



doi: 10.33188/vetheder.1094617

Araştırma Makalesi / Research Article

Alt solunum yolu enfeksiyonu olan köpeklerde canine coronavirusun tespiti ve moleküler karakterizasyonu

Fırat DOĞAN^{1,a*}, Serkan İrfan KÖSE^{2,b}

¹ Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

² Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

ORCID: 0000-0001-8656-3645^a; 0000-0003-3189-6690^b

MAKALE BİLGİSİ /

ARTICLE
INFORMATION:

Geliş / Received:

28 Mart 22
28 March 22

Revizyon/Revised:

19 Nisan 22
19 April 22

Kabul / Accepted:

29 April 22
29 April 22

Anahtar Sözcükler:

Coronavirus
Köpek
PCR
Alt solunum yolu
enfeksiyonu

Keywords:

Coronavirus
Canine
PCR
Lower respiratory tract
infection

ÖZET:

Coronaviridae familyasında yer alan coronaviruslar insan ve hayvanlarda sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Alfacoronavirus içerisinde yer alan canine coronaviruslar (CCoV)'ın CCoV I ve CCoV II olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. CCoV-II ise CCoV- IIA ve IIB olmak üzere iki genotipe ayrılmaktadır. CCoV her yaşta ve her türlü beslenme şekline sahip köpekleri etkilemesine rağmen özellikle yeni doğan yavrular daha duyarlı ve ciddi şekilde etkilenmektedir. Yapılan literatür araştırmalarına göre ülkemizde özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarındaki canine coronavirus varlığının tespitine yönelik moleküler çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu tanımlanan barınak köpeklerinde CCoV'un tespiti ve moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlandı. Bu amaçla alt solunum yolu enfeksiyonu tespit edilen 40 adet barınak köpeğinden alınan Bronkoalveolar Lavaj (BAL) sıvıları incelendi. Test edilen 40 köpeğe ait BAL sıvılarından 3 tanesinde CCoV tespit edildi. Yapılan dizin analizi sonrasında elde edilen dizinler ile filogenetik ağaç yapıldı. Filogenetik ağaçta pozitif bulunan 3 örnekten 2 sinin CCoV-I, bir örneğin ise CCoV-II olduğu tespit edildi. Sonuç olarak bu çalışma ile barınak köpeklerinin alt solunum yolu rahatsızlıklarında CCoV-I ve CCoV-II' nin rol oynayabileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca aynı barınakta farklı hayvanlarda iki farklı CCoV'nun tespiti önemli bir veri olarak değerlendirilmiş olup özellikle barınak koşulları gibi kalabalık ortamda barındırılan köpeklerdeki her iki tipin tespiti gelecekte oluşabilecek yeni varyantların ya da alt tiplerin oluşabilmesi ihtimalinin de göz ardı edilmemesi gerektiğini göstermektedir.

Detection and molecular characterization of canine coronavirus in dogs with lower respiratory tract infection

ABSTRACT:

Coronaviruses in the family *Coronaviridae* cause digestive and respiratory system infections in humans and animals. There are two subtypes of canine coronaviruses (CCoV), which are included in the alfacoronavirus, as CCoV I and CCoV II. CCoV-II is divided into two genotypes, CCoV-IIA and IIB. Although CCoV affects dogs of all ages and all diets, newborn puppies can be particularly susceptible and severely affected. According to the literature research, no molecular studies have been found in our country for the detection of canine coronavirus, especially in lower respiratory tract infections. In this study, it was aimed to detect and molecular characterization of CCoV in shelter dogs with lower respiratory tract infection. For this purpose, Bronchoalveolar Lavage (BAL) fluids taken from 40 shelter dogs with lower respiratory tract infections were examined. CCoV was detected in 3 of the BAL fluids of 40 dogs tested. A phylogenetic tree was constructed with the sequences obtained after the sequence analysis. It was determined that 2 of the 3 positive samples in the phylogenetic tree were CCoV-I and one sample was CCoV-II. In conclusion, this study revealed that CCoV-I and CCoV-II may play a role in lower respiratory system disorders of shelter dogs. In addition, the detection of two different CCoVs in different animals in the same shelter has been considered as an important data, and the detection of both types in dogs housed in crowded environments such as shelter conditions shows that the possibility of new variants or subtypes that may occur in the future should not be ignored.

How to cite this article: Doğan F, Köse Sİ. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan köpeklerde canine coronavirusun tespiti ve moleküler karakterizasyonu. Vet Hekim Der Derg 2022; 93(2): 124-132 DOI: 10.33188/vetheder.1094617

* Sorumlu Yazar e-posta adresi / Corresponding Author e-mail address: fiat9837@gmail.com

1. Giriş

Coronaviridae familyasında yer alan coronaviruslar insan ve hayvanlarda sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Coronaviruslar *Nidovirales* takımında *Coronaviridae* familyasında alfacoronavirus, beta coronavirus, gama coronavirus ve delta coronavirus olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Coronavirusların genomu tek iplikçikli, pozitif polariteli, RNA'ya sahiptir. Alfacoronaviruslar içerisinde canine coronaviruslar ile birlikte farklı hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan coronaviruslar da yer almaktadır (1). CCoV kedi ve domuzların coronavirusları ile yakın ilişkili olduğu bildirilmektedir (2-4). Alfacoronavirus içerisinde yer alan canine coronaviruslar CCoV-I ve CCoV-II olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. CCoV-II ise CCoV-II a ve b olmak üzere iki genotipe ayrılmaktadır. Bazı gen düzeyinde yapılan çalışmalarda (özellikle Spike ve Transmembran M proteinlerine yönelik yapılan çalışmalar) FCoV ve CCoV arasında rekombinasyonların olabildiği bildirilmektedir (5). CCoV-IIa'nın kedilerin coronavirusları ile rekombinasyon sonucu ortaya çıkmış olabileceği ve CCoV IIb'nin ise domuzların coronavirusları ile rekombinasyon sonucu ortaya çıkmış olabileceği belirtilmektedir (4, 6). Coronavirusların temel olarak bulaşması fekal-oral yolla olmaktadır. Enterik coronaviruslarda klinik olarak başlangıçta akut bir diyare tablosu oluşmakta ve yaklaşık olarak iki hafta sürebilmektedir. Enterik CCoV lar genellikle orta dereceli ishale seyrederken Pantropic olarak adlandırılan CCoV IIa'nın köpek yavrularında ölümle seyredabilen yüksek virulense sahip olduğu belirtilmektedir (7- 8).

Coronaviruslar insanlar dahil bir çok hayvan türünde de solunum sistemi hastalıklarına da neden olmaktadır (9-10). Hatta bazen hayvanlarda ciddi bronkopnömoni tablosu şekillenebilmektedir (3). Klinik semptomların seyri bakteriyel, paraziter ve diğer viral enfeksiyonlar gibi sekonder enfeksiyonlar ile stresin varlığında daha da şiddetlenebilmektedir (11-13). CCoV her yaştaki ve her türlü beslenme şekline sahip köpekleri etkilemesine rağmen özellikle yeni doğan yavrular daha duyarlı ve ciddi şekilde etkilenebilmektedir. Hastalığın şiddetine göre de 1-3 gün içinde ölüm şekillenebilmektedir. Ülkemizde CCoV üzerine yapılan serolojik ve virolojik birçok çalışma bulunmasına (14-19) rağmen yapılan literatür araştırmalarına göre ülkemizde özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarındaki varlığının tespitine yönelik moleküler çalışmalara rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu tanımlanan köpeklerde CCoV'un tespiti ve moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlandı.

2. Gereç ve Yöntem

Örnekler:

Bu çalışma için etik kurul izni alınmıştır. Çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu tespit edilen 40 adet barınakta bulunan köpeklerden alınan Bronkoalveolar Lavaj (BAL) sıvıları incelendi. Örnek alınan hayvanlarda klinik olarak öksürük, seröz ve serö-müköz, purulent burun akıntısı, solunum güçlüğü, taşikardi, yüksek ateş gözlemlendi. Akciğer oskultasiyonunda alt solunum yolu enfeksiyonları ile uyumlu bulgular (yaş raller, ronkuslar vb.) tespit edildi. Hayvanlardan BAL sıvısı örnekleri kısa süreli anestezi altında alındı. Alınan örnekler hızlı bir şekilde soğuk zincir altında laboratuvara taşındı ve kullanılıncaya kadar -80 °C de saklandı. BAL örnekleri kullanılmadan önce 1 ml steril phosphate buffer salin (PBS) çözeltisi içerisinde sulandırıldı ve viral nükleik asit ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20 °C de bekletildi.

Viral nükleik asit ekstraksiyonu ve reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR):

BAL sıvılarından viral nükleik asit ekstraksiyonu için ticari nükleik asit ekstraksiyon kiti (Vivantis, Malezya) kullanıldı. Üretici firmanın belirtmiş olduğu protokol uygulandı. Kullanılan primer ve PCR şartları Pratelli ve ark. (20)'nin belirtmiş olduğu transmembran proteinine (M) yönelik tasarlanan primerler (CCV1: 5'-TCC AGA TAT GTA ATG TTC GG-3' CCV2: 5'-TCT GTT GAG TAA TCA CCA GCT-3' CCV3: 5'-GGT GTC ACT CTA ACA TTG CTT-3') kullanılarak heminested PCR yapıldı. cDNA sentezi için 20 ml çalışma hacminde 2.5 ml RNA, RT-PCR buffer (KCL

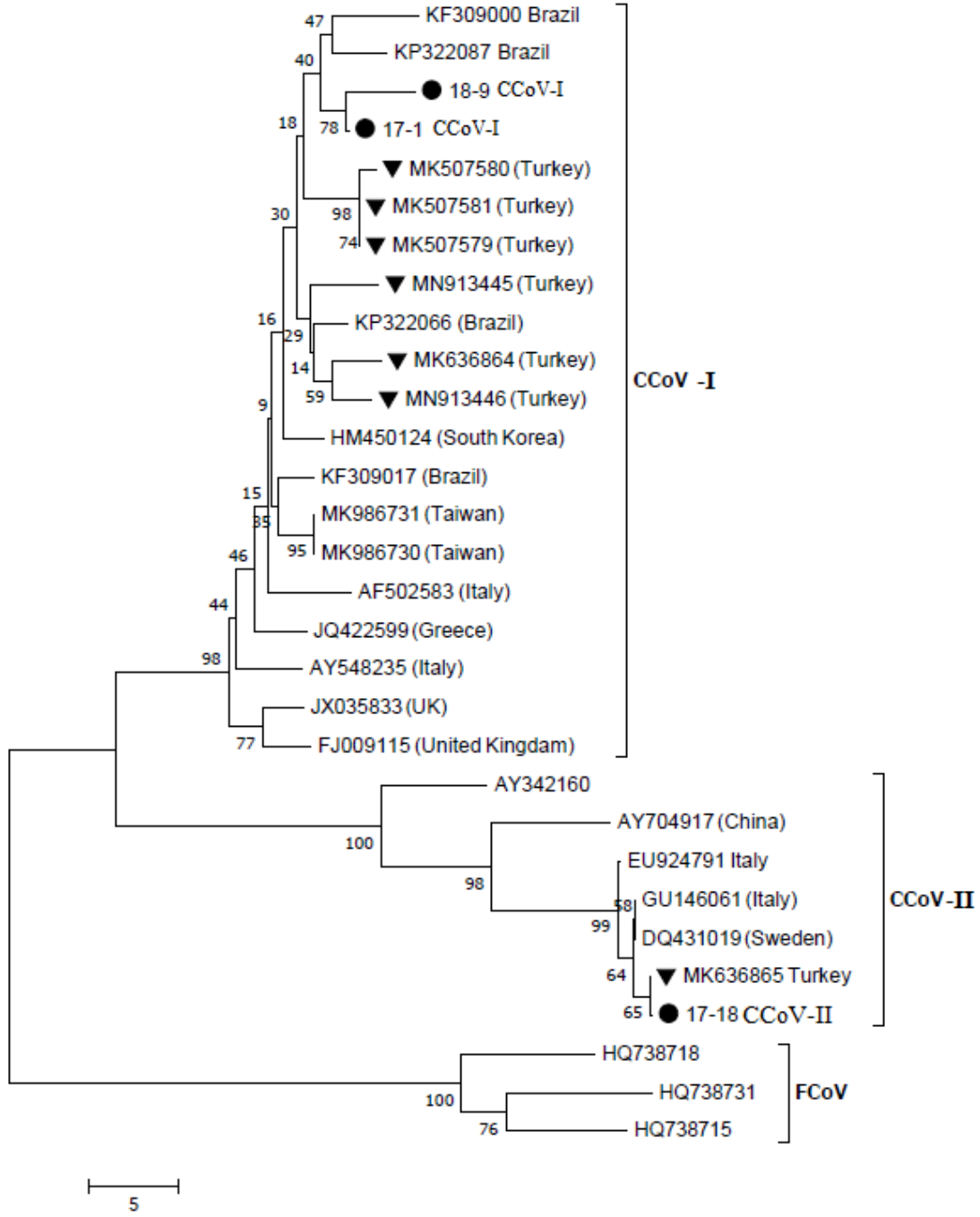
500mM, Tris –HCl 100mM, pH 8.3) 25mM MgCl₂, 1,25 mM dNTP, 50 U:ml RT, 0.6 mg:ml olacak şekilde hazırlandı. cDNA sentezi için hazırlanan bu karışım 37 °C de 30 dk ve 94 °C de 5 dk bekletildi. PCR reaksiyonu için ise 3 ml (50 ng) cDNA kullanıldı. PCR reaksiyonu karışımı 30 ml üzerinden hazırlandı. Bu karışım 2.5 U Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya), 3.5 mM dNTP miks (Fermentas, Litvanya), birinci turda CCV1 ve CCV2 olarak adlandırılan primerlerden ikinci turda ise CCV2 ve CCV3 olarak adlandırılan primerlerden 10 pmol, 1,5mM MgCl₂ ve 10X PCR buffer kullanıldı. PCR koşulları, 94 °C de 10 dk ön denatürasyon, daha sonra 40 siklus olacak şekilde 94 °C de 50 sn, denatürasyon basamağı, 51 °C de 55 sn bağlanma basamağı ve 72 °C de 50 sn uzama basamağı ve 72 °C de 10 dk son uzama basamağı olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1 lik içerisinde DNA bağlama boyası (Safe-Red; SafeView™ Cat No. G108-R, Kanada) bulunan agaroz jel hazırlanarak elektroforez uygulandı ve PCR ürünleri UV ışığı altında gözlemlendi.

Dizin analizi:

PCR ile pozitif bulunan örnekler özel bir firmadan (MEDSANTEK Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) hizmet alımı şeklinde dizin analizine tabi tutuldu. Dizin analizi yapılan örneklerin değerlendirilmesi Aliview (versiyon 1.28) adlı bilgisayar programı kullanılarak yapıldı (21). Elde edilen dizinlerin GenBank veri siteminde bulunan diğer benzer verilerle karşılaştırılması için NCBI (Natioanal Center for Biotechnology Information) 'ın BLAST (Basic Lenght Aligment Search Tool) arama motoru kullanıldı (22). Filogenetik ağaç yapılması için MEGA 7 programı kullanıldı. Bu amaçla FASTA formatına çevrilen tüm verilere Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Analizde p-distance parametresi kullanıldı. Benzerlik oranlarının değerlendirilmesinde SDTv1.2 programı kullanıldı.

3. Bulgular

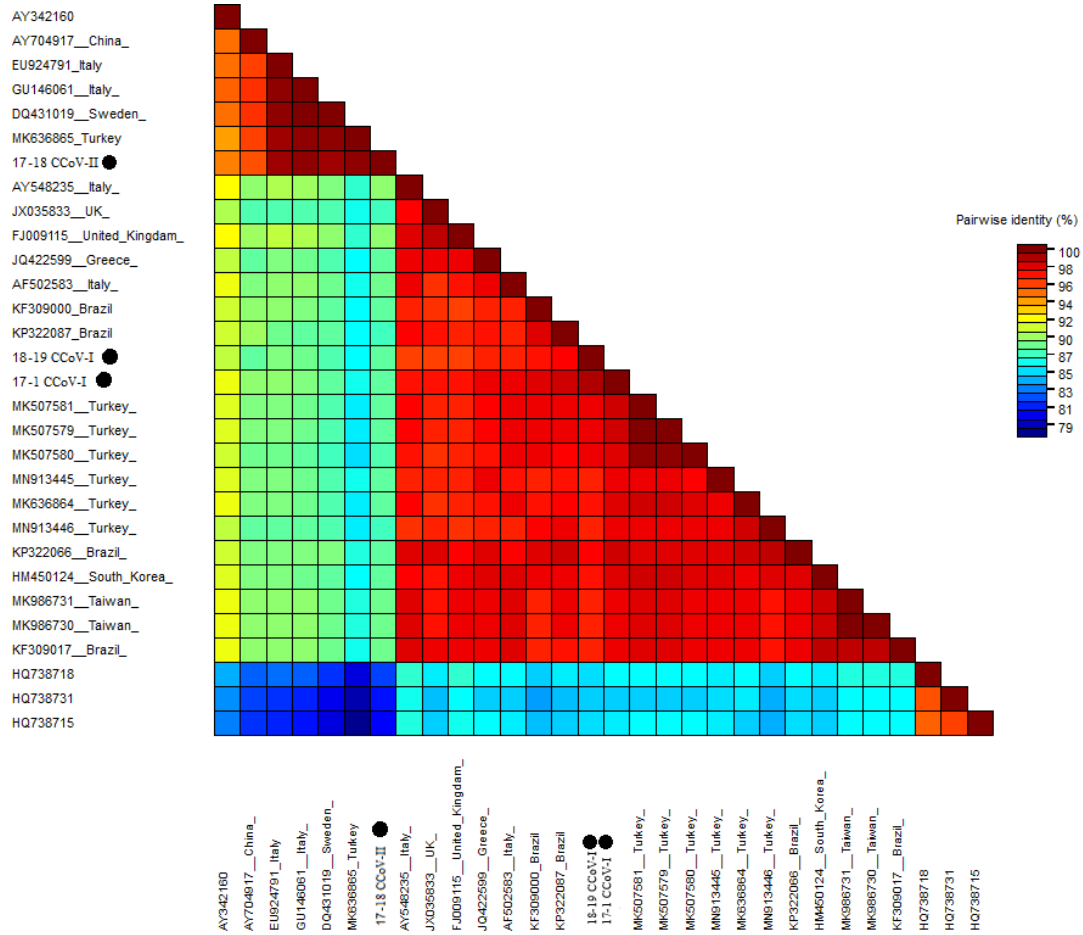
Test edilen 40 köpeğe ait BAL sıvılarından 3 tanesinde (%7,5) CCoV tespit edildi. Yapılan dizin analizi sonrasında elde edilen dizinler ile filogenetik ağaç yapıldı. Filogenetik ağaçta pozitif bulunan 3 örnekten ikisinin CCoV-I, bir örneğin ise CCoV-II olduğu tespit edildi (Şekil 1). Benzerlik oranları değerlendirildiğinde bu çalışmada tespit edilen CCoV-II' lerin farklı ülkelerden tespit edilen CCoV-II' ler ile %91,6-95,7 oranında benzer oldukları, Ülkemizde daha önce tespit edilen CCoV-II' ler ile ise %95,7 oranında benzer oldukları belirlendi. Aynı şekilde CCoV-I lerin benzerlik oranları yine ülkemizde ve diğer ülkelerde tespit edilen CCoV-I' ler ile örneklerle %93,2-94,6 oranında benzer oldukları belirlendi (Şekil 2).



Şekil 1: Kısmi M gen bölgesine göre yapılan filogenetik ağaç.
Figure 1: Phylogenetic tree constructed by partial M gene region.

●: Bu çalışmada tespit edilen canine coronaviruslar.

▼: Daha önce Türkiye' de tespit edilen canine coronaviruslar.



Şekil 2: M geni ile yapılan kısmi dizin analizi sonra elde edilen dizinlerin benzerlik oranları.

Figure 2: The similarity ratios of the sequences obtained after partial sequence analysis with the M gene.

● : Bu çalışmada tespit edilen dizinler.

4. Tartışma ve Sonuç

Tarihsel süreçte pet ya da çiftlik hayvanlarında birçok türü enfekte edebilecek viral ajanların bulunabileceği görülmüştür. Bunlar hayvanları, insanları, bitkileri ve hatta bakterileri dahi enfekte edebilmektedir (23). Bu viral ajanlar yeni ve yeniden önem kazanan viruslar olarak insan ve hayvan sağlığını her zaman tehdit edebilmektedir. Ülkemizde ve dünyada bu ve benzer birçok hayvan ve çeşitli paraziter canlı enfekte eden virusların araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (24). CCV özelinde bir çok farklı köpek viral hastalığı da ülkemizde tespit edilmiştir (25). Kennel Cough ya da infeksiyöz tracheobronşitis olarak bilinen köpek infeksiyöz solunum sistemi hastalığı kompleksi (CIRDC) köpeklerde akut seyirli ve köpeklerde yaygın bir şekilde görülmektedir (26). CIRDC de etkili olan patojenler arasında viruslar (Canine Adenovirus tip 2, Canine distemper virus, Canine herpesvirus 1, Canine influenza virus ve Canine coronavirus) ve bakteriler tek başlarına ya da birlikte etkili olmaktadır (27-30). Bu etkenler çoğunlukla enfekte köpeklerden solunum yoluyla bulaşmaktadır. Özellikle iyi havalandırılmamış ortamlarda barındırılan köpekler, hijyenik olmayan koşullarda barındırılan barınak köpekleri ve iyi havalandırılma sistemi olmayan veteriner hastaneleri köpekler için risk teşkil etmektedir (11-12, 28, 31-32). Köpeklerde tip I ve tip II olmak üzere iki tip coronavirus tespit edilmektedir. Bu iki tip tek başlarına enfeksiyona neden olabildikleri gibi birlikte de seyrebilirler. Bu tiplerin ayrımı S ve M genlerine yönelik yapılan moleküler yöntemlerle olmaktadır (33-34). Yapılan bu çalışmada da M geni düzeyinde analiz yapılmış olup aynı barınakta farklı hayvanlarda her iki alt tipin varlığı ortaya konulmuştur.

CCoV' ler doğal enfeksiyonlarda genel olarak gastro intestinal sistemi etkileyerek orta derecede gastroenteritise neden olmaktadır. Kusma ishal gibi semptomların yanı sıra bronkopneomania tablosuna da neden olduğu belirtilmektedir (3, 35). Solunum sistemi ile ilişkili coronaviruslar (Canine Respiratory Coronavirus (CRCoV)) solunum sistemi problemlili köpeklerde hafif grip benzeri semptomlara sebep olmaktadır (3, 13, 31). Düzenli aşılmalara rağmen ciddi solunum sistemi problemi olan köpeklerde trake ve akciğer örneklerinde RT-PCR ile coronavirusa ait genom varlığı tespit edilmiştir (31). Yapılan bu çalışmada da özellikle alt solunum yolu enfeksiyonu olan üç köpekte CCoV tespit edilmiş olup canine coronavirusların alt solunum yolu enfeksiyonlarına da neden olabileceği kanısına varılmıştır. Özellikle alt solunum yolu hastalığı bulunan köpeklerde her iki CCoV' nun da bulunabileceği göz ardı edilmemeli ve tanı panelinde bu virusların da eklenmesinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Viral enfeksiyonların teşhisinde birçok yöntem bulunmasına rağmen bu yöntemlerin pratikte kullanılmasının zaman alıcı olması, duyarlılıklarının ve özgünlüklerinin düşük olması ve pahalı yöntemler olması nedeniyle kullanılması zor olmaktadır. Bu yüzden PCR gibi hızlı moleküler tekniklerin duyarlılığının yüksek olması, düşük maliyetli olması nedeniyle viral enfeksiyonların tanısında önem arz etmektedir (36-37). CCoV' un tespitine yönelik birçok serolojik ve virolojik metodlar bulunmaktadır. Virolojik tanı yöntemlerinden olan PCR tekniği, hızlı ve güvenilir olması nedeniyle hastalıkların teşhisi ve korunma yöntemlerinin hızlı uygulanması nedeniyle önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışmada da alt solunum yolu enfeksiyonu bulunan köpeklerde CCoV' nun varlığı PCR ile araştırıldı ve pozitif tespit edilen örneklerde M genine yönelik primerlerle dizin analizi yapılarak tiplendirme yapıldı ve CCoV-I ve CCoV-II nin birlikte sirküle olduğu tespit edildi. Her ne kadar CCoV I ve II sindirim sisteminde problemlere neden olduğu belirtilse de yapılan bu çalışmada özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarında da var olabileceği ortaya konuldu.

Coronavirüslerde özellikle türler arasında geçiş veya farklı hayvan türlerinde görülen diğer coronaviruslar ile rekombinasyon olabileceği belirtilmektedir (38-39). Canine coronavirusun M geni üzerine yapılan sekans analizleri sonrasında iki yeni genetik cluster tespit edilmiştir (33, 40-42). Yapılan bu çalışmada da aynı barınağı kullanan barınak köpeklerinde hem CCoV-I hem de CCoV-II tespit edildi. Coronaviruslardaki rekombinasyonlar dikkate alındığında aynı barınakta farklı hayvanlarda iki farklı CCoV' nun tespiti önemli bir veri olarak değerlendirilmiş olup özellikle barınak koşulları gibi kalabalık ortamda barındırılan köpeklerdeki her iki tipin tespiti gelecekte oluşabilecek yeni varyantların ya da alt tiplerin oluşabilme ihtimalinin de göz ardı edilmemesi gerektiğini göstermektedir.

CCoV' nun M glikoproteini güçlü immun cevap oluşturabilmektedir. M geninde meydana gelen mutasyonlar konak immun sistemden kaçmada bir takım avantajlar sağlayabilmektedir (4, 42). Bu çalışmada da özellikle M genine yönelik primerler tercih edilerek olası yeni mutantlar da tespit edilmesi amaçlanmıştır. Ancak sekans analizi sonrasında elde edilen dizinlerde CCoV-I ve CCoV-II olarak tespit edilmiş ve daha önceki yıllarda ülkemizdeki ve dünyadaki farklı ülkelerde tespit edilen tiplerle yüksek benzerlikler gösterdiği görülmektedir (Şekil 2). Bu verilere göre özellikle ülkemizde benzer saha suşlarının (hem CCoV-I hem de CCoV-II) sirküle olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile barınak köpeklerinin alt solunum yolu rahatsızlıklarında CCoV-I ve CCoV-II' nun rol oynayabileceği ortaya konulmuş olup bu virüslere bağlı enfeksiyonlardan korunmada aşılama önemli yer tutmaktadır. Ancak bu aşılamalarda da sahada sirküle olan saha izolatlarının da aşının içerisinde yer alması gerekli görülmektedir. Aşılamalar ülkelere de diğer ülkelere geçişle birlikte Türkiye' de yapılacak aşılamalarda bu çalışmada da tespit edildiği gibi özellikle iki farklı CCoV' un sirküle olduğu dikkate alınmalıdır. CCoV enfeksiyonları diğer viral veya bakteriyel patojenlerle birlikte seyrettiğinde daha ciddi semptomlara ve yüksek ölüm oranlarına neden olabileceğinden diğer patojenlerin de alt solunum yolu problemlerinde araştırılması gerekmektedir. Ayrıca coronaviruslardaki rekombinasyonlar ve türler arası geçişlerin de olabileceği düşünüldüğünde özellikle kedi ve köpek gibi hayvanların bir arada ve kalabalık bir şekilde barındırılmaması gerekliliği ön plana çıkmaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Kaynak Beyanı

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Yazar Katkısı Beyanı

Bu bölümde makalenin yazar/yazarlarının çalışmaya katkıları aşağıdaki başlıklar yardımıyla yazar(lar)ın isim-soyisimleri kullanılarak belirtilmelidir.

Fikir/kavram: Fırat DOĞAN, Serkan İrfan KÖSE

Deney tasarımı: Fırat DOĞAN.

Denetleme/Danışmanlık: Fırat DOĞAN, Serkan İrfan KÖSE

Veri toplama: Fırat DOĞAN, Serkan İrfan KÖSE

Veri analizi ve yorum: Fırat DOĞAN, Serkan İrfan KÖSE

Kaynak taraması: Fırat DOĞAN, Serkan İrfan KÖSE

Makalenin yazımı: Fırat DOĞAN, Serkan İrfan KÖSE

Eleştirel inceleme: Fırat DOĞAN.

Etik Onay

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulunun 28.03.2019 tarihli toplantısında 2019-09-6 karar sayısı ile etik onayı almıştır.

Kaynaklar

1. Burrell C, Howard C, Murphy F. Fenner and White's medical virology. 5th ed. United States: Academic Press. 2016.
2. Decaro N, Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol* 2008;132(3-4):221-234.
3. Decaro N, Mari V, Elia G, Addie DD, Camero M, Lucente MS, et al. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(1):41.
4. Pratelli A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Vet Res* 2006;37(2):191-200.
5. Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, De Groot RJ. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol* 1998;72(5):4508-4514.
6. Decaro N, Buonavoglia C. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Vet Clin N Am-Small* 2011;41(6):1121-1132.
7. Erles K, Brownlie J. Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population. *Virus Res* 2009;141(1):21-25.
8. Ntafis V, Mari V, Decaro N, Papanastassopoulou M, Pardali D, Rallis TS, et al. Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization. *Infect Genet Evol* 2013;16: 129-136.
9. Van Der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10(4):368-373.
10. Storz J, Lin X, Purdy CW, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Enright FM, et al. Coronavirus and Pasteurella infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J Clin Microbiol* 2000;38(9): 3291-3298.
11. Erles K, Dubovi EJ, Brooks HW, Brownlie J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious

- respiratory disease. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4524-4529.
12. Makela MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 539-542.
 13. Erles K, Brownlie J. Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kennelled dog populations. *Arch Viro* 2005; 150(8):1493-1504.
 14. Akkutay-Yoldar ZA, Koç BT, Oguzoglu TC. Phylogenetic analysis of partial transmembrane protein gene of canine coronaviruses detected in Turkey. *Ankara Univ Vet Fak* 2020;67(3):265-271.
 15. Timurkan MO, Aydın H, Dincer E, Coskun N. Molecular characterization of canine coronaviruses: an enteric and pantropic approach. *Arch Viro* 2021;166(1):35-42.
 16. Avci O, Bulut O, Yapici O, Hasircioglu S, Simsek A. Canine coronavirus infection in dogs in Turkey: Virological and serological evidence. *Indian J Anim Res* 2016;50(4):565-568.
 17. Gür S, Gençay A, Doğan N. A serologic investigation for canine corona virus infection in individually reared dogs in central Anatolia. *Erciyes Üni Vet Fak Derg* 2008;5(2):67-71.
 18. Yeşilbag K, Yılmaz Z, Torun S, Pratelli A. Canine coronavirus infection in Turkish dog population. *J Vet Med, Series B* 2004;51(7): 353-355.
 19. Ataseven VS, Ucar H, Akca Y. Canine coronavirus antibodies in stray dogs. *Indian Vet J* 2005; 82(7):782-783.
 20. Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Martella V, Buonavoglia C. Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. *J Virol Methods* 1999;80(1):11-15.
 21. Larsson A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 2014;30: 3276–3278.
 22. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25(17):3389-3402.
 23. Adiguzel MC, Timurkan MO, Cengiz S. Investigation and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from companion birds in eastern Turkey. *J Vet Res* 2020;64(4):495-501.
 24. Timurkan MO, Kirbas A, Aydın H, Yanar KE, Aydın O. First Molecular Characterization of Bovine Papular Stomatitis Virus and Meta-Analysis of Parapoxviruses in Turkey. *Israel J Vet Med* 2021;76:2.
 25. Oguzoglu TC, Timurkan MO, Koc BT, Alkan F. Comparison of genetic characteristics of canine papillomaviruses in Turkey. *Infec Gen and Evol* 2017;55:372-376.
 26. Weese JS, Stull J. Respiratory disease outbreak in a veterinary hospital associated with canine parainfluenza virus infection. *The Canadian Vet J* 2013;54(1):79.
 27. Köse Sİ, Maden M, Sayin Z. Clinical and bacteriological analysis of respiratory tract infections in sheltered dogs and determination of antibacterial treatment options. *J Hellenic Vet Med Society* 2021;72(4):3491-3502.
 28. Rattanakitkanon A, Keawcharoen J, Taya Charoenvisal N, Poovorawan Y, Prompetchara E, et al. Genotypic lineages and restriction fragment length polymorphism of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet Microbiol* 2013;166(1-2):76-83.
 29. Tham KM, Homer GW, Hunter R. Isolation and identification of canine adenovirus type-2 from the upper respiratory tract of a dog. *New Zeal J* 1998; 46(3):102-105.
 30. Timurkan MO, Aydın H, Alkan F. Detection and molecular characterization of canine adenovirus type 2 (CAV-2) in dogs with respiratory tract symptoms in shelters in Turkey. *Veterinarski arhiv* 2018;88(4):467-479.
 31. Erles K, Toomey C, Brooks HW, Brownlie J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology* 2003; 310(2):216-223.
 32. Posuwan N, Payungporn S, Thontiravong A, Kitikoon P, Amonsin A, Poovorawan Y. Prevalence of respiratory viruses isolated from dogs in Thailand during 2008–2009. *Asian Biomed* 2010;4(4):563-69.
 33. Pratelli A, Tinelli A, Decaro N, Camero M, Elia G, Gentile A, et al. PCR assay for the detection and the identification of atypical canine coronavirus in dogs. *J Virol Methods* 2002a;106(2):209-213.
 34. Pratelli A, Decaro N, Tinelli A, Martella V, Elia G, Tempesta M, et al. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1797-1799.

35. Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Desario C, et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg Infect Dis* 2006;12(3):492.
36. Sedlak RH, Jerome KR. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn Microb Infect Dis* 2013;75(1): 1-4.
37. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* 2015;61(1):79-88.
38. Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med* 2009;234(10):1117-1127.
39. Dagalp SB, Sahinkesen I, Babaoglu AR, Dogan F, Arslan EA. Animal coronaviruses, interspecies transmission and zoonotic potential.(Covid-19 special issue) *Eurasian J Vet Sci* 2020;99-105.
40. Pratelli A, Elia G, Martella V, Tineili A, Decaro N, Marsilio F, et al. M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. *Vet Rec* 2002b; 151(25):758-761.
41. Pratelli A, Martella V, Decaro N, Tinelli A, Camero M, Cirone F, et al. Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy. *J Virol Methods* 2003a; 110(1): 9-17.
42. Pratelli A, Martella V, Pistello M, Elia G, Decaro N, Buonavoglia D, et al. Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *J Virol Methods* 2003b; 107(2): 213-222.