



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2023; 37 (2): 134 - 138
http://www.fusabil.org

Elazığ, Malatya ve Diyarbakır İllerindeki Yenidoğan İshalli Buzağılarda Bovine Rotavirüs ve Bovine Coronavirüsün Real Time RT-PCR ile Teşhisi

Hasan ABAYLI ^{1, a}
Mehmet İLGİN ^{2, b}
Kezban ŞAHNA ^{1, c}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Elazığ Veteriner Kontrol
Enstitüsü,
Viroloji Teşhis Laboratuvarı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-2116-105X

^b ORCID: 0000-0003-1488-1171

^c ORCID: 0000-0001-9211-5419

Yenidoğan buzağı ishalleri sığır yetiştiriciliği yapılan dünyanın birçok ülkesinde en önemli hayvan sağlığı sorunlarından birisidir. Türkiye’de bugüne kadar yapılan çalışmalar, bovine rotavirüs (BRV) ve bovine coronavirüs (BCoV)’ün yeni doğan buzağı ishalinde baskın role sahip en önemli iki viral etken olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada Elazığ, Malatya ve Diyarbakır illerinden ishal semptomlu 1-28 günlük buzağılara ait dışkı örneklerinde BRV ve BCoV’nin prevalansının belirlenmesi ve bu virüslere yönelik korunma-kontrol programlarının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, Elazığ (n:36), Diyarbakır (n:10) ve Malatya (n:28) illerinden toplam 74 adet dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Real Time RT-PCR (rRT-PCR) sonuçlarına göre klinik örneklerin 18’i BRV pozitif (%24.3), 10’u BCoV pozitif (%13.5) ve 7’sinde her iki virüs (%9.5) birden elde edilen veriler bölgede her iki virüsün epidemiyolojisi ve koruyucu tedbirlerin alınması bakımından önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bovine rotavirüs, bovine coronavirüs, real-time, PCR

Real-Time RT-PCR Diagnosis of Bovine Rota and Bovine Coronaviruses in Neonatal Diarrhea Calves in Elazığ, Malatya, and Diyarbakır Provinces

Neonatal calf diarrhea is one of the most important health problems in many countries of the world where cattle breeding is carried out. Studies show that bovine rotavirus (BRV) and bovine coronavirus (BCoV) are the two most critical viral agents that have been predominant in neonatal calf diarrhea so far in Türkiye. Here, we aimed to determine the prevalence of BRV and BCoV in fecal samples of calves (1-28 days old) with diarrhea signs from the provinces of Elazığ, Malatya, and Diyarbakır and to evaluate the prevention control programs for these viruses. For this purpose, fecal samples of 74 calves from the provinces of Elazığ (n: 36), Diyarbakır (n: 10), and Malatya (n: 28) were included in the study. According to Real Time RT-PCR (rRT-PCR) results, 18/74 (24.3%) of the clinical samples were BRV positive, 10/74 (13.5%) were BCoV positive and 7/74 (9.5%) were both BRV and BCoV were positive. The number of studies on this subject in Elazığ and its surrounding provinces is quite limited, and the data obtained are important in terms of the epidemiology of both viruses and taking protective measures in the region.

Key Words: Bovine rotavirus, bovine coronavirus, real-time, PCR

Giriş

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yenidoğan buzağı ishalleri hayvan yetiştiriciliğinin önemli sorunların başında gelmektedir. İshal, buzağılarda ağırlık artışının azalmasına, hastalığın ortaya çıktığı işletmelerde tedavi masraflarının artmasına, iyileşenlerin eski performansını yakalayamamasına ve artan ölüm oranları ile ciddi ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir. Türkiye’de her yıl yaklaşık 6 milyon buzağının doğduğu ve neonatal dönemde ölümlerin de en az %15 olduğu düşünüldüğünde ülkemize bunun maliyetinin yaklaşık 525 milyon Euro olduğu hesap edilmiştir (1).

İlk olarak 1974 yılında elektron mikroskopu ile teşhis edilen ve buzağı ishallerinin en önemli viral etkenlerinden bovine rotavirüs (BRV)’ler, *Reoviridae* ailesi içerisinde Rotavirus genusunda sınıflandırılan, zarfsız, kübik simetrikli, çift iplikçikli ve 11 segmentli RNA genomuna sahip olan virüslerdir (2). İnsan dahil birçok memeli ve kanatlı hayvan türünde enfeksiyon oluşturan rotavirüsler erişkinlerde subklinik, yenidoğanlarda (özellikle de immün kolosturum almamış olanlarda) ishal ile seyreden hastalıklara neden olmaktadır (3).

Bovine rotavirüs (BRV)’ler esas olarak fekal-oral yolla bulaşmakta ve subklinik erişkin hayvanlar bu aşamada önemli rol oynamaktadır (4). Enfekte hayvanlar bol miktarda virüsü dışkıları ile çevreye saçar ve bu saçılım enfeksiyonun 3. ve 4. günlerinde en üst seviyeye ulaşır. Bu nedenle BRV ile enfekte semptomatik buzağuların dışkısı çevresel kontaminasyon için risk oluşturmakta ve rotavirüsle enfekte su kaynakları hastalığın epidemiyolojisine doğrudan katkıda bulunmaktadır (3).

Geliş Tarihi : 03.04.2023
Kabul Tarihi : 07.05.2023

Yazışma Adresi Correspondence

Kezban ŞAHNA
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Ana Bilim Dalı
Elazığ – TÜRKİYE

kcansahna@firat.edu.tr

Yenidoğan buzağı ishallerinin önemli etkenlerinden bir diğeri olan bovine koronavirüsler, *Nidovirales* dizininde, *Coronaviridae* ailesinde, *Coronavirinae* alt ailesinde, Betacoronavirus genusunda yer alırlar ve zarflı, helikal simetrik, pozitif polariteli olan RNA virüsleridir (5). Koronavirüsler insan, evcil ve vahşi yaşamdaki birçok hayvan türünde enfeksiyon oluşturarak akut ve kronik sindirim, solunum ve merkezi sinir sistemi hastalıklarına neden olmakta (6) ve tür bariyerini geçerek zoonoz hastalıklar oluşturabilmektedir (7). BCoV'lar da BRV'lere benzer şekilde başlıca fekal-oral yolla bulaşmakta, kontamine olmuş yem ve su kaynakları virüsün taşınmasında önemli rol oynamaktadır. Etken ayrıca aerosol yolla da bulaşabilmektedir (3, 6).

BRV ve BCoV antijenlerinin saptanmasında birçok araştırmacı tarafından kullanılan yöntem ELISA tekniğidir. Yine bu etkenlerin tespitinde en çok tercih edilen yöntemlerin başında sensitivite ve spesifitesi yüksek olan reverse transcription polimerase chain reaction (RT-PCR) ve Real Time RT-PCR (rRT-PCR) gibi moleküler teknikler de kullanılmaktadır (8, 9).

Türkiye'nin farklı bölgelerinde yenidoğan buzağı ishallerinde farklı oranlarda BRV ve BCoV tespiti yapılarak koruyucu veteriner hekimlik hizmetlerinin uygulandığı çiftliklerde dahil her iki enterik virüsün yenidoğan buzağılarda ishale neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada yenidoğan buzağı ishallerinin sıklıkla görüldüğü Elazığ, Diyarbakır ve Malatya illerinden dışkı örneklerinde BRV ve BCoV varlığının real-time PCR yöntemi ile araştırılması ve bu virüslere yönelik korunma-kontrol programlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun onayı ile yapılmıştır (2023/01).

İshal Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi: Bu çalışmada Elazığ, Diyarbakır ve Malatya illerinde faaliyet gösteren küçük/orta büyüklükteki işletmelerde yetiştirilen toplam 74 ishalli buzağıya (1-28 günlük yaş) ait dışkı örneği alındı. Bu örnekler analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı. Dışkı örnekleri, PBS (Phosphate Buffer Saline) ile %10-20 oranında süspansiyon edilerek iyice vortekslenip, +4 °C'de, 3000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar yeni steril tüplere alındı. Bu süpernatantlardan 250 µL alınarak (RNAase free) steril 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı. Geriye kalan miktarlar ise tüpler içerisinde -80 °C'de muhafaza edildi. Örnek alınan buzağılara ait bazı bilgiler Tablo 2'de verilmiştir.

Viral Nükleik Asit İzolasyonu ve Real-Time RT-PCR: Dışkıdan hazırlanan süpernatantlardan viral etkenlerin RNA'sı talimatlarına uygun olarak IndiSpin Pathogen Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya, Cat. No: SP54106) ile elde edildi ve analiz edilinceye kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Klinik örneklerin rRT-PCR adımıyla ise AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Scientific™, Amerika Birleşik Devletleri) kiti kullanıldı.

Araştırmada bovine rotavirüs ve bovine koronavirüsün hedef gen bölgelerinin çoğaltılması aşamasında kullanılan primer ve prob Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bovine rotavirüs ve bovine koronavirüs tespiti için kullanılan primer ve prob

Primer ve Prob	Sekans (5'-3')	Referans
Rota NVP3-F	ACCATCTTCACGTAACCCCTC	
Rota NVP3-R	GGTCACATAACGCCCC	10
Rota-Pb	FAM- ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACAC TGTC AA-TAMRA	
BCoV-F	CTGGAAGTTGGTGGAGTT	
BCoV-R	ATTATCGGCCTAACATACATC	11
BCoV-Pb	FAM-CCTTCATATCTATACACATCAAG TTGTT-BHQ1	

BRV için rRT-PCR: BRV için rRT-PCR karışımı toplamda 20 µL olacak şekilde 10 µL 2X RT-PCR Buffer, 3.5 µL nükleazdan arı su, 1 µL NVP3-F forward primer (0.5 µM), 1 µL NVP3-R reverse primer (0.5 µM), 0.7 µL Rota-Pb prob (0.1 µM) (Tablo 1), 0.8 µL RT-PCR Enzyme Mix ve 3 µL template eklenerek hazırlandı. Elde edilen rRT-PCR karışımı 45°C'de 10 dk ters transkripsiyonun ardından 95°C'de 10 dk ön denatürasyon işlemi ve akabinde 40 siklus olacak biçimde (95°C 30 sn, 55°C 30 sn, 72°C 30 sn) farklı ısılara tabi tutuldu. Son olarak 72 °C'de 5 dk süresince son uzama adımı gerçekleştirildi.

BCoV için rRT-PCR: BCoV için rRT-PCR karışımı toplamda 20 µL olacak şekilde 10 µL 2X RT-PCR Buffer, 3.5 µL nükleaz arı su, 1 µL BCoV-F forward primer (0.5 µM), 1 µL BCoV-R reverse primer (0.5 µM), 0.7 µL BCoV-Pb prob (0.1 µM) (Tablo 1), 0.8 µL RT-PCR Enzyme Mix ve 3 µL template eklenerek hazırlandı. rRT-PCR aşamasındaki ısı döngü prosedürü BRV için uygulanan ile aynı şartlarda gerçekleştirildi.

İstatistiksel Değerlendirme: Veriler "SPSS for Windows 22.0" paket programı kullanılarak analiz edildi. Her bir parametre yüzde olarak ifade edildi (12).

Bulgular

rRT-PCR testi sonucunda, 74 adet ishalli buzağı örneğinin 18'inde BRV nükleik asidi (%24.3), 10'unda BCoV nükleik asidi (%13.5) ve 7'sinde de hem BRV hem de BCoV nükleik asidi (%9.5) tespit edilmiştir. 74 buzağı örneğinin 46'sında (%62.2) ise aranan enterik virüslerin nükleik asidine rastlanmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen buzağılar 1-28 günlük yaş aralığındaydı bu buzağılara ait bazı bilgiler Tablo 2'de verilmiştir. Testin sonuçlarına göre 1-7 günlük yenidoğan ishalli buzağılarda BRV nükleik asidi (%32, 8/25), 8-14 günlüklerde ise BCoV nükleik asidi (%26.31, 5/19) daha

yüksek oranda tespit edildi ancak yaş grupları arasında istatistiksel fark bulunmadı ($P>0.05$).

Simental (n: 36) ve montafon (n: 4) ırkı ve simental melezi (n: 19) ile montafon melezi (n: 15) hayvanların olduğu bu çalışmada, ırk bazında BRV ve BCoV'nin pozitiflik oranları değerlendirildiğinde her iki enfeksiyonun simental melezinde daha yüksek olduğu belirlendi.

40 adet dişi ve 24 adet erkek hayvandan alınan dışkı örneklerinin real-time PCR sonuçlarına göre BRV pozitiflik oranı dişilerde %27.5, erkeklerde %29.2 ve BCoV pozitiflik oranı ise dişilerde %15.0, erkeklerde %16.7 oranı ile birbirine benzer bulundu (Tablo 2).

BRV, BCoV ve miks enfeksiyon tespit edilen hayvanların ırk, yaş ve cinsiyet açısından ki-kare testi ile analizi sonucunda virüs pozitifliği ile risk faktörleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$).

Tablo 2. Real-Time PCR ile pozitif saptanan örneklerin yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımı

Özellikler		Bovine rotavirüs n/toplam (%)	Bovine coronavirus n/toplam (%)	Miks n/toplam (%)
Yaş (Gün)	1-7	6/21 (28.6)	1/21 (4.7)	1/21 (4.7)
	8-14	5/19 (26.3)	5/19 (26.3)	3/19 (15.8)
	15-21	5/25 (20.0)	3/25 (12.0)	3/25 (12.0)
	22-28	2/9 (22.2)	1/9 (11.1)	0/9 (0.0)
İrk	Simental	8/36 (22.2)	4/36 (11.1)	4/36 (11.1)
	Montafon	0/4 (0.0)	0/4 (0.0)	0/4 (0.0)
	Simental Melez	7/19 (26.8)	4/19 (21.1)	2/19 (10.5)
	Montafon Melez	3/15 (20.0)	2/15 (13.3)	1/15 (6.7)
Cinsiyet	Dişi	11/40 (27.5)	6/40 (15.0)	5/40 (12.5)
	Erkek	7/24 (29.2)	4/24 (16.7)	2/24 (8.3)
	Toplam	18/74 (24.3)	10/74 (13.5)	7/74 (9.5)

Tartışma

Dünyada ve Türkiye'deki sığır işletmelerinde yenidoğan dönemindeki kayıpların en büyük nedenlerinden birisi buzağı ishalleridir. Bakteri, virüs ve parazit gibi enfeksiyöz ve kötü bakım-besleme koşulları, immun baskılanma ve kolostrum alamama gibi non-enfeksiyöz faktörlere bağlı olarak gelişen buzağı ishalleri ekonomik önemini hala korumaktadır (1-3)

Yenidoğan buzağı ishallerinin en önemli viral etkenlerinden biri olan BRV ile alakalı dünyanın farklı ülkelerinde farklı yöntemlerle birçok araştırma yapılmıştır. İshalli buzağı örneklerinde yapılan çalışmalarda İskoçya'da %35.4, İspanya'da %41.9, Fransa'nın güney batı bölgesinde %47.4, Etiyopya'da %16.7-49.3 oranında bovine rotavirüs pozitifliği tespit edilmiştir (13-16).

Türkiye'de yenidoğan buzağı ishallerinde BRV ile ilgili yapılan çalışmalarda; 11 ilde (Ankara, Muğla, Denizli, Bursa, İzmir, Eskişehir, Muş, Samsun, Tekirdağ ve Kırklareli) %33.6 (17), 6 ilde (Bursa, Şanlıurfa, Konya, Denizli, Samsun, Ankara) %53 (18), Van yöresinde %17.9 (19), Kars yöresinde %31.1 (20), Konya ilinde

yapılan 2 farklı çalışmada %18.2 (21) ve %8.5 (22), Elazığ ili ve ilçelerinde %30 (23), Siirt yöresindeki %4 (24), Tokat yöresinde %44.8 (25), Erzurum yöresinde %6.1 (26), Sivas ve ilçelerinde %22 (27), Kırıkkale ve çevre illerde %37.3 (28), Kayseri'de %56.4 (29), Edirne ilinde %6.3 (30) oranlarında BRV pozitifliği belirlenmiştir. Bu çalışmada ise BRV pozitiflik oranı ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalara paralel olarak %24.3 olarak saptanmıştır

BCoV ile alakalı yapılan çalışmalarda ise İskoçya'da %3.6, İspanya'da %10.7, Fransa da %16.5, Etiyopya'da yapılan farklı araştırmalarda %21.3-38.9 oranında yenidoğan buzağı ishallerinde bovine coronavirus pozitifliği bildirmişlerdir (13-16).

Türkiye'nin farklı illerinde buzağılardaki ishal olgularında BCoV varlığı; 6 ilde (Bursa, Şanlıurfa, Konya, Denizli, Samsun, Ankara) %18 (18), Van yöresinde %1.12 (19), Kars yöresinde % 2.2 (20), Elazığ ve ilçelerinde %13 (21), Siirt yöresinde %7 (24), Tokat yöresinde %9.35 (25), Erzurum ve ilçelerinde %12.1 (26), Sivas ve ilçelerinde %9 (27), Kırıkkale ve çevre illerde %37.27 (28), Kayseri'de %19.2 (29), Edirne'de %12.5 (30), ve Marmara Bölgesinde %2 (31) oranında tespit edilmiştir.

Dünyada ve Türkiye'de yapılmış olan çalışmalarda (18, 23, 32) BRV-BCoV ikili enfeksiyon oranları %2.43 - %13.4 arasında saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda belirlenen, ikili BRV-BCoV (%9.5) enfeksiyon oranının, Türkiye'de ve dünyada yapılmış diğer çalışmalar ile benzer olduğu görülmektedir.

Yenidoğan buzağılarda ishallerin oluşmasında yaş, ırk ve cinsiyet önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. Yenidoğan döneminin ilk iki haftası ishallerin olduğu riskli bir dönemdir. BRV için 1-7 günlük dönemde pozitiflik oranının en yüksek olduğunu belirten birçok çalışma vardır (2, 3, 14, 18, 23). Bu çalışmada da yapılan diğer çalışmalara benzer olarak BRV en çok 1-7 gün, BCoV ise 8-15 gün yaştaki hayvanlarda saptanmıştır.

Money ve ark. (33), erkek hayvanlarda BRV ve BCoV pozitifliğinin dişilere kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmelerine rağmen diğer çalışmalarda ise dişi ve erkeklerdeki pozitiflik oranlarında bir fark bulamamıştır (29, 34). Çitil ve ark. (35) yerel sığır ırklarındaki ishal görülme oranının (%38) simental ırklara (%29.9) kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda da cinsiyetin yenidoğan buzağı ishallerinde önemli bir risk faktörü olmadığı, benzer şekilde simental, simental melez ve montafon melez ırklarındaki pozitiflik oranlarının da birbirine benzer olduğu yani ırka bağlı bir riskin bulunmadığı da belirlenmiştir.

Ülkemizde Elazığ il ve ilçelerindeki yenidoğan buzağı ishallerinde BRV ve BCoV'un araştırıldığı tek çalışma 2012 yılında Al ve Balıkcı (23) tarafından yapılmış ve hızlı test kiti kullanılarak 30 adet yenidoğan ishalli buzağılarda %30 oranında BRV, %13 oranında BCoV ve %3.4 oranında miks enfeksiyon tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise Elazığ ve çevre iki ilde yenidoğan buzağı ishallerindeki BRV oranı %24.3, BCoV

oranı %13.5 ve miks enfeksiyon oranı %9.5 olarak belirlenmiş ve bu bölgedeki BRV ve BCoV oranının halen benzer düzeyde olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, Elazığ, Malatya ve Diyarbakır illerin de BRV ve BCoV nedenli yenidoğan ishal olgularının halen önemli oranlarda görülmekte olduğu, ishale bağlı

buzağı kayıplarının ve verim düşüklüğünün azaltılması için aşılama programlarının uygulanması gerekliliği sonucuna varılmıştır. Ayrıca etkin aşı suşlarının seçimi için bölgede sirküle olan BRV ve BCoV genotiplerinin belirlenmesine yönelik moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Şahal M, Terzi OS, Ceylan E, Kara E. Buzağı ishalleri ve korunma yöntemleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi 2018; 58: 41-49.
2. Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SVS. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. Vet Res Commun 2009; 33: 1-23.
3. Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ. Veterinary Virology. 3rd Edition, Cambridge: Academic Press, 1999.
4. Can Şahna K, Alkan F. Sığırlarda Rotavirus Enfeksiyonunun Epidemiyolojisinde Gebeliğin Rolü. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2003; 17: 203-209.
5. Shin J, Tark D, Le VP, et al. Genetic characterization of bovine coronavirus in Vietnam. Virus Genes 2019; 55: 415-420.
6. Woo PCY, Susanna KP, Lau YH, Kwok YY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Exp Biol Med 2009; 234: 1117-1127.
7. Fung TS, Mei H, Ding XL. Coronavirus-induced ER stress response and its involvement in regulation of coronavirus-host interactions. Virus Res 2014; 194: 110-123.
8. Soltan MA, Tsai YL, Lee PA, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, Real Time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. J Virol Methods 2016; 235: 99-104.
9. Alkan F, Ozkul A, Bilge-Dağalp S, et al. The detection and genetic characterization based on the S1Gene region of BCoVs from respiratory and enteric infections in Turkey. Transbound Emerg Dis 2011; 58: 179-185.
10. Pang XL, Lee B, Boroumand N, et al. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. J Med Virol 2004; 72: 496-501.
11. Decaro N, Elia G, Campolo M, et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. J Virol Methods 2008; 151: 167-171.
12. Özdamar K. SPSS ile Biyoistatistik. 3. Baskı, Eskişehir: Kaan Kitapevi, 1999.
13. Snodgras DR, Terzolo HR, Sherwood D, et al. Aetiology of diarrhoea in young calves. Vet Rec 1986; 119: 31-34.
14. Garcia A, Ruiz JA, Orden JA, et al. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. Comp Immun Microbiol Infect Dis 2000; 23: 175-183.
15. Bendali F, Bichet H, Schelcher F, Sanaa M. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in South-west France. Vet Res 1999; 30: 61-74.
16. Abraham G, Roeder PL, Zewdu R. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. Trop Anim Heal Prod 1992; 24: 74-80.
17. Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoglu T. Yenidoğan ishalli buzağılarda rotavirusların electron mikroskopi (EM), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. AÜ Vet Fak Derg 1995; 42: 491-498.
18. Alkan F. Buzağı ishallerinde rotavirus ve corona virusların rolü. AÜ Vet Fak Derg 1998; 45: 29-37.
19. Çabalar, M, Kaya A, Arslan, S. Yenidoğan buzağuların ishal olgularında rotavirüs ve coronavirus araştırılması. Veteriner Bilimleri Dergisi 2007; 23: 103-106.
20. Erdoğan HM, Ünver A, Güneş V, Çitil M. Frequency of rotavirus and coronavirus in neonatal calves in Kars district. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2003; 9: 65-68.
21. Ok M, Güler L, Turgut K, et al. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of escherichia coli strains by multiplex PCR. Zoonoses Public Health 2009; 56: 94-101.
22. Duman R, Ayca AE. Prevalance of rotavirus infections in calves with diarrhea in Konya region. J Anim Vet Adv 2010; 9: 136-138.
23. Al M, Balıkcı E. Neonatal ishalli buzağılarda rotavirüs, coronavirus, E.coli K99 ve cryptosporidium parvum'un hızlı test kitleri ile teşhisi ve enteropatogen ile maternal immünite ilişkisi. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2012; 26: 73-77.
24. Kozat S, Tuncay İ. Siirt yöresindeki yenidoğan ishalli buzağılarda rotavirus, coronavirus, Cryptosporidium Spp, Escherichia coli K 99 ve Giardia lamblia etkenlerinin prevalansı. Van Veterinary Journal 2018; 29: 17-22.
25. Kaya U, Coşkun A. Tokat bölgesindeki neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinin belirlenmesi. Manas Journal of Agr Vet Life Sci 2018; 8: 75-80.
26. Aydın H, Timurkan MÖ. Buzağı ishallerinde coronavirusun nükleoprotein gen ve rotavirusun VP7/VP4 gen bölgelerinin kısmi sekansı ve filogenetik analizi. AÜ Vet Bil Derg 2018; 13: 211-218.
27. Küliğ C, Coşkun A. Sivas ve ilçelerindeki neonatal ishalli buzağılarda E. coli, Cryptosporidium, Clostridium perfringens, rotavirüs ve coronavirus prevalansı. Turkish Veterinary Journal 2019; 1: 69-73.
28. Aksoy E, Kara E, Yagcı BB, Azkur AK. Investigation of Bovine Coronavirus and Bovine Rotavirus in calves with neonatal diarrhea in Kırıkkale and surrounding Provinces. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2021; 9: 38-46.

29. Berber E, anakođlu N, Sözdutmaz İ, et al. Seasonal and age-associated pathogen distribution in newborn calves with diarrhea admitted to ICU. *Vet Sci* 2021; 8: 128-135.
30. Ateş Ö, Yeşilbağ K. Neonatal buzağı ishal olgularında enterik virusların (BRV, BCoV, BVDV, BToV) oklu enfeksiyonu *J of Res in Vet Med* 2022; 41: 133-142.
31. Pestil Z, Gülyaz V, Hasöksüz M. (2016). Marmara bölgesinde yeni doğan buzağı ishallerinde bovine coronavirusların saptanması ve patojenite alışması. *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2016; 27: 16-20.
32. Ammar MS. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in Western Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014; 4: 318-322.
33. Monney JD, Adjogoua EV, Karamoko Y, Akran A. Incidences of calf diarrhea and the associated risk factors in ivory coast (2015–2017). *IJAVMS* 2020; 19: 454-461.
34. Uhde FL, Kaufmann T, Sager H, et al. Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *Vet Rec* 2008; 163: 362-366.
35. itil M, Gunes V, Karademir B. 1996-2001 yılları arasında KAÜ Veteriner Fakóltesi İç Hastalıkları Kliniđine getirilen ishalli buzağılar üzerine retrospektif bir alışma. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2003; 9: 39-42.