



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2023; 37 (3): 217 - 221
http://www.fusabil.org

Songül ÇERİBAŞI^{1, a}
Hasan ABAYLI^{2, b}
Ali Osman ÇERİBAŞI^{1, c}
Kezban ŞAHNA^{2, d}

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

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-2331-6203

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

^c ORCID: 0000-0002-6096-4042

^d ORCID: 0000-0001-9211-5419

Elazığ Yöresinde Pnömonili Sığır Akciğerlerinde Respiratorik Koronavirüs Viral Antijenlerinin İmmunohistokimya ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Belirlenmesi *

Bu çalışmada Elazığ bölgesindeki sığırlardan alınan pnömonili akciğer örneklerinde histopatolojik, immunohistokimyasal ve Revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleriyle Sığır Koronavirüs (BCoV)'un varlığı ve yaygınlığının tespiti amaçlanmıştır. Makroskobik olarak pnömoni bulgusu gösteren 363 adet sığır akciğerlerinden alınan doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi. Mikroskobik olarak intersitisyel pnömoni tespit edilen akciğerlerde; interalveoler septumlarda kalınlaşma, mononükleer hücre infiltrasyonu, bronş epitelinde deskuamasyon, bronşioalveolar lenfoid doku (BALT) hiperplazisi, bronşiolitis obliterans ve sinsityal hücre formasyonları kaydedildi. İntersitisyel pnömoni olarak değerlendirilen akciğerlere immunohistokimyasal ve PCR analizleri uygulandı. İmmunohistokimyasal olarak BCoV viral antijenlerine 24 akciğerde rastlandı. Viral antijenlere bağlı spesifik boyanma daha yoğun olarak bronş ve bronşiyol epitelinde, peribronşioalveolar lenfoid dokuda, daha az olmak üzere ise intersitisyel bölgedeki mononükleer hücrelerde, interalveolar boşluktaki makrofaj ve sinsityal hücrelerde ve bronşiyol lümenindeki hücrel eksudatta tespit edildi. Yine sadece intersitisyel pnömoni örneklerinde gerçekleştirilen PCR analizlerinde klinik örnekler ait ampliconlarda pozitiflik saptanmadı. Her reaksiyonda BCoV pozitif kontrollerine ait ampliconlarda beklenen büyüklükte DNA fragmentleri görüldü (406 bp uzunlukta).

Anahtar Kelimeler: Sığır koronavirüs, intersitisyel pnömoni, PCR, immunohistokimya

Determination of Respiratory Coronavirus Viral Antigens by Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction (PCR) in Cattle Lungs with Pneumonia in Elazığ Region

In this study, it was aimed to determine the presence and prevalence of Bovine Corona Virus (BCoV) by histopathological, immunohistochemical and Reverse-transcription-polymerase chain reaction (PCR) methods in the lung samples with pneumonia taken from cattle in the Elazığ region. Tissue samples taken from 363 cattle lungs showing signs of pneumonia macroscopically were examined histopathologically. In the lungs with microscopic interstitial pneumonia; Thickening of the interalveolar septum, mononuclear cell infiltration, desquamation of the bronchial epithelium, bronchioalveolar lymphoid tissue (BALT) hyperplasia, bronchiolitis obliterans and syncytial cell formations were recorded. Immunohistochemical and PCR analyzes were performed on the lungs that were evaluated as interstitial pneumonia. Immunohistochemically, BCoV viral antigens were detected in 24 lungs. Specific staining due to viral antigens was detected more intensely in the bronchi and bronchiolar epithelium, peribronchioalveolar lymphoid tissue, and to a lesser extent in mononuclear cells in the interstitial region, macrophage and syncytial cells in the interalveolar space, and cellular exudate in the bronchiolar lumen. No positivity was detected in the amplicons of clinical samples in PCR analyzes performed only on interstitial pneumonia samples. DNA fragments of the expected size (406 bp in length) were seen in the amplicons of the BCoV positive controls in each reaction.

Key Words: Bovine coronavirus, interstitial pneumonia, PCR, immunohistochemistry

Geliş Tarihi : 12.06.2023
Kabul Tarihi : 13.07.2023

Giriş

Sığır koronavirüsü (BCoV), *Coronaviridae* ailesinde yer alan bir lipid zarfa sahip, tek sarmallı, pozitif duyarlı ve en büyük RNA genomuna sahip bir patojendir (1). BCoV'un fekal-oral ve solunum yoluyla bulaştığı, buzağılarda diyare, sığırlarda hemorajik ishal ile karakterize kış dizanterisi ve özellikle çeşitli yaş grubu besi sığırlarında solunum yolu enfeksiyonları şeklinde 3 farklı sendromdan sorumlu olduğu bildirilmiştir (2, 3). Son yıllarda insan ve hayvanlarda (yarasa, misk kedisi, rakun köpeği) enterik ve respiratorik enfeksiyonlarla ilişkili şiddetli akut solunum sendromu (SARS-CoV-2) ve Orta Doğu respiratorik sendromlarına (MERS) neden olan yeni korona virüs tipleri keşfedilmiştir (4-6).

Solunum sisteminde BCoV ilk defa 1993 yılında izole edilmiş ve nakil sonrası ortaya çıktığı bildirilmiştir (3, 7). BCoV'lar, enfekte sürülerde taşıyıcı hayvanların varlığı

Yazışma Adresi Correspondence

Songül ÇERİBAŞI
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Patoloji Ana Bilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

songulozer@firat.edu.tr

* 8. Uluslararası 19 Mayıs Yenilikçi Bilimsel Yaklaşımlar Kongresi, 23-24 Kasım 2022, Samsun/TÜRKİYE.

nedeniyle dünya genelinde yüksek bir prevalansa sahiptir (8, 9). BCoV üst solunum sistemi, akciğer ve bağırsak epitelini enfekte ederek, enterik form fekal-oral yolla, respiratorik form solunum yolu ile bulaşmaktadır (10-14). Ek olarak, BCoV besi sığırlarında düşük büyüme performansına, Sığırların respiratorik hastalık kompleksi (BRDC) ile buzağılarda ölüme bağlı önemli ekonomik kayıplara ve hayvan refahının azalmasına neden olur (2, 3, 8, 15). Koronavirüs enfeksiyonlarında klinik olarak; ateş, ishal, rinitis, dispne, anoreksi, öksürük ve süt veriminde azalma bildirilmiştir (12, 13, 16, 17). BCoV ile enfekte sığırlarda makroskopik olarak kranial akciğer loblarında konsolidasyon, fibrinli plöritis ile trakea mukozasında peteşiyal kanama ve mukopurulent eksudat meydana geldiği saptanmıştır (18). Mikroskopik olarak BCoV'ün solunum yollarında; trake epitelinde nekroz ve deskuamasyon, akciğerde bronşioler mononükleer hücre infiltrasyonu, BALT hiperplazisi, bronş ve bronşiol epitelinde nekroz ile karakterize interstisyel veya fibrinonekrotizan pnömoni oluşumuna öncülük ettiği ortaya konmuştur (3, 18-21).

Elazığ yöresindeki sığırlarda pnömoniye neden olan BCoV'e yönelik daha önceden yapılmış serolojik, immunohistokimyasal (IHC) ve PCR temelli bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile Elazığ yöresindeki sığır pnömonilerinde BCoV'lerin tespiti, yaygınlığı ve bu etkenin rol oynadığı pnömonilerde histopatolojik, immunohistokimyasal ve PCR bulgularının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 04/01/2017 tarih ve Karar No:01 ile çalışmanın mezbaha materyali ve ölü hayvan dokusu ile çalışıldığı için Etik Kurul Onayı alınmasına gerek olmadığı bildirilmiştir.

Elazığ bölgesinde yerel bir mezbahadan toplanılan 2054 sığır akciğeri incelendi. Makroskopik incelemede pnömoni bulgusu gösteren 363 adet sığır akciğerinden alınan doku örnekleri 2 parçaya ayrılarak bir kısmı histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için tespit solüsyonuna alındı; diğer kısmı ise PCR analizleri için -80°C dondurucuda depolandı. Yüzde 10'luk tamponlu formaldehitte tespit edilen dokulardan parafin bloklar hazırlanarak, 5 mikron kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eosin yöntemi ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopunda incelenerek histopatolojik bulgulara göre; interstisyel, fibrinli, kataral-purulent ve granümatöz olarak sınıflandırıldı. Sınıflandırma sonunda sadece interstisyel pnömoni olarak değerlendirilen akciğerlere viral antijenlerin tespiti amacıyla RT-PCR deneyleri ve immunohistokimyasal boyama yapıldı.

İmmunohistokimyasal (IHC) Yöntem: IHC boyamada Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) metodu, ilgili firmanın yöntemine göre uygulandı (Ultravision Detection System, Antipolyvalent, HRP/DAB, Thermo Scientific, Cat No: TP-015-HD) . Parafin kesitler polylisinli lamlara alındıktan sonra 1 gece oda ısısında kurutan kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek

deparafinize ve dehidre edildi. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması için 0.01 M sodyum sitrat içerisinde 20 dk inkübe edilerek daha sonra PBS ile yıkanıp endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metil alkol ile hazırlanan %3 hidrojen peroksit içerisinde 10 dk inkübasyona bırakıldı. Nonspesifik bağlanmaları engellemek amacıyla %1 normal keçi serumunda 1 saat bekletildi. Ardından kesitler; üretici firma prosedürüne göre PBS ile anılan primer antikor (Monoklonal Mouse Bovine Korona virüs antikor, Katalog No: BC6-4A, RTI Reagents) ile 1 gece süre ile 4°C'de inkübe edildi. Tekrar PBS'de yıkanan kesitler Biotinlenmiş sekonder antikor (Thermo Scientific, Cat No: TP-015-BN) damlatılarak 10 dk sürede bekletildi. Ardından dokular PBS ile yıkanarak ve Streptavidin peroksidaz (Thermo Scientific, Cat No: TS-015-HR) ile 10 dk süre ile muamele edildi. Renk ortaya çıkarıcı substrat olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Thermo Scientific, Cat No: TA-001-HCX) kullanıldı. Bu solüsyon kesitler üstüne uygulandıktan sonra renk değişikliği oluşmaya başladığı anda reaksiyon durdurularak, Mayer Hematoksilen ile 2 dk boyandıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile lamel kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

RT-PCR Bulgularının Değerlendirilmesi:

Örnekler: Histopatolojik olarak interstisyel pnömoni olarak değerlendirilen akciğer doku örneklerinde BCoV nükleik asitleri reverz transkriptaz-PCR yöntemi ile araştırıldı

RNA Ekstraksiyonu: Dokularından RNA ekstraksiyonu yapmak için Invitrogen doku RNA Ekstraksiyon kiti TRIzol (Katalog no: 15596026, Thermo Fisher, MA, ABD) kullanıldı ve kitin talimatı doğrultusunda RNA izolasyonları gerçekleştirildi.

Viral RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) elde etmek amacıyla RevertAid First Strand cDNA kiti (Thermo Scientific, Almanya) kullanıldı ve üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı.

RT-PCR: BCoV için Cho ve ark. (2)'nın bildirdiği primerler ve yöntem, kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo1). PCR sonrası elde edilen ürünler agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulup UV ışık altında 406 bp büyüklüğündeki bantlar BCoV pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 1. BCoV PCR amplifikasyon ürünleri, primer dizileri ve uzunlukları (2)

Primer	Primer dizisi	Büyükölük	Bağlanma Isısı
N gen-F	GCAATCCAGTAGTAGAGCGT	700	50
N gen-R	CTTAGTGGCATCCTTGCCAA		
nested-F	GCCGATCAGTCCGACCAATG	400	55
nested-R	AGAATGTCAGCCGGGTAG		

Bulgular

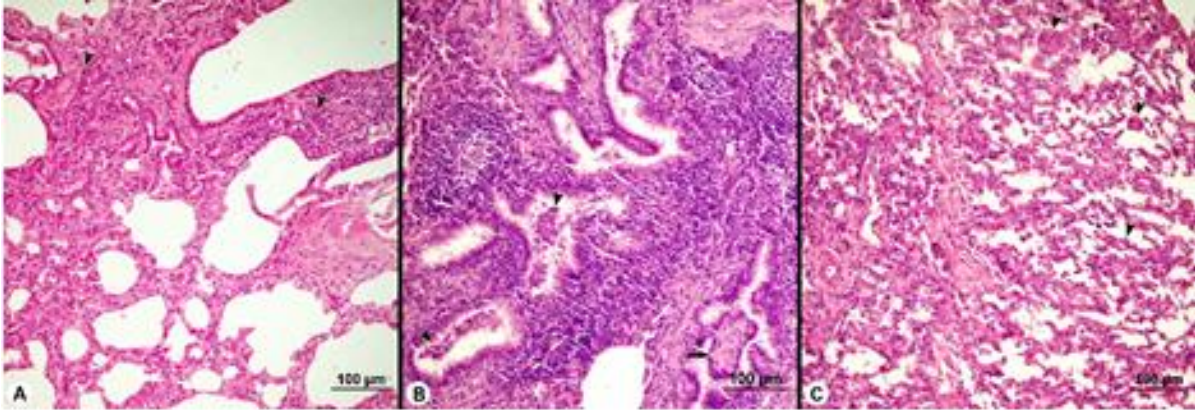
Makroskopik olarak pnömoni bulgusu gösteren 363 adet sığır akciğerinden alınan doku örnekleri ışık mikroskopunda incelenerek histopatolojik bulgulara göre;

159 intersitisyel (%43.80), 96 fibrinli (%26.45), 87 kataral-purulent (%23.97) ve 21'i granülatöz (%5.78) olmak üzere sınıflandırıldı. İntersitisyel pnömonilerde interalveoler septumlarda kalınlaşma (Şekil 1A), mononükleer hücre infiltrasyonu, bronş epitelinde deskuamasyon, bronşioalveolar lenfoid doku (BALT) hiperplazisi, bronşiolitis obliterans genel histopatolojik değişimler olarak kaydedildi (Şekil 1B). Plöritisin eşlik ettiği pnömonilerde; alveol lümenlerinin yulaf hücreleri ve fibrinli eksudat ile dolu olduğu dikkati çekti. Kronik intersitisyel pnömoni olgularında ise alveol lümenlerinde nötrofil, alveoler makrofaj ve mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttu. Birkaç olguda ise bronşiyol ve alveolar boşluklarda sinsityal hücre formasyonları dikkati çekti (Şekil 1C).

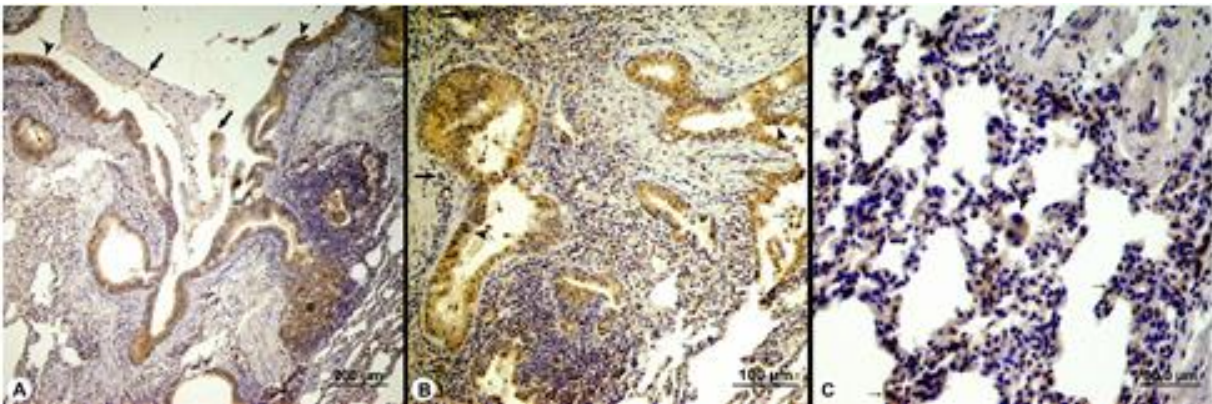
IHC ile intersitisyel pnömoni olarak değerlendirilen 159 akciğer dokusundan; BCoV viral antijenlerine 24 (%15) akciğerde rastlandı. Viral antijenlerin genellikle lezyonlu alanlarda bulunduğu dikkati çekti. Viral antijenlere bağlı spesifik boyanma daha yoğun olarak bronş ve bronşiyol epiteli ile peribronşiyoler lenfoid dokuda dikkati çekti (Şekil 2A). Daha az olarak ise intersitisyel bölgedeki mononükleer hücrelerde, alveolar makrofaj ve bronşiyol lümenindeki hücresel eksudatta tespit edildi (Şekil 2B). Perivasküler mononükleer hücre

infiltrasyonları ile bronşiyal bez epitelinde immunopozitivite mevcuttu. Ayrıca bronşiyol ve alveol lümenlerindeki sinsityal hücrelerde de pozitif boyanmalara rastlandı (Şekil 2C). Hafif şiddette BCoV pozitifliğine ise bronşa ait kıkırdak dokuda dikkati çekti.

İntersitisyel pnömoni örneklerinde gerçekleştirilen PCR analizlerinde doku kesitlerinden antijenik deteksiyon testlerinin yapılması sonrasında, BCoV antijeni taşıyan dokulardan TRizol (Thermo Fisher, MA, ABD) reagent ile kitin talimatı doğrultusunda RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen RNA spektrofotometrede miktarlanarak BCoV spesifik primerleri ile One Step RT-PCR master miksi (Qiagen, Hilden, Almanya) içeren RT-PCR karışımında templeyt olarak kullanıldı. Deney için ısı protokolleri referansta belirtildiği gibiydi. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalındaki pozitif kontroller ve negatif kontroller (templeytsiz PCR miksi) RT-PCR aşamasında çalışmaya dahil edildi. Agaroz jel elektroforez aşamasında 100 bp DNA merdiveni (NEB, MA, ABD) ile eş zamanlı koşturulan klinik örnekler için amplikonlarda pozitiflik saptanmadı. Her reaksiyonda BCoV pozitif kontrollerine ait amplikonlarda beklenen büyüklükte DNA fragmentleri görüldü (406 bp uzunlukta).



Şekil 1. A. İnteralveolar septumlarda kalınlaşma ve mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başları), **B.** Bronşiyol epitelinde nekroz ve deskuamasyon (ok başları) ile birlikte bronşiolitis obliterans (ok), **C.** Alveolar boşlukta sinsityal hücre formasyonları (ok başları), HE X 100.



Şekil 2. A. Bronş epitelinde (ok başları), bronş lümenindeki deskuame epitel hücrelerinde (kalın oklar), bronşiyal bez epitelinde (ince ok) ve peribronşiyal lenfoid dokuda (asteriks) BCoV immünopozitifliği, ME X 50, **B.** Bronşiyol epitelinde (ok başları), intersitisyel

mononükleer hücre infiltrasyonlarında (kalın ok), nekrotik bronşiyol epitelinde (ince oklar) ve peribronşiyoler lenfoid dokuda BCoV pozitifliği, ME X 100, C. Alveol epitelinde (ince oklar) ve sinsityal hücrede BCoV immüno pozitifliği, ME X 200.

Tartışma

Bu çalışma ile Elazığ ilindeki sığır pnömonilerinde BCoV'un varlığı ve yaygınlığı IHC ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. BCoV enfeksiyonları enfekte hayvan dokularında, sekresyonlarında veya dışkılarında enfektif virüs, viral antijen veya viral RNA saptanarak teşhis edildiği vurgulanmıştır (12). BCoV ile ilişkili sindirim sistemi enfeksiyonlarında dışkı numunelerinde teşhis amacıyla en duyarlı test yöntemi RT-PCR olarak bildirilmiştir (7). Solunum ve bağırsak dokularında viral antijenlerin tespiti amacıyla BCoV hiperimmün serumu ya da monoklonal antikorlar kullanılarak immünofloresan veya IHC boyama yapılmaktadır (19). Koronavirüslerin sindirim sistemine olan etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunmakta birlikte, IHC (19, 20) ve immünofloresan (9, 19, 22) yöntemlerle virüsün solunum sisteminde yerleşimi gösteren çalışmalar sınırlıdır. BCoV'un sığır popülasyonlarında yüksek seropozitiflik düzeyleriyle (%82-90) seyrettiği bilinmektedir (23, 24). Ülkemizde sığırlarda BCoV enfeksiyonlarının varlığı farklı analizlerle daha önceden birçok çalışma ile ortaya konmuştur (12, 25-29). Sığırlarda BCoV seroprevalansı %4.4-100 arasında saptanırken (12, 25-29), Diyarbakır ilinde 433 sığır üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada BCoV seropozitifliği %75.5 olarak tespit edilmiştir (24). Sunulan çalışmada 159 intersitisyel pnömonili akciğer dokusunda %15 oranında IHC olarak BCoV antijenleri tespit edilmiştir. Diğer taraftan sığır akciğer örneklerinde RT-PCR ile yapılan virolojik analizlerde pozitif sonuç bulunamamıştır. Bu durum örneklenen hayvanlar arasında BCoV ilişkin viremi safhasında akut bir enfeksiyonun bulunmadığına yorumlanmıştır. Akut geçici doğal BCoV enfeksiyonlarında örneklerin hastalığın başlangıcında veya hemen sonrasında alınması gerektiği vurgulanmıştır (2, 3). Ek olarak Erzurum bölgesinde pnömonili sığırlardan alınan akciğer doku örneklerinde RT-PCR ile pozitiflik tespit edilmezken, nazal swab örneklerinde ise %20.4 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (27).

Histopatolojik olarak BCoV'un; akciğerde bronşiyoler mononükleer hücre infiltrasyonu, bronş ve

bronşiyol epitelinde nekroz, sinsityal hücre formasyonları ile karakterize intersitisyel pnömoni oluşumuna öncülük ettiği, daha önce yapılan doğal ve deneysel çalışmalarda ortaya konmuştur (3, 18, 22, 30). Sunulan çalışmada da akciğerde benzer histolojik lezyonlara rastlanılmıştır. BRDC'nin meydana gelmesinde solunum yolunu etkileyen birden fazla virüs ve bakteriyel patojenin katkıda bulunduğu; bu sendrom için ayırıcı tanının gerekli olduğu vurgulanmıştır (7). Sığırlarda solunum yolunu etkileyen parainfluenza tip 3, respiratorik sinsityal virüs, herpes virüs tip 1, adeno virüs gibi viral enfeksiyonlarda (31) ve insanlarda SARS-CoV-2 ilişkili pnömonilerde akciğerde inklüzyon cisimcikleri tespit edilmiş (5), ancak sığırlarda BCoV etiyojili pnömoni olgularında (32) ve sunulan çalışmada inklüzyon cisimciklerine rastlanmamıştır. Bu durum solunum yolunu etkileyen diğer viral ajanlarla BCoV kaynaklı pnömonilerin ayırıcı teşhisinde kullanılabilecek bir kriter olarak değerlendirilebilir.

Daha önceki çalışmalarda; BCoV ilişkili pnömonilerde IHC olarak viral antijenlere trake, bronş, bronşiyol ve alveol epitelinde, nazal, trake ve akciğer lümenine dökülmüş dejeneratif ve nekrotik epitelde rastlanmıştır (13, 19, 20, 32, 33). Sunulan çalışmada da IHC ile akciğer dokusunda viral antijenlere önceki çalışmalara benzer dağılım gözlenmiş; ek olarak ise peribronşiyoler lenfoid doku, bronş bez epiteli, peribronşiyal kıkırdak doku ve sinsityal hücrelerde pozitiflik tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Elazığ yöresindeki sığırlarda pnömoni oluşumunda BCoV antijeni varlığının göz ardı edilemeyecek kadar yüksek oranda olduğu belirlenmiş ve özellikle besi sığırlarında BRDC'e göre alınacak koruma ve tedavi tedbirleri içerisinde bu viral ajana da yer verilmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür. Özellikle sığırlarda çok etkenli BRDC durumlarında RT-PCR yöntemi ile RNA virüs antijenlerinin ortaya konulmasındaki güçlükler göz önüne alındığında, immunohistokimyasal yöntemin BCoV ilişkili pnömonilerin teşhisinde geçerli bir metot olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Saif LJ. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: An enigma resolved? *Cornell Vet* 1990; 80: 303-311.
2. Cho KO, Hasöksüz M, Nielsen PR, et al. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch Virology* 2001;146: 2401-2419.
3. Hasoksuz M, Hoet AE, Loerch SC, et al. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *J Vet Diagn Invest* 2002;14: 308-313
4. Saif LJ, Jung K. Comparative pathogenesis of bovine and porcine respiratory coronaviruses in the animal host species and SARS-CoV-2 in humans. *J Clin Microbiol* 2020; 58: 3291-3298.
5. Zeng Z, Xu L, Xie XY, et al. Pulmonary pathology of early-phase COVID-19 pneumonia in a patient with a benign lung lesion. *Histopathology* 2020; 77: 823-831.
6. Vlasova NA and Saif LJ. Bovine coronavirus and the associated diseases. *Frontiers in Veterinary Sciences* 2021; 8: 643220
7. Saif, LJ. Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2010; 26: 349-364.
8. Clark MA. Bovine coronavirus. *Br Vet J* 1993; 149: 51-70.
9. Saif, LJ, Redman DR, Morehead PD, et al. Experimental coronavirus infections in calves: Viral replication in the

- respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res* 1986; 47: 1426-1432.
10. Alkan F, Özkul A, Karaoğlu T, ve ark. Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1997; 44: 1-8.
 11. Alkan F. Buzağı ishallerinde rotavirus ve coronavirusların rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1998; 45: 29-37.
 12. Hasöksüz M, Kayar A, Dodurka T, et al. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica* 2005; 53: 137-146.
 13. Park SJ, Kim GY, Choy HE, et al. Printed in The Netherlands Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch Virol* 2007; 152: 1885-1900.
 14. Nicola D, Campolo M, Desario C, et al. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *Vet Diagn Invest* 2008; 20: 28-32.
 15. Zhu Q, Li B, Sun D. Advances in bovine coronavirus epidemiology. *Viruses* 2022; 14: 1109.
 16. Storz J, Purdy CW, Lin X, et al. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotidal viruses, and *Pasteurella* spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 1599-1604.
 17. Alkan F, Bilge DS, Can ŞK, ve ark. Sığırlarda coronavirus enfeksiyonunun epidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2003; 50: 59-64.
 18. Hick PM, AJ Read, I Lugton, et al. Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease. *Australian Veterinary Journal* 2012; 90: 381-386.
 19. Heckert RA, Saif LJ, Hoblet KA, et al. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Vet Microbiol* 1990; 22: 187-201.
 20. Soules KR, Rahe MC, Purtle L, et al. Bovine coronavirus infects the respiratory tract of cattle challenged intranasally. *Front Vet Sci* 2022; 9: 878240.
 21. Storz J, Stine L, Liem A, et al. Coronavirus isolation from nasal swabs samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208: 1452-1454.
 22. Hansa A, Rai RB, Wani MY, et al. Pathology and diagnosis of corona virus infection in bovine. *Indian J Vet Pathol* 2012; 36: 129-135.
 23. Suzuki T, Otake Y, Uchimoto S, et al. Genomic characterization and phylogenetic classification of bovine coronaviruses through whole genome sequence analysis. *Viruses* 2020; 12: 183.
 24. Kadiroğlu B, Aytoğu G, Yeşilbaş K. Diyarbakır ilinde yetiştirilen ruminantlarda solunum sistemi viruslarının seroprevalansı ve pestivirus varlığının araştırılması. *J Res Vet Med* 2020; 39: 26-33.
 25. Okur GS, Yazıcı Z, Albayrak H, et al. Rotavirus and coronavirus prevalence in healthy calves and calves with diarrhea. *Medycyna Wet* 2007; 63: 62-64.
 26. Alkan F, Ozkul A, Dagalp BS et al. The detection and genetic characterization based on the S1 gene region of BCOVs from respiratory and enteric infections in Turkey. *Transboundary and Emerging Diseases* 2011; 58: 179-185.
 27. Timurkan MA, Aydın H, Belen S. Erzurum bölgesinde sığırlarda respiratorik coronavirus enfeksiyonunun RT-PCR ile tespiti ve moleküler karakterizasyonu. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg* 2015; 10: 186-192.
 28. Yavru S, Yapıcı O, Kale M, et al. Bovine coronavirus (BoCV) infection in calves with diarrhoea and their dams. *Acta Sci Vet* 2016; 44: 1-7.
 29. Yıldırım Y, Dağalp SB, Tan M, et al. Seroprevalence of the rotavirus and corona virus infections in cattle. *J Anim Vet Adv* 2008; 7: 1320-1323.
 30. Amoroso MG, Lucifora G, Degli UB, et al. Fatal interstitial pneumonia associated with bovine coronavirus in cows from Southern Italy. *Viruses* 2020; 12: 1331.
 31. Çeribaşı AO, Özkaraca M, Çeribaşı S, et al. Histopathologic, immunoperoxidase and immunofluorescent examinations on natural cattle pneumonia originated from Parainfluenza type 3, Respiratory Syncytial virus, Adenovirus type 3 and Herpesvirus type 1. *Rev Med Vet* 2014; 165: 201-212.
 32. Kalkanov I, Dinev I, Todorova K, et al. Ultrastructural and immunohistochemical investigations in calves with Coronavirus pneumoenteritis syndrome. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2018; 24: 791-797.
 33. Rahe MC, Drew RM, Thrush GJ, et al. Bovine coronavirus in the lower respiratory tract of cattle with respiratory disease. *J Vet Diagn Invest* 2022; 34: 482-488.