
1-3 yaş	11	7	63,6	

n: test edilen hayvan sayısı. pozitif: pozitif hayvanların sayısı. χ^2 : Ki-kare testi sonucu. p-Değeri: 0,00000146

Tablo 10. Aydın ilindeki sığırlarda yaşlara göre BNoV pozitiflik oranları

Yaş	n	Pozitif	%	χ^2
0-1 ay	14	7	50	6,69
1-6 ay	1	1	100	
6ay-1 yıl	8	8	100	
1-3 yaş	9	7	77.78	

n: test edilen hayvan sayısı. pozitif: pozitif hayvanların sayısı. χ^2 : Ki-kare testi sonucu. p-Değeri: 0,0722.

4.4. Irklara Göre Pozitiflik Oranları

Aksaray ve Aydın illerinde ırklara göre pozitiflik oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı. En düşük pozitiflik oranının simental ırkı sığırlarda olduğu gözlemlendi (Tablo 11).

Tablo 11. Aksaray ve Aydın ili BNoV pozitif ırklara göre oranları

İrk	n	Pozitif	%	χ^2
Holstein	46	13	28,2	26,21
Simental	44	4	9,09	
Montofon	6	4	66,6	
Norveç kırmızısı	3	3	100	
Montbeliarde	2	2	100	

n: test edilen hayvan sayısı. pozitif: pozitif hayvanların sayısı. χ^2 : Ki-kare testi sonucu. p-Değeri: 0,0000286.

4.5. Cinsiyete Göre Pozitiflik Oranları

Örneklenen tüm sığırlarda cinsiyete göre pozitiflik oranlarının istatistiksel karşılaştırılmaları sonucunda anlamlı bir farklılık tespit edildi ($P<0,005$). Çalışmada, dişilerde %33,3 oranında BNoV yönünden pozitiflik saptanırken, bu oran erkeklerde %13,1 olarak bulundu (Tablo 12).

Tablo 12. Aksaray ve Aydın ili BNoV pozitif cinsiyete göre oranları

Cinsiyet	n	Pozitif	%	χ^2
Dişi	64	21	33,3	
Erkek	39	5	13,1	4,05
Toplam	103	26	25.2	

n: test edilen hayvan sayısı. pozitif: pozitif hayvanların sayısı. χ^2 : Ki-kare testi sonucu. p-Değeri: 0,0442.

4.6. Dizi Analizi

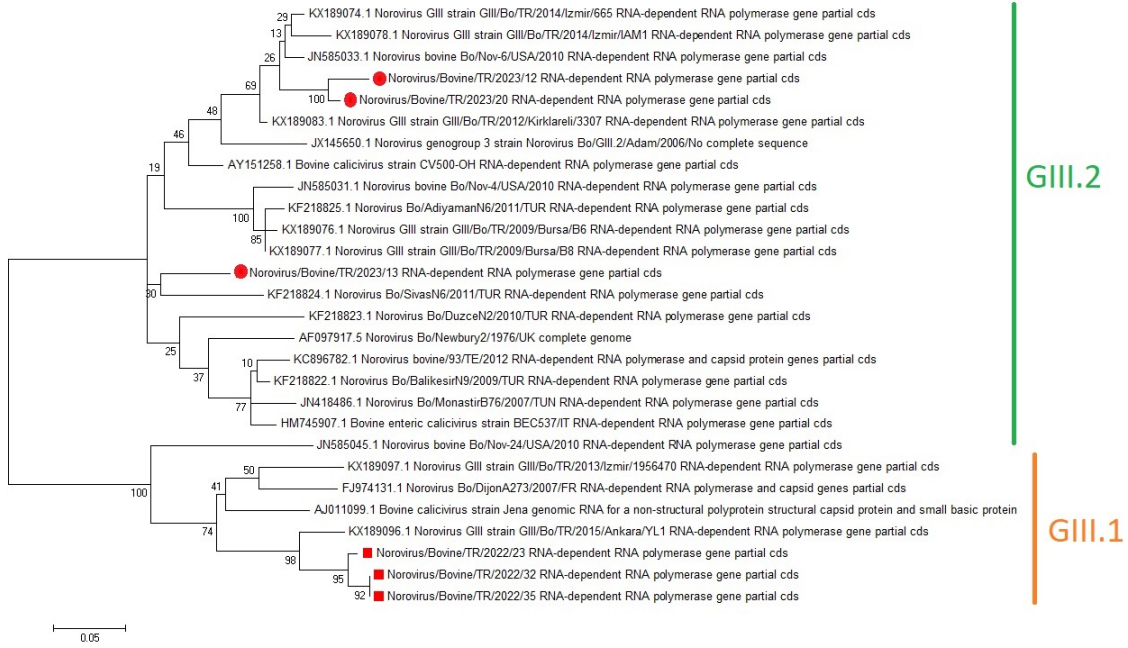
BNoV için pozitif olarak tespit edilen örneklerden seçilen 3 adet Aydın ve 3 adet Aksaray örneğinin PCR ürünleri sekanslanarak alınan veriler değerlendirildi. Nebovirus pozitif olan 2 adet örneğin PCR ürününün dizi analiziyle nebovirus olduğu teyit edilmiş oldu. 194 baz büyüklüğünde olan bölgenin dizi analizleri Nebraska suşu ile yakınlıklarının olduğu göstermekteydi. Ancak elde edilen hedef bölgenin kısa olması dolayısıyla filogenetik değerlendirmeye alınmadı.

Aksaray ve Aydın ilinde saptanan sığır Noroviruslarının Neighbor-Joining unrooted filogenetik ağacı Şekil 5’de gösterilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen Aksaray virusları “■” işareti ile, Aydın virusları ise “●” işareti ile belirtilmiştir.

Dizi analizi sonuçlarına göre Aksaray’da bulunan suşların GIII.1 olduğu saptandı. Aksaray suşlarının kendi aralarında ve GIII.1’in prototip virusu olan Bo/Jena/80/DE ile nükleotit benzerlik ve farklılık oranları filogenetik ağaç öncesi BLAST ile saptandı. Buna göre Aksaray’da tespit edilen suşların RdRp gen bölgesinin kısmi dizinleri bakımından nükleotit benzerlik oranı %98-100 arasında iken, GIII.1 referans suşu olan Bo/Jena/80/DE ile olan nükleotit benzerlik oranı %86,62-86,97 olarak saptandı.

Aydın ilinden alınan ve sekanslanan 3 adet örneğin BNoV genotip GIII.2 grubunda olduğu görüldü. Filogenetik ağaçta, Aydın örneklerinden bir tanesinin (Örnek No:13: Norovirus/Bovine/TR/2023/13) diğer iki örnekten (Örnek no: 12: Norovirus/Bovine/TR/2023/20 ve 20: Norovirus/Bovine/TR/2023/12) ayrı bir dalda yer aldığı görüldü. Aynı dalda bulunan iki virusun (Örnek no:12 ve 20) ABD’de elde edilen norovirus referans sekanslara yakın olduğu tespit edilirken, farklı bir dalda bulunan örnek sekansının

(Norovirus/Bovine/TR/2023/13 RNA-dependent RNA polymerase gene partial cds), Türkiye’de Sivas ilinden elde edilen sekansa yakınlık gösterdiği belirlendi. Aydın’da tespit edilen suşların RdRp gen bölgesinin kısmi dizilimleri bakımından kendi aralarındaki nükleotit benzerlik oranları 12 ile 13 arasında %83,55, 13-ile 20 arasında %84,88 ve 12 ile 20 arasında ise %94,22 iken, ABD’den elde edilen referans sekanslara yakınlık gösterdiği saptandı.



Şekil 5. Aksaray ve Aydın ilinde saptanan Bovine Norovirusların Neighbor-Joining unrooted filogenetik ağacı. “■” Aksaray örnekleri, “●” Aydın örnekleri .

5. TARTIŞMA

Buzağı ishalleri günümüzde özellikle büyük işletmelerde yüksek ekonomik kayıplara sebep olabilen, buzağılarda gelişim geriliğinden ölüme kadar giden bir klinik tablo sergileyebilir. Bu tablo göz önüne alındığında Türkiye’de BEC’ler üzerine yapılan araştırmaların ve bilimsel verilerin mücadele, koruma ve kontrol önlemlerinin alınabilmesi için artırılması gerekmektedir. Türkiye’de BNoV 2011 yılından itibaren araştırılmaya başlanmıştır (Yılmaz ve diğerleri, 2011). Ülkemizdeki BNoV ve neboviruslar üzerine yapılan çalışmaların çok uzun bir geçmişe dayanmaması sebebiyle yapılan çalışmalar çok azdır ve noroviruslar ile ilgili moleküler virolojik, serolojik, epizootiyolojik, patolojik ve klinik bilgiler sınırlıdır. Norovirusların rutin teşhis prosedürlerine dahil edilmemesi hala virusun epizootiyolojisinin belirsizliğini korumasına sebep olmaktadır. Bovine norovirusların ve nebovirusların rutin teşhis içerisinde yer almaması, spesifik tedavinin ve aşının olmayışı, bu virüslere karşı koruyucu önlemlerin alınamamasına neden olmaktadır.

Bu çalışmada Aksaray ve Aydın illerinde bulunan yerleşik işletmelerde klinik olarak ishal görülen buzağı ve erişkin sığırlardan alınan örneklerde bovine norovirus ve nebovirus RT-PCR ile virolojik olarak araştırıldı. Çalışmada 2021-2022 yılları arasında toplanan tüm örneklerde BEC için %27.1 (28/103) oranında pozitiflik bulundu. Tüm örneklerin %25,2’sinde (26/103) BNoV, %1,9’unda (2/103) ise nebovirus tespit edildi. Aksaray ilinden toplanan örneklerde BNoV %4,2 (3/71) oranında BNoV ve nebovirus ise %2,8 (2/71) oranında bulundu. Dizi analizleri sonuçlarına göre, Aksaray örneklerinde tespit edilen BNoV’lerin Jena virus suşunun temsil ettiği Genotip III.1 grubu içerisinde ve nebovirusların ise Newbury agent 1 suşunun temsil ettiği grup içerisinde olduğu belirlendi. Aydın ilindeki bir çiftlikten toplanan örneklerde ise %71,8 (23/32) oranında BNoV tespit edilirken nebovirusa rastlanılmadı. Aydın örneklerinden seçilen 3 adet BNoV’un Newbury agent 2 suşunun temsil ettiği Genotip III.2 grubunda olduğu saptanmıştır.

Türkiye genelinde yapılan çalışmalarda Yılmaz ve diğerleri (2011) Marmara bölgesindeki farklı işletmelerden yaşları 1-60 günlük olan 70 ishalleri buzağı dışkı örneğinin %8,5’inde BNoV GIII.2 yönünden pozitiflik bulmuşlardır. Gülaçtı ve diğerleri (2016) tarafından Adıyaman, Balıkesir, Düzce, Sivas illerinde %1,7 (4/235) oranında BNoV GIII.2 yönünden pozitif bulunmuştur. Turan ve diğerleri (2018) Malatya ve Elazığ illerinde 1 aylıktan

küçük ishallerden alınan örneklerde %3,93 (5/127) oranında BNoV GIII.2 suşu yönünden pozitiflik tespit etmişlerdir. Hacıoğlu ve Alkan (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ise 1 ila 7 günlük yaştaki ishallerden alınan örneklerde Aksaray, Kırklareli, Eskişehir, Şanlıurfa, Ankara, Bursa, İzmir, Çankırı illerinde %33,5 oranında BNoV yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. Moleküler analiz için tesadüfi seçilen 34 BNoV pozitif örnekte 9'u (%26,5) GIII.1 suşuna, 25'i (%73,5) ise GIII.2 suşuna ait olduğu saptanmıştır. Konya'da kesimhaneye sevk edilen cinsiyet ve klinik belirtiler farketmeksizin 2-5 yaşındaki sığırlarda oranında pozitiflik bulunmuştur (Dik ve diğerleri, 2023). Bu çalışmada genel olarak elde edilen %25,2 BNoV pozitiflik oranı, Türkiye'de yapılan çalışmalara göre daha yüksek bulundu. Ancak, Hacıoğlu ve Alkan (2019) tarafından bildirilen verilere göre bu çalışmanın oranlarının düşük olduğu görülmektedir.

Hacıoğlu ve Alkan (2019) yaptıkları bir çalışmada Aksaray ilinden 1100, 1445, 3909 baş kapasiteli işletmelerden topladığı 17 ishallerden 14 örneğinin %82,3'ünü BNoV yönünden pozitiflik tespit etmişlerdir. Türkiye'deki bovine norovirus prevalansı aile çiftliklerine oranla ticari mandıra çiftliklerinde daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak hayvan sayısının fazlalığı ve diğer patojenlere karşı rutin aşılamanın olabileceği öne sürülmüştür (Hacıoğlu ve Alkan, 2019). Bu çalışma kapsamında Aydın ilinden 400 baş kapasiteli bir işletmeden alınan örneklerde %71,8, Aksaray'dan küçük aile işletmelerinden toplanan örneklerde %4,2 pozitiflik bulunmuştur. Pozitifliğin büyük çoğunluğunu Aydın ilindeki çiftlikten toplanan örneklerin oluşturması BNoV'lerin işletmelerde yüksek oranda görülmesi ile tutarlılık sağlamıştır. Bunun sebeplerine ek olarak hayvan sayısının fazlalığı ve diğer patojenlerin varlığı bulaşma hızını ve oranını arttırdığı söylenebilir. Mevcut mix enfeksiyonlar sonrası hayvanların immun sistemini zayıflatarak hastalığa daha açık hale getirmektedir. Bakım ve hijyen yetersizliği hayvanda kondisyon kaybına ve işletmedeki diğer hastalıkların varlığını tetiklemektedir. Bu durum salgının ve ishal vakalarının artışına sebep olmaktadır. Aksaray ilinde BNoV vakaları her çiftlikte tek tek görülürken, Aydın ilindeki bir çiftlikteki ishal salgınında %71,8 oranında pozitiflik saptanması virusun primer ve önemli bir ishal etkeni olarak rol oynayabileceğini göstermektedir. Aydındaki 32 örnekte 9 tanesinin negatif bulunmasının nedeni hastalığın iyileşme safhasında olması, viral yükün az miktarda bulunması veya yapılan test tekniği ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bovine norovirus NB2 suşunu salgın potansiyeline sahip olması buzağuların gelişimi, ineklerin süt veriminden kızgınlık dönemine kadar uzanan hayvanların verimliliği açısından büyük bir risk faktörü olabileceği için işletmelerde büyük ölçekli ekonomik kayıplar kaçınılmaz olacaktır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar ve literatür bilgileri doğrultusunda Türkiye'deki sığırlarda norovirusların yaygınlaştığını veya araştırmalar arttıkça sanılanın aksine sığırlarda ishal etkeni olarak daha fazla önem kazandığı çıkarımı yapılabilir. Nitekim Aydın ilindeki bir çiftlikte saptanan BNoV salgını vakası ile ilk kez Aydın ilinde de BNoV varlığı saptanmış oldu.

Dünya genelinde yapılan çalışmalara bakıldığında Tunus, Çin, Mısır ve İsveç'te sırasıyla, (%16,6), (%20,4), (%27,6), (%20) pozitiflik oranları saptanmış olup bu çalışmadaki sonuçlara benzerlik göstermektedir (Hassine-Zaafrane ve diğerleri, 2012; Mohamed ve diğerleri, 2018; Trávén ve diğerleri, 2022; Wang ve diğerleri, 2019). Buna karşılık Norveç'te (%49,3 ve %50,3), İran'da (%39,5) bildirilen oranlardan daha düşük iken, Arjantin (%3,33), Belçika (%7,5) ve İngiltere'den (%11) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ferragut ve diğerleri, 2016; Jor ve diğerleri, 2010; Mauroy ve diğerleri, 2009; Milnes ve diğerleri, 2007; Pourasgari ve diğerleri, 2018). Pozitiflik oranlarında değişkenlik görülmesinin sebebi olarak; uygulanan test yöntemi, örnek alma stratejisi, coğrafi konum, hayvanların kolostrum alımı, buzağuların tek veya çoklu bölmede tutulması, primer hassasiyeti gibi faktörleri olduğu tespit edilmiştir (Ferragut ve diğerleri, 2016; Trávén ve diğerleri, 2022). Bu çalışmada yukarıda bahsedilen faktörlere hayvanların genel kondüsyonu, bakım, besleme ve sağlık durumlarının da eklenebileceği gözlemlendi. Ayrıca ırk, yaş ve cinsiyetin enfeksiyonun görülme sıklığı üzerinde etkili olabileceği düşünülebilir.

Dizi analizi sonuçlarına göre Aksaray'da bulunan suşların GIII.1 olduğu saptandı. Aksaray'da tespit edilen suşların RdRp gen bölgesinin kısmi dizinleri bakımından kendi aralarındaki nükleotit benzerlik oranı %98-100 iken, GIII.1 referans suşu olan Bo/Jena/80/DE ile olan nükleotit benzerlik oranı %86,62-86,97 olarak belirlendi.

Aydın ilinden alınan ve sekanslanan 3 örneğin, genotip GIII.2 grubu içinde olduğu tespit edildi. Filogenetik ağaçta, Aydın örneklerinden bir tanesi (Örnek No:13) diğer iki örnekten ayrı bir dalda olduğu görüldü. Aynı dalda bulunan iki virusun ABD'de elde edilen norovirus referans sekanslara yakın olduğu belirlenirken, farklı bir dalda yer alan örnek sekansı ise Türkiye'de Sivas ilinden elde edilen sekansa yakınlık gösterdiği belirlendi. Aydın'da tespit edilen suşların RdRp gen bölgesinin kısmi nükleotid dizilimleri bakımından kendi aralarındaki benzerlik oranları %83,55, %84,88 ve %94,22 olarak tespit edildi.

Aynı işletmeden elde edilen örneklerden birinin ayrı bir dalda görüntülenmesi diğer viruslardan farklı olduğunu göstermektedir. Burada öncelikle virusun dışarıdan gelmiş olduğu ve çiftlikte farklı genetik özelliklere sahip suşların miks şekilde sirküle olduğu

düşünülmektedir. Nitekim farklı bulunan suşun Sivas ilinden elde edilen sekansa yakın bulunması bu ihtimali güçlendirmekte, virusun hayvan hareketleriye işletmeye girmiş olabileceğini göstermektedir. Ancak bunun yanında virusun mutasyona uğramış olma ihtimali de akla gelmektedir. Virusun RNA genomuna sahip olması dolayısıyla mutasyonlara ve rekombinasyonlara yatkın olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Virusların aynı çiftlikte genetik değişime uğrayıp uğramadığı ve rekombinasyonların varlığı farklı gen bölgelerinin veya tam genomun analizi yapılarak açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Dizi analizi sonuçlarına dayanarak, iki farklı coğrafi bölgedeki iki ilde (Aksaray ve Aydın) BNoV'nin her iki genotipi (Genotip III.1 ve III.2) de saptanmış olup, Aksaray ilinde BNoV'nin GIII.1 genotipi, Aydın ilinde ise GIII.2 genotipi bulundu. Türkiye'de yapılan çalışmalara bakıldığında genel olarak BNoV'nin GIII.2 genotipinin tespit edildiği ve bu genotipin yaygın olduğu dikkati çekmektedir (Dik ve Diğerleri, 2023; Gülaçtı ve diğerleri, 2016; Hacıoğlu ve Alkan, 2019; Turan ve diğerleri, 2018; Yılmaz ve diğerleri, 2011). Bovine norovirus GIII.2 genotipinin yaygınlığının Marmara Bölgesi'nde %8,5 (Yılmaz ve diğerleri, 2011), İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinde %3,93 (Turan ve diğerleri, 2018) ve Türkiye geneli 10 farklı ilden toplanan örneklerde ise %73,5 (25/34) oranında olduğu görülmüştür (Hacıoğlu ve Alkan, 2019). Sadece Hacıoğlu ve diğerleri (2019) çalışmalarında %26,5 oranında GIII.1 genotipi saptamışlardır. Türkiye'de yapılan çalışmalara ve bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, GIII.2'nin Türkiye genelinde daha yaygın olduğu ve yayılma eğilimi gösterdiği söylenilebilir.

Bu çalışma kapsamında CBECU primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR testi ile pozitiflik elde edilememiş olup ikinci primerlerle nested RT-PCR yapılması sonucunda net pozitiflikler bulundu. Pakistan'da Yasir (2023) tarafından yapılan benzer bir çalışma ile uyumlu şekilde pozitif sonuç elde edilememiştir. Bovine norovirusların çok sık mutasyona uğraması (Hacıoğlu ve Alkan, 2019), bu primerle yapılan çalışmaları sınırlandırmış olabileceğini akıllara getirmiştir. RT-PCR ile bulunan pozitifliklerin kıtaya, ülkeye, test stratejisine, kullanılan primerlere göre değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir (Ferragut ve diğerleri, 2016).

Türkiye ve Dünya'da yapılan diğer bovine norovirus çalışmalarının oranlarıyla karşılaştırma yapıldığında Aydın bölgesinde bir çiftlikte ishal vakalarının artışı sonucu toplanan örneklerde %71,8'lik enfeksiyon oranı GIII.2 genotipinin (Newbury agent 2) suşunun tespit edilmesi bu suşun kontrolsüz biçimde yaygınlaşabileceğini düşündürmektedir. Böylece bovine norovirusların primer ishal etkeni olarak görev alabileceği ve özellikle bu çiftlikte GIII.2 suşunun tespit edilmesi, literatür verileriyle birlikte değerlendirildiğinde GIII.2 genotipinin

(Newbury agent 2) suşunun GIII.1'e (Jenavirus) oranla kontagiözitesinin ve virulensinin daha yüksek olduğu üzerinde durulabilir. Bu duruma ek olarak GIII.2 genotipinde bulunan suşların dünya ve Türkiye genelinde daha fazla yaygınlık göstermesi dolayısıyla (Di Felice ve diğerleri, 2016; Gülaçtı ve diğerleri, 2016; Turan ve diğerleri, 2018; Yılmaz ve diğerleri, 2011) bu grupta bulunan suşların salgın potansiyeli oluşturabilmesi ve ishale bağlı ekonomik kayıpların önde gelen sebeplerinden biri olması mümkündür. Bu durum göz önüne alındığında moleküler virolojik, serolojik, patolojik ve epizootiyolojik araştırmaların arttırılarak, elde edilen veriler doğrultusunda mücadele stratejilerinin geliştirilmesi ve enfeksiyona karşı önlemlerin alınması gerekmektedir.

Çalışmada BNoV'nin GIII.1 Aksaray bölgesinden alınan örneklerde tespit edilmesi daha önce bu bölgede yapılan çalışmayı destekler niteliktedir. JV suşunun dışkı ile virus saçılım süresinin az olması bu suşu daha az görülebilir yapmıştır (Hacıoğlu ve Alkan, 2019). Çalışmamızda Aksaray'dan alınan örneklerde bulunan iki pozitif buzağı ile eş zamanlı aynı işletmede ve ortalama aynı yaş grubunda olan diğer buzağılara herhangi bir bulaş söz konusu olmamıştır. Bu durumun virusun dışkı ile saçılım süresinin kısa olmasıyla bağlantısı olduğu düşünülmektedir. JV suşunun şiddetli bir ishale sebep olduğu Hacıoğlu ve Alkan (2018) tarafından bildirilmesine rağmen çalışmada NB2-GIII.2 suşunun daha şiddetli bir ishale sebep olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada Aksaray ve Aydın'dan örneklenen tüm hayvanların yaşlara göre enfeksiyon oranlarının istatistiksel karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü. Genel olarak 6 ay üstü hayvanlarda BNoV enfeksiyonu oranının artış gösterdiği belirlendi. Ancak Aydın ilindeki hayvanların yaşlara göre istatistik analizleri anlamlı bir farklılık göstermemekte ve her yaştaki hayvanlarda görülmekteydi. Bunun sebebi olarak virusa bağlı faktörler, yani çiftlikteki görülen BNoV Genotip GIII.2'nin kontagiositesinin, virulensinin daha yüksek olma ihtimali düşünülebilir. Ayrıca, bakım, beslenme ve hijyenik şartların yetersizliği, miks enfeksiyonlar gibi sebepler dolayısıyla hayvanlarda kondisyon kaybı durumu enfeksiyonun her yaştaki hayvanda görülmesi üzerine etkili olabilir. Çalışma sonuçları ve literatür verileri doğrultusunda, yukarıdaki nedenlere bağlı olarak BNoV'nin her yaştaki hayvanların duyarlı olabileceği ve hastalık riski altında bulunabileceği söylenebilir.

Daha önce gerçekleştirilen araştırmaların büyük bir kısmının buzağılar üzerine yoğunlaştığı görülmektedir (Alkan ve diğerleri, 2015; Ferragut ve diğerleri, 2016; Gülaçtı ve diğerleri, 2016; Jung ve diğerleri, 2014; Otto ve diğerleri, 2011; Pourasgari ve diğerleri, 2018; Souza ve diğerleri, 2008; Turan ve diğerleri, 2018; Wang ve diğerleri, 2019; Wise ve diğerleri,

2004; Woode ve Bridger, 1978; Yılmaz ve diğeri, 2011). Konya’da yapılan bir çalışmada 2-5 yaş aralığında olan 80 sığırdaki %7,5 oranında BNoV Genotip III.2 yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. Bu çalışmada hayvanlardaki klinik belirti olup olmadığı kaydedilmemiştir (Dik ve diğeri, 2023).

Jor ve diğeri (2010) yaptıkları araştırmada BNoV enfeksiyonlarının özellikle yenidoğandan 45 günlük yaşa kadar daha sık görüldüğünü öne sürmüştür. Trávén ve diğeri (2022) tarafından ortalama 30 günlük olan ishali buzağılarda BNoV prevalansını %20 olarak saptanmış, ancak 6 aylık yaşta sığırlarda herhangi bir pozitiflik bulunamamıştır. Fakat bu çalışmada 6 aylık ve üzeri hayvanlarda enfeksiyon oranlarının belirgin şekilde arttığı görüldü. Burada anneden alınan maternal antikoların, kolostrum alımının enfeksiyonun görülmesinde etkili olduğu düşünülebilir. Hayvanların sütten kesilmesiyle birlikte vakaların artışı söz konusu olabilir. Aksaray ilindeki örneklerin özellikle buzağılardan alındığı, buna karşılık Aydın ilinden elde edilen örneklerin aynı şartlar altında bulunan farklı yaş gruplarına ait hayvanlardan alındığı göz önünde bulundurulmuştur. Bu bağlamda, yaş grupları arasındaki potansiyel yaş etkisinin değerlendirilmesi amacıyla özellikle Aydın ili örnekleri üzerinde durulmuştur. Yapılan bu analiz sonucunda, yaş grupları arasında anlamlı bir farkın tespit edilemediği, genelde buzağının hastalığı olarak bilinenin aksine yaşlı hayvanlarda da yüksek enfeksiyon oranlarına rastlanılabileceği ve klinik hastalığın görülebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Tunusta yapılan bir çalışmada hastalığın pik yaptığı mevsim kış ayı olarak görülmüş olup anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Hassine-Zaafre ve diğeri, 2012). Fakat İngiltere ve İran’da yapılan çalışmalarda mevsimin norovirusların görülme sıklığı ile bir ilişkisi olmadığı öne sürülmüştür (Milnes ve diğeri, 2007; Pourasgari ve diğeri, 2018). Bu çalışmada elde edilen virus pozitiflikleri genel olarak sonbahar kış döneminde elde edildi. Ancak Aksaray ilinde bulunan pozitifliklerin az olması ve Aydın ilinden toplanan örneklerin tek bir işletmeden sadece kış döneminde alınması mevsimin hastalığın görülme sıklığına etkisini doğru bir şekilde değerlendirilmesini engellemektedir. Bu sebeple mevsimin hastalığın prevalansı üzerinde etkilerini inceleyebilmek için daha kapsamlı çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmada örneklenen tüm sığırlarda cinsiyete göre pozitiflik oranlarının istatistiksel karşılaştırılmaları sonucunda anlamlı bir farklılık tespit edildi. Dişilerde %33,3 oranında BNoV yönünden pozitiflik saptanırken, bu oran erkeklerde %13,1 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre dişilerde BNoV enfeksiyonunun, erkek hayvanlara nazaran daha sık rastlandığı görülmüş ve dişilerin erkeklere nazaran daha duyarlı olabileceği kanısına varılmıştır.

Irklara göre yapılan istatistiksel karşılaştırmada anlamlı farklılıklar saptanmış olup, simental ırkının BNoV'ye karşı daha dayanıklı olabileceği ihtimali görüldü ($p < 0,005$). Bu sonuçlara göre, BNoV enfeksiyonuna karşı ırka bağlı duyarlılığın veya direncin söz konusu olabileceği söylenebilir.

Çalışmada BNoV'un klinik seyrinde ölümle sonuçlanan, hastalığı şiddetli geçiren vaka görülmedi. Buna ek olarak buzağular ortalama bir hafta içinde iyileştiği kaydedildi. Hastalığın prognozunun iyi olması ve ölümcül seyretmemesi hayvanların yaşam koşulları, virusa karşı direnç, kolostrum alımı gibi konakçıya özgü sebeplere bağlı olabileceği gibi, bölgede mevcut BNoV'lerin virulensine ve patojenitesine bağlı olması kuvvetle muhtemeldir. Konunun açıklığa kavuşabilmesi için daha fazla virolojik, epizootiyolojik, klinik ve patolojik yönden araştırma ihtiyacı duyulmaktadır.

Norovirusların sağlıklı hayvanlarda da tespit edildiği göz önüne alındığında dışkıda hangi zamanlarda viral dökülmenin olduğu, enfeksiyonun seyri ve şiddeti konusunda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Büyük çiftliklerde enterik ishallerin ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı düşünülürse rutin teşhis prosedürlerine dahil edilmesi gerekmektedir. Hijyen koşullarına her daim dikkat edilmeli, hayvan bakım ve beslenmesi gerek ekonomik verimlilik açısından gerekse etik değerler açısından özenle yapılmalıdır. Hayvanların hastalığa yakalanmasında ve hastalığın yaygınlığında hijyen faktörünün, kondisyon kaybının, sekonder enfeksiyonların varlığının etkili olabileceği kanısına varıldı. BEC'lerin özellikle mix enfeksiyon şeklinde seyrettiği göz önüne alınırsa sağlıklı hayvan güçlü immun sistemi oluşturduğu için hastalıklara karşı daha dirençli hale gelmiş olacaktır.

Türkiye'de neboviruslar üzerine yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olması bu virusun belirsizliğini korumasına sebep olmaktadır (Hacıoğlu ve Alkan, 2019). Turan ve diğerleri (2018) Sivas, Malatya ve Elazığ illerinde %25,19 (32/127) oranında ise nebovirus Nebraska suşu yönünden pozitif bulmuşlardır. Aksaray, Eskişehir, İzmir, Amasya, Bursa, Ankara, Şanlıurfa, Çankırı %22,1'inde (37/167) nebovirus pozitiflik tespit etmişlerdir (Hacıoğlu ve Alkan 2019). Hacıoğlu ve Alkan (2019) çalışmasında sadece Aksaray'dan aldığı örneklerle bakıldığında %23,5 oranında nebovirus pozitif bulmuştur. Araştırmacılar tarafından, 20 nebovirus pozitif örneğin RdRp gen analizine göre Nebraska suşu ile newbury agent 1'e oranla daha yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Fakat Aksaray yöresindeki suşun tam uzunluktaki kapsid genine göre NB1 suşu ile %85,4 oranında nükleotit benzerliği olduğu bildirilmiştir (Hacıoğlu ve Alkan, 2019). İran'da yapılan bir çalışmada neboviruslar için %15, İsveç'te

yapılan bir çalışmada %5,2 pozitiflik bulunmuştur (Pourasgari ve diğerleri, 2018; Trávén ve diğerleri, 2022).

Bu çalışmada, nebovirus yönünden Aksaray ilinde %2,8 (2/71) oranında pozitiflik saptanırken, Aydın'dan alınan örnekler negatif bulundu. Saptanan nebovirus oranı, daha önce Türkiye'de yapılan diğer iki çalışmaya göre düşük olduğu görüldü. Bu farklılığın sebebi örneklerin hayvan kapasiteleri düşük olan küçük aile işletmelerinden toplanmış olması olabilir. Bu durumun virusun dağılımını sınırlandırmış olması mümkündür. Yapılan bir çalışmada neboviruslar için çok değişkenli analizde pozitiflik oranlarının farklı bulunmasında anlamlı etken saptanamamıştır. Tek değişkenli analizde ise coğrafi konum ve yavrunun anneden erken ayrılması olabileceği ileri sürülmüştür (Trávén ve diğerleri, 2022).

Çalışmada saptanan 2 adet nebovirusun 194 baz büyüklüğünde olan bölgenin dizi analizleri Nebraska suşu ile yakınlıklarının olduğu göstermekteydi. Ancak hedef bölgenin küçük olması dolayısıyla bulunan nebovirusların daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve farklı gen bölgeleri hedef alınarak (örn. geniş VP1, RdRP bölgeleri veya tam genom analizi) moleküler çalışmaların genişletilmesi gerekmektedir.

Neboviruslar üzerine yapılan çalışmaların kısıtlı olması buzağı ishallerinin yıkıcılığı düşünüldüğünde virusun epizootiyolojisinin bilinmesi önem arz etmektedir. Virusun yapısının incelenmesi, rekombinasyon çalışmalarının yapılması virus hakkında daha fazla bilgi edinilmesini sağlayacaktır. Sunulan tez konusuna ek olarak nebovirusun varlığı ve yaygınlığı araştırılmıştır. Ancak nebovirus için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Araştırmalara her iki virusun moleküler virolojisi ve epizootiyolojisi üzerine ayrıntılı olarak ileriki dönemlerde devam edilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hayvancılık sektöründe ekonomik kayıpların en büyük sebeplerinden biride buzağı ishalleridir. Özellikle mix enfeksiyon şeklinde seyreden vakalarda verim kaybı kaçınılmazdır. Bu sebeple çalışmada Aksaray ve Aydın ilinde bir çiftlikten toplanan ishallerde norovirus ve ek olarak neboviruslar moleküler virolojik olarak incelendi. Çalışmada iki ildeki BNoV genotipleri belirlenmiş olup yaş, ırk, cinsiyet faktörlerinin enfeksiyon görülmesindeki etkileri araştırıldı. Aksaray ve Aydın illerindeki ishallerde hayvanlardan alınan tüm dışkı örneklerinden %25,6'sı BNoV yönünden pozitif bulundu. Aksaray ilindeki ishallerde buzağılardan alınan örneklerde %4,2 oranında BNoV yaygınlığı saptanırken, Aydın'daki bir çiftlikte pozitiflik oranı %71,8 olarak tespit edildi. Çalışma verileri ve literatür bilgileri doğrultusunda BNoV enfeksiyonlarının ülkemizde yaygın olarak görüldüğü tespit edildi.

Aksaray ilinde BNoV enfeksiyonları her işletmede tek vakalar halinde görülürken, Aydın ilindeki bir işletmede yapılan araştırmada virusun birçok hayvanı etkilediği ve aynı çiftlikte sürekli sirkülasyon halinde olduğu gözlemlendi. Bu bağlamda BNoV'lerin primer ishal etkeni olarak salgına sebep olabileceği düşüncesi oluşmuştur.

Çalışmada BNoV'un klinik seyrinde ölümle sonuçlanan, hastalığı şiddetli geçiren vaka görülmedi. Buna ek olarak buzağuların ortalama bir hafta içinde iyileştiği kaydedildi.

Yapılan sekans analizinde BNoV için Aksaray ilinde bulunan suşları Genotip GIII.1 grubunda Aydın ilinde bulunan suşların ise genotip GIII.2 grubunda olduğu saptandı.

Aksaray ilinde norovirus tek tek vakalar halinde görülürken, Aydın ilinde bulunan çiftlikte GIII.2'nin popülasyonda yayılma eğilimi olduğu düşünülmektedir. Saptanan virusların filogenetik analizinde Aksaray örnekleri homojen bir genetik yapı sergilerken Aydın çiftliğindeki örneklerin farklı dallarda görülmesi farklı genetik özelliklere sahip virusların bulunduğunu göstermektedir. Bu durumun aynı çiftlikte farklı virusların sirküle ettiği anlamına gelirken diğer taraftan bir virusun uzun süreli popülasyonda kalması dolayısıyla mutasyonun meydana gelmiş olması olasılığını akla getirmektedir.

Norovirusların sağlıklı hayvanlarda da tespit edildiği göz önüne alındığında dışkıda hangi zamanlarda viral dökülmenin olduğu, enfeksiyonun seyri ve şiddeti konusunda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Büyük çiftliklerde enterik ishallerin ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı düşünülürse rutin teşhis prosedürlerine dahil edilmesi gerekmektedir.

Hijyen koşullarına her daim dikkat edilmeli, hayvan bakım ve beslenmesi hem ekonomik verimlilik açısından hemde etik değerler açısından özenle yapılmalıdır. Hayvanların hastalığa yakalanmasında ve hastalığın yaygınlığında hijyen faktörünün, kondisyon kaybının, sekonder enfeksiyonların varlığının etkili olabileceği kanısına varıldı.

Çalışma verileri ve literatür bilgileri ışığında GIII.2 suşu GIII.1 oranla daha patojen olup yayılma eğilimine sahip olduğu görüldü. Virusun yayılma potansiyelinin var olduğu ve her geçen gün yeni raporların elde edilmesi, virusun ekonomik kayıplara neden olan ana ishal etkeni olarak kabul edilmesini gerektirmekte ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesi için önlemler alınmasını zorunlu kılmaktadır.

Yaşlara göre pozitiflik oranları değerlendirildiğinde, genel olarak 6 ay üstü hayvanlarda BNoV enfeksiyonu görülme oranlarının arttığı, ancak virus, çevre ve konakçı faktörlerine bağlı olarak her yaştaki hayvanlarda enfeksiyonun ve hastalığın görülebileceği sonucuna varıldı.

İstatistiksel analizlere göre dışilerde BNoV enfeksiyonunun, erkek hayvanlara nazaran daha sık rastlandığı görülmüş ve dışilerin erkeklere nazaran daha duyarlı olabileceği kanısına varılmıştır.

İrklara göre yapılan istatistiksel karşılaştırmada da anlamlı farklılıklar saptanmış olup, BNoV enfeksiyonuna karşı ırka bağlı duyarlılığın veya direncin söz konusu olabileceği söylenebilir.

Dünya’da ve özellikle Türkiye’de BNoV ve neboviruslar üzerine yapılan çalışmalar çok kısıtlı kalmaktadır. Bu tez çalışması ve önceki literatür verileri, bu virusların hayvan sağlığına zarar verme ve ekonomik kayıplara yol açabilme potansiyellerini ortaya koymakta olup, bu viruslara karşı mücadele stratejilerinin belirlenmesi ve yürürlüğe konulması gerekliliğini vurgulamaktadır. Enfeksiyona karşı mücadelede, aşılama, hızlı ve doğru teşhis önem arz etmektedir. Güvenilir ve hızlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, rutin teşhise eklenmesi ve ayrıca aşı çalışmalarının başlatılması gerekmektedir. Bu nedenlerle söz konusu virusların moleküler ve serolojik özellikleri, epizootiyolojisi, immünolojisi, kliniği ve patolojisi üzerine daha fazla araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adler, J.L., ve Zickl R. (1969). Winter vomiting disease. *The Journal of infectious diseases*, 119(6), 668-673. doi: 10.1093/INFDIS/119.6.668.
- Alkan, F., Karayel, İ., Catella, C., Bodnar, L., Lanave, G., Bányai, K., ..., Martella V. (2015). Identification of a Bovine Enteric Calicivirus, Kırklareli Virus, Distantly Related to Neboviruses, in Calves with Enteritis in Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(11), 3614-3617. doi: 10.1128/JCM.01736-15.
- Anonim. (1965). Winter vomiting disease. *British Medical Journal*, 2(5468), 953-954. doi: 10.1136/bmj.2.5468.953.
- Bank-Wolf, B.R., König, M., Heinz J. T. (2010). Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 204-212. doi: 10.1016/J.VETMIC.2009.08.021.
- Berchtold, J. (2009). Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 25(1), 73-99. doi: 10.1016/J.CVFA.2008.10.001.
- Blacklow, N. R., Dolin, R., Fedson, D.S., Dupont, H., Northrup, R.S., Hornick, R.B., ve Chanock, R.M. (1972). Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis: Etiology and Pathogenesis. *Annals of Internal Medicine*, 76(6), 993-1008. doi: 10.7326/0003-4819-76-6-993.
- Bradley, W.H. (1943). Epidemic Nausea and Vomiting. *British medical journal*, 1(4288), 309. doi: 10.1136/BMJ.1.4288.309.
- Bull, R. A., Tanaka, M. M., White, P. A. (2007). Norovirus recombination. *The Journal of General Virology*, 88(12), 3347-3359. doi: 10.1099/VIR.0.83321-0.
- Burroughs, J. N. ve Brown, F. (1978). Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *The Journal of General Virology*, 41(2), 443-446. doi: 10.1099/0022-1317-41-2-443.

- Carstens, E. B. (2009). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, 155(1), 133-146. doi: 10.1007/s00705-009-0547-x.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C. W., Green, K., Martella, V., ... Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The Journal of General Virology*, 100(10), 1393-1406. doi: 10.1099/JGV.0.001318.
- Cho, Y. I., & Yoon, K. J. (2014). An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15(1), 1-17. doi: 10.4142/JVS.2014.15.1.1.
- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (2000). Organization and expression of calicivirus genes. *Journal of Infectious Diseases*, 181(Suppl 2), S309-S316. doi: 10.1086/315575.
- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (1997). The molecular biology of caliciviruses. *The Journal of General Virology*, 78(2), 291-301. doi: 10.1099/0022-1317-78-2-291.
- Constable, P. D. (2009). Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. The Veterinary Clinics of North America. *Food Animal Practice*, 25(1), 101-120. doi: 10.1016/J.CVFA.2008.10.012.
- Dastjerdi, A. M., Snodgrass, D. R., Bridger, J. C. (2000). Characterisation Of The Bovine Enteric Calici-Like Virus, Newbury Agent 1. *FEMS Microbiology Letters*, 192(1).
- Dastjerdi, A. M., Green, J., Gallimore, C. I., Brown, D. W. G., Bridger, J. C. (1999). The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology*, 254(1), 1-5. doi: 10.1006/VIRO.1998.9514.
- De Rougemont, A., Ambert-Balay, K., Belliot, G., Pothier, P. (2010). Norovirus infections: an overview. *Medicine Sciences*, 26(1), 73-78. doi: 10.1051/MEDSCI/201026173.
- Deng, Y., Batten, C. A., Liu, B. L., Lambden, P. R., Elschner, M., Günther, H., ... Clarke, I. N. (2003). Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2300-2305. doi: 10.1128/JCM.41.6.2300-2305.2003.
- Di Felice, E., Mauroy, A., Dal Pozzo, F., Thiry, D., Ceci, C., Di Martino, B., Marsilio, F., Thiry, E. (2016). Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea

- diagnosis. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 207, 53-62. doi: 10.1016/J.TVJL.2015.10.026.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Di Felice, E., Melegari, I., Ceci, C., Mauroy, A., ... Marsilio, F. (2014). Genetic heterogeneity of bovine noroviruses in Italy. *Archives of Virology*, 159(10). doi: 10.1007/s00705-014-2109-0.
- Dik, I., Bulut, O., Avci, O., Hasoksuz, M., Palancı, H., Aslım, H., Bulut, Z. (2023). Molecular Detection and Characterization of Bovine Noroviruses from Cattle in Konya, Turkey. *Pakistan Veterinary Journal*, 43, 2074-7764. doi: 10.29261/pakvetj/2022.089.
- Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., Baric, R. S. (2010). Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 231-241. doi: 10.1038/NRMICRO2296.
- Ferragut, F., Vega, C. G., Mauroy, A., Conceição-Neto, N., Zeller, M., Heylen, E., ... Parreño, V. (2016). Molecular detection of bovine Noroviruses in Argentinean dairy calves: Circulation of a tentative new genotype. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 144. doi: 10.1016/J.MEEGID.2016.02.034.
- Flynn, W. T., Saif, L. J. (1988). Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(2), 206-212. doi: 10.1128/jcm.26.2.206-212.1988.
- Gomez Diego, E., Weese, J. S. (2017). Viral enteritis in calves. *Canadian Veterinary Journal*, 58(12), 1267-1274.
- Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., ... Thiel, H. J. (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), doi: 10.1086/315591.
- Guo, Z., Kifu, O., Yue, H., Zhang, B., Tang, Ç. (2018). Genomic characterization of a RdRp-recombinant nebovirus strain with a novel VP1 genotype. *Virus Research*, 251, 6-13. doi: 10.1016/j.virusres.2018.04.016.
- Guo, Z., He, Q., Zhang, B., Yue, H., Tang, C. (2019). First Detection Of Neboviruses In Yak (*Bos Grunniens*) And Identification Of A Novel Neboviruses Based On Complete Genome. *Veterinary Microbiology*, 236, 108388. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108388.

- Guo, Z., He, Q., Yue, H., Zhang, B., Tang, C. (2018). First detection of Nebovirus and Norovirus from cattle in China. *Archives of Virology*, 163(2), 475-478. doi: 10.1007/S00705-017-3616-6.
- Gülaçtı, İ., Sözdutmaz, İ., & İşidan, H. (2016). Molecular characterization of the bovine noroviruses from diarrheic calves in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 40(4), 428-433. doi: 10.3906/vet-1504-67.
- Karayel Hacıoğlu, İ., Alkan, F. (2018). Yenidoğan Buzağı İshallerinin Önemli Viral Etkenlerinden Caliciviruslar. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 29(2), 167-174. doi: 10.35864/EVMD.513568.
- Karayel Hacıoğlu, I., Alkan, F. (2019). Molecular characterization of bovine noroviruses and neboviruses in Turkey: detection of recombinant strains. *Archives of Virology*, 164(5), 1411-1417. doi: 10.1007/S00705-019-04186-0.
- Koçak, A. ve Bozdayı Gülendim A. (2012). Norovirüsün genomik yapısı, replikasyonu ve epidemiyolojisi. *Flora Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi* 17(1), 1-10.
- Hall, A. J., Vinjé, J., Lopman, B., Park, G. W., Yen, C., Gregoricus, N., Parashar, U. (2011). Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*, 60(3), 1-15.
- Hall, G. A., Bridger, J. C., Brooker, B. E., Parsons, K. R., Ormerod, E. (1984). Lesions of gnotobiotic calves experimentally infected with a calicivirus-like (Newbury) agent. *Veterinary Pathology*, 21(2), 208-215. doi: 10.1177/030098588402100213.
- Han, M. G., Wang, Q., Smiley, J. R., Chang, K. O., Saif, L. J. (2005). Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 778-785. doi: 10.1128/JCM.43.2.778-785.2005.
- Hardy, M. E. ve Estes, M. K. (1996). Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes*, 12(3), 287-290. doi: 10.1007/BF00284649.
- Hassine-Zaafraane, M., Kaplon, J., Sdiri-Loulizi, K., Aouni, Z., Pothier, P., Aouni, M., Ambert-Balay, K. (2012). Molecular prevalence of bovine noroviruses and

neboviruses detected in central-eastern Tunisia. *Archives of Virology*, 157(8), 1599-1604. doi: 10.1007/S00705-012-1344-5.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2019). Taxon Details. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202202806 adresinden 2023 yılında erişildi.

Jiang, X., Graham, D. Y., Wang, K., Estes, M. K. (1990). Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4987), 1580-1583. doi: 10.1126/SCIENCE.2177224.

Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M. K. (1993). Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus. *Virology*, 195(1), 51-61. doi:10.1006/VIRO.1993.1345.

Jor, E., Myrmel, M., Jonassen, C. M. (2010). SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. *Journal of Virological Methods*, 169(1), 1-7. doi:10.1016/J.JVIROMET.2010.03.028

Jung, K., Kwonil, S., Scheuer, K. A., Zhang, Z., Wang, Q., & Saif, L. J. (2014). Pathogenesis of GIII.2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves. *Veterinary Microbiology*, 168(1), 202-207. doi: 10.1016/J.VETMIC.2013.11.008.

Kapikian, A. Z. (2000). The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(Suppl 2). doi:10.1086/315584.

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Chanock, R. M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10(5), 1075-1081. doi: 10.1128/JVI.10.5.1075-1081.1972.

Kaplon, Jérôme, Eric Guenau, Philippe Asdrubal, Pierre Pothier, and Katia Ambert-Balay. (2011). Possible Novel Nebovirus Genotype in Cattle, France. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), 1120–1123. doi:10.3201/eid1706.100038

Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., Virgin 4th, H. W. (2003, Mar 7). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 299(5612), 1575-1578. doi: 10.1126/science.1077905.

- Karst, S. M. ve Baric, R. S. (2015). What is the reservoir of emergent human norovirus strains? *Journal of Virology*, 89(11), 5756-5759. doi:10.1128/JVI.03063-14.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology*, 158(10), 2059–2068. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5.
- Liu, B. L., Lambden, P. R., Günther, H., Otto, P., Elschner, M., & Clarke, I. N. (1999). Molecular Characterization of a Bovine Enteric Calicivirus: Relationship to the Norwalk-Like Viruses. *Journal of Virology*, 73(1), 819-825. doi: 10.1128/JVI.73.1.819-825.1999.
- Lu, L., Zhong, H., Xu, M., Su, L., Cao, L., Jia, R., Xu, J. (2019). Genetic diversity and epidemiology of Genogroup II noroviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in Shanghai, China, 2012-2017. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1-10. doi: 10.1186/S12879-019-4360-1/FIGURES/6.
- Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., Farber, J. M. (2007). Human noroviruses in swine and cattle. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1184-1188. doi: 10.3201/EID1308.070005.
- Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Saegerman, C., Mast, J., Bridger, J. C., ... Thiry, E. (2009). Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA. *Veterinary Microbiology*, 137(3-4), 243-51. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.031.
- Mauroy, A., Gillet, L., Mathijs, E., Vanderplasschen, A., Thiry, E. (2011). Alternative attachment factors and internalization pathways for GIII.2 bovine noroviruses. *Journal of General Virology*, 92(6), 1398-1409. doi: 10.1099/vir.0.030072-0.
- Miller, R., & Raven, M. (1936). Epidemic Nausea and Vomiting. *British Medical Journal*, 1(3937), 1242-44. doi: 10.1136/BMJ.1.3937.1242.
- Milnes, A. S., Binns, S. H., Oliver, S. L., Bridger, J. C. (2007). Retrospective study of noroviruses in samples of diarrhoea from cattle, using the Veterinary Laboratories Agency's Farmfile database. *The Veterinary Record*, 160(10), 326-30. doi: 10.1136/VR.160.10.326.

- Mohamed, Fakry F., Ktob, Gamelat K. F., Ismaeil, Mohamed E. A., Ali, Ahmed A. H., Goyal, Sagar M. (2018). Phylogeny of bovine norovirus in Egypt based on VP2 gene. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 48-52. doi: 10.1016/J.IJVSM.2018.04.005.
- Nims, Raymond ve Plavsic, Mark. (2013). Inactivation of caliciviruses. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(3), 358-92. doi: 10.3390/PH6030358.
- Oliver, S. L., Asobayire, E., Dastjerdi, A. M., Bridger, J. C. (2006, June 20). Genomic Characterization Of The Unclassified Bovine Enteric Virus Newbury Agent-1 (Newbury1) Endorses A New Genus in The Family Caliciviridae. *Virology*, 350(1), 240-250. doi: 10.1016/j.virol.2006.02.027.
- Oliver, S. L., Dastjerdi, A. M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D. W. G., Green, J., Bridger, J. C. (2003). Molecular Characterization of Bovine Enteric Caliciviruses: a Distinct Third Genogroup of Noroviruses (Norwalk-Like Viruses) Unlikely To Be of Risk to Humans. *Journal of Virology*, 77(4), 2789-2798. doi: 10.1128/JVI.77.4.2789-2798.2003
- Otto, P. H., Clarke, I. N., Lambden, P. R., Salim, O., Reetz, J., Liebler-Tenorio, E. M. (2011). Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. *Journal of Virology*, 85(22), 12013-12021. doi: 10.1128/JVI.05342-11.
- Özdamar, K. (2004). Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi. 5. Baskı. Eskişehir: Kaan Kitabevi.
- Park, S. J., Jeong, C., Yoon, S. S., Choy, H. E., Saif, L. J., Park, S. H., ... Cho, K. O. (2006). Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3178-3188. doi: 10.1128/JCM.02667-05.
- Park, S. I., Jeong, C., Kim, H. H., Park, S. H., Park, S. J., Hyun, B. H., ... Cho, K. O. (2007). Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea. *Veterinary Microbiology*, 124(1-2), 125-133. doi: 10.1016/J.VETMIC.2007.03.010.
- Park, S. I., Park, D. H., Saif, L. J., Jeong, Y. J., Shin, D. J., Chun, Y. H., ... Cho, K. O. (2009). Development of SYBR Green real-time RT-PCR for rapid detection,

- quantitation and diagnosis of unclassified bovine enteric calicivirus. *Journal of Virological Methods*, 159(1), 64-68. doi: 10.1016/J.JVIROMET.2009.03.001.
- Parlatır, Y. ve Yağcı, B. B. (2018). Neonatal İshalli Buzağılarda Sıvı-Elektrolit Denge Bozuklukları ve Sağaltımı. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 58(3), 50-55.
- Plavsic, M., Qiu, Y., Jones, N., Keegan, J., Woodcock, D., Morris, J., ... Palermo, A. (2011). Caliciviridae and Vesivirus 2117. *BioProcessing Journal*, 9(2), 6-12. doi: 10.12665/J92.PLAVSIC.
- Pourasgari, F., Kaplon, J., Sanchooli, A., Fremy, C., Karimi-Naghlani, S., Otarod, V., ... Pothier, P. (2018). Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses in newborn calves in Iran. *Archives of Virology*, 163(5), 1271-1277. doi: 10.1007/S00705-018-3716-Y.
- Reimann, H. A., Price, A. H., Hodges, J. H. (1945). The Cause of Epidemic Diarrhea, Nausea and Vomiting. (Viral Dysentery?). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 59(1), 8-9. doi: 10.3181/00379727-59-14959P.
- Richard, M., Kim, K. H., Kimura, H., Frese, M., Smertina, E., Urakova, N., Strive, T. (2019). Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases: Evolution, Structure, Protein Dynamics, and Function. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1280. doi: 10.3389/FMICB.2019.01280.
- Scipioni, A., Mauroy, A., Vinjé, J., Thiry, E. (2008). Animal noroviruses. *The Veterinary Journal*, 178(1), 32-45. doi: 10.1016/J.TVJL.2007.11.012.
- Singh, B. K., Koromyslova, A., Hansman, G. S. (2016). Structural analysis of bovine norovirus protruding domain. *Virology*, 487, 296-301. doi: 10.1016/J.VIROL.2015.10.022.
- Smiley, J. R., Hoet, A. E., Trávén, M., Tsunemitsu, H., Saif, L. J. (2003). Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3089-3099. doi: 10.1128/JCM.41.7.3089-3099.2003.
- Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinjé, J., Saif, L. J. (2002). Characterization Of An Enteropathogenic Bovine Calicivirus Representing A Potentially New Calicivirus

- Genus. *Journal of Virology*, 76(20), 10089-10098. doi: 10.1128/jvi.76.20.10089-10098.2002.
- Souza, M., Azevedo, M. S. P., Jung, K., Cheetham, S., Saif, L. J. (2008). Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *Journal of Virology*, 82(4), 1777-1786. doi: 10.1128/JVI.01347-07.
- Şahal, M., Terzi, O. S., Ceylan, E., Kara, E. (2018). Buzağı İshalleri ve Korunma Yöntemleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 58 (Özel Sayı), 41-49.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Thomas, C., Jung, K., Han, M. G., Hoet, A., Scheuer, K., Wang, Q., Saif, L. J. (2014). Retrospective serosurveillance of bovine norovirus (GIII.2) and nebovirus in cattle from selected feedlots and a veal calf farm in 1999 to 2001 in the United States. *Archives of Virology*, 159(1), 83-90. doi: 10.1007/S00705-013-1795-3.
- Thorne, Lucy G. ve Ian G. Goodfellow. (2014). Norovirus gene expression and replication. *The Journal of General Virology*, 95(Pt 2), 278-291. doi: 10.1099/VIR.0.059634-0.
- Tråvén, M., Axén, C., Svensson, A., Björkman, C., Emanuelson, U. (2022). Prevalence of Bovine Norovirus and Nebovirus and Risk Factors of Infection in Swedish Dairy Herds. *Dairy*, 3(1), 137-147. doi: 10.3390/DAIRY3010011/S1.
- Turan, T., Işıdan, H., Atasoy, M. O., Irehan, B. (2018). Detection and Molecular Analysis of Bovine Enteric Norovirus and Nebovirus in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, 62(2), 129-135. doi: 10.2478/JVETRES-2018-0021.
- Güzel, T. (1994). Calicivirus'lar. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 7(5), 195-202.
- Van Der Poel, W. H. M., Van Der Heide, R., Verschoor, F., Gelderblom, H., Vinjé, J., Koopmans, M. P. G. (2003). Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 92(4), 297-309. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00421-2.
- Véliz, C. P. C., Campillay, J. J. C., Carvajal, A. M., Avellaneda, D., Covián, C., Kalergis, A. M., ... Lay, M. K. (2020). Human Norovirus Proteins: Implications in the

- Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 11:961. doi: 10.3389/fimmu.2020.00961.
- Véliz, C. P. C., Campillay, J. J. C., Carvajal, A. M., Avellaneda, D., Covián, C., Kalergis, A. M., Lay, M. K. (2020). Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 11:961. doi: 10.3389/fimmu.2020.00961.
- Villabruna, N., Koopmans, M. P. G., de Graaf, M. (2019). Animals as Reservoir for Human Norovirus. *Viruses*, 11(5). doi: 10.3390/V11050478.
- Vinje, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., L'Homme, Y., Martella, V., Vennema, H., ... White, P.A. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *The Journal of General Virology*, 100(11), 1469-1470. doi: 10.1099/JGV.0.001332.
- Vinje, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., L'Homme, Y., ... White, P. A. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *The Journal of General Virology*, 100(11), 1469-1470. doi: 10.1099/JGV.0.001332.
- Vinje, J. (2015). Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 373-381. doi: 10.1128/JCM.01535-14.
- Wang, Y., Yue, H., Tang, C. (2019). Prevalence and complete genome of bovine norovirus with novel VP1 genotype in calves in China. *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/S41598-019-48569-4.
- Widdowson, M. A., Rockx, B., Schepp, R., Van Der Poel, W. H. M., Vinje, J., Van Duynhoven, Y. T., Koopmans, M. P. (2005). Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *Journal of Medical Virology*, 76(1), 119-128. doi: 10.1002/JMV.20333.
- Winder, N., Gohar, S., Muthana, M. (2022). Norovirus: An Overview of Virology and Preventative Measures. *Viruses*, 14(12), 2811. doi: 10.3390/V14122811.
- Wise, A. G., Monroe, S. S., Hanson, L. E., Grooms, D. L., Sockett, D., Maes, R. K. (2004). Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. *Virus Research*, 100(2), 165-177. doi: 10.1016/j.virusres.2003.11.014.

- Wolf, S., Williamson, W., Hewitt, J., Lin, S., Rivera-Aban, M., Ball, A., Scholes, P., Savill, M., Greening, G. E. (2009). Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Veterinary Microbiology*, 133(1-2), 184-189. doi: 10.1016/J.VETMIC.2008.06.019.
- Woode, G. N., ve Bridger, J. C. (1978). Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *Journal of Medical Microbiology*, 11(4), 441-452. doi: 10.1099/00222615-11-4-441.
- Yasir, A., Mahmood, Y., Yaqoob, M. A., Zia, U.-r.-R., Munoz-Zanzi, C., Alam, M. M., Warraich, M. A., Hassan Mushtaq, M. (2023). Epidemiological investigation of norovirus infections in Punjab, Pakistan, through the One Health approach. *Frontiers in Public Health*, 11, 1065105. doi: 10.3389/fpubh.2023.1065105.
- Yılmaz, H., Turan, N., Altan, E., Bostan, K., Yılmaz, A., Helps, C. R., Cho, K. O. (2011). First report on the phylogeny of bovine norovirus in Turkey. *Archives of Virology*, 156(1), 143-147. doi: 10.1007/S00705-010-0833-7.
- Zakhour, M., Ruvoën-Clouet, N., Charpilienne, A., Langpap, B., Poncet, D., Peters, T., Bovin, N., Le Pendu, J. (2009). The α Gal Epitope of the Histo-Blood Group Antigen Family Is a Ligand for Bovine Norovirus Newbury2 Expected to Prevent Cross-Species Transmission. *PLOS Pathogens*, 5(7), e1000504. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1000504.
- Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346(2), 312-323. doi:10.1016/J.VIROL.2005.11.015.

EKLER

EK 1 HADYEK ETİK KARAR



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 29/07/2021

Sayı: 64583101/2021/110


Konu: Başvuru Hakkında Bilgilendirme

Sayın, Öğr. Üyesi Doç .Dr. Nural EROL
ADÜ Veteriner Fak. Viroloji ABD

Kurulumuza 27.07.2021 tarihinde başvurduğunuz “Buzağılarda Bovine Enteric Calicivirus (Norovirus ve Nebovirus) Enfeksiyonlarının Virolojik Olarak Araştırılması” adlı çalışmanız Kurulumuzca gündeme alınmış ve değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda, çalışmanızda deney hayvanı kullanılmayacağı anlaşılmış olup, Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına dair Yönetmeliğin madde 8k/4 bendi uyarınca, deney hayvanı kullanımı olmayan çalışmalar için HADYEK onayı gerekmemektedir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Mufat SARIERLER
ADÜ-HADYEK Başkanı

EK 2 Kullanılan Malzemeler

- Pen-Strep-Ampho.B Solution (Biological Industries)
- PBS tablet
- Distile su
- Sol-D
- Asit Fenol
- Kloroform
- 3M Na asetat
- izopropil alkol
- %70'lik etanol
- Random Hexamer primer (Thermo scientific)
- 5X Reaction Buffer (Thermo scientific)
- dNTP (Thermo scientific)
- RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L) (Thermo scientific, USA)
- nCBECU-F/R primeri (Oligomer)
- CBECU-F/R primeri (Oligomer)
- NBU- F/R primeri (Oligomer)
- nNBU- F/R primeri (Oligomer)
- 10x Buffer (Thermo scientific)
- MgCl₂ (Thermo scientific)
- Dream Taq (Thermo scientific)
- SafeView (Hibrigen, Türkiye)
- Nuclease free water (Thermo scientific)
- 5x Tae
- Agaroz jel (Prona, EU)

- 100bp'lik marker (ThermoFisher 100bp plus, MA, USA)
- 6x loading dye (Thermo Scientific)

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİLİMSEL ETİK BEYANI

‘Buzağılarda norovirus enfeksiyonunun virolojik olarak araştırılması’ başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Tevhide AYDIN DÖNMEZ

...../...../2023

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı,Adı :AYDIN DÖNMEZ, Tevhide
Uyruk :TC
Doğum Yeri ve Tarihi :Aydın, 28.07.1994
Telefon :554 448 5758
E-mail :tevhideaydn@gmail.com
Yabancı Dil :İngilizce
ORCID No :0000-0001-8452-6322

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2017

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2017-2018	Şah-Vet Veteriner Kliniği	Veteriner Hekim
2018-2020	WestVet Hayvan Hastanesi	Veteriner Hekim
2020-Halen	TC Tarım ve Orman Bakanlığı	Veteriner Hekim