

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU

Ljubiša M. Veljović

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
SOJEVA VIRUSA PARAINFLUENCE 3
GOVEDA IZOLOVANIH NA TERITORIJI
REPUBLIKE SRBIJE

Doktorska disertacija

Beograd 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY**

Ljubiša M. Veljović

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF
PARAINFLUENZA 3 VIRUS STRAINS OF
CATTLE ISOLATED ON THE TERRITORY
OF REPUBLIC OF SERBIA**

PhD thesis

Belgrade 2016.

MENTOR:

Dr Nenad Milić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Jakov Nišavić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

2. Dr Dejan Krnjajić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

3. Dr Aleksandra Knežević, vanredni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: --. --. ----.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	14
3. CILJ I ZADACI RADA	50
4. MATERIJAL I METODE	52
5. REZULTATI	770
6. DISKUSIJA	116
7. ZAKLJUČCI	126
8. SKRAĆENICE	127
9. SPISAK LITERATURE	130
10. BIOGRAFIJA AUTORA	137

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA SOJEVA VIRUSA PARAINFLUENCE 3 GOVEDA IZOLOVANIH NA TERITORIJI REPUBLIKE SRBIJE

REZIME

Glavni cilj ove doktorske disertacije je da se izvrši identifikacija i molekularna karakterizacija izolovanih sojeva virusa parainfluence 3 (PI3) goveda sa teritorije Republike Srbije. Izvršena ispitivanja su obuhvatila izolaciju virusa parainfluence 3 iz nosnih briseva goveda na kulturi tkiva i identifikaciju izolovanih sojeva virusa metodom virusneutralizacije, direktne imunofluorescencije i njihovu molekularnu karakterizaciju metodom lančane reakcije polimeraze (RT PCR) uz korišćenje prajmera za konzervisane regione HN i F gena virusa PI3 goveda sa sekvenciranjem radi njihove genotipizacije i svrstavanja na filogenetsko stablo izolovanih sojeva pomenutog patogena. Filogenetska analiza izolovanih sojeva izvršena je na osnovu utvrđivanja homologije i poređenja pozicije njihovih nukleotidnih sekvenci sa sekvencama registrovanih sojeva virusa u bazi gena. Na osnovu nukleotidne homologije i pozicije domaćih izolovanih sojeva virusa na filogenetskom stablu, izvršena je njihova genotipizacija.

U navedenim ispitivanjima je korišćen referentni soj SF4 virusa PI3 goveda (izolovan u državi Tenesi ,SAD). Nazalni brisevi poreklom od 119 goveda različitih rasnih i starosnih kategorija sa ispoljenim simptomima infekcije gornjih partija respiratornog trakta su ispitivani na prisustvo virusa PI3 metodom izolacije na ćelijskoj liniji MDBK (Madin Darby Bovine Kidney). Izolacija virusa vršena je posle najviše tri pasaže suspektnog materijala na navedenoj ćelijskoj liniji do pojave citopatogenog efekta. Citopatogeni efekat je ustanovljen u ćelijskim linijama posle inokulacije 11 uzoraka ispitivanog materijala, dok je primenom metode virusneutralizacije i direktne imunofluorescencije ustanovljeno prisustvo virusa parainfluence 3 kod 6 inokulisanih ćelijskih linija. U ostalim ćelijskim linijama, pojedinačno inokulisanim sa po 5 uzoraka

poreklom od ispitivanih nosnih briseva goveda nije dokazano prisustvo virusa parainfluence 3 primenom prethodno navedenih metoda.

Svi uzorci nosnih briseva goveda su zatim direktno ispitivani metodom lančane reakcije polimeraze sa reverznom transkripcijom - RT PCR u cilju dokazivanja prisustva i identifikacije sojeva virusa parainfluence 3 goveda. Pored 6 prethodno identifikovanih izolovanih sojeva virusa PI3, prisustvo virusnog genoma je dokazano i kod dva uzorka ispitivanih nosnih briseva kod kojih nije uspela izolacija pomenutog virusa na ćelijskoj liniji MDBK. Analizom uzoraka metodom RT PCR uz korišćenje prajmera za F gen virusa PI3, dobijene su sekvence dezoksiribonukleinske kiseline - DNK od 400 baznih parova što je potvrdilo identifikaciju virusa parainfluence 3 goveda. Kod svih 8 uzoraka ispitivanih metodom lančane reakcije polimeraze sa reverznom transkripcijom (RT PCR) sa prajmerima za konzervisani deo HN gena virusa parainfluence 3, dobijeni su proizvodi RT PCR sa sekvencama DNK od 647 baznih parova čime je potvrđena identifikacija navedenog virusa. Osam sekvenci dobijenih metodom RT PCR uz korišćenje prajmera za F i HN gen je prečišćeno i sekvencirano direktnom metodom po Sangeru. Procena nukleotidne homologije svih sekvenci domaćih izolovanih virusa sa odgovarajućim sekvencama registrovanih virusa PI3 iz baze gena izvršena je uz primenu BLAST softvera. Na osnovu procenta utvrđene nukleotidne homologije između nukleotidnih sekvenci domaćih sojeva izolovanih virusa i registrovanih sojeva virusa PI3 iz baze gena izvršeno je pozicioniranje domaćih sojeva pomenutog virusa na filogenetsko stablo čime je utvrđena i njihova genotipska pripadnost virusima PI3 goveda. Za izradu filogenetskog stabla korišćen je program MEGA 6. Sekvence osam ispitanih sojeva virusa PI3 goveda ispoljile su najviši procenat nukleotidne homologije u odnosu na izolovane sojeve ovog virusa poreklom iz Kine (SD0835, SD811, SD805 i SD809) koji se kretao u intervalu od 95% do 99%. Kod domaćih sojeva izolovanih virusa ustanovljen je nešto niži procenat homologije u odnosu na sojeve virusa koji pripadaju genotipu C izolovanih iz goveda u Koreji (soj 12Q061) i Japanu (soj HS9). Procenat nukleotidne homologije utvrđen kod domaćih sojeva izolovanih virusa sa sojevima genotipa A iz Japana (izolat BN-CE) i Kine (izolat NM09) se kretao u intervalu od 82 do 84%. Homologija izolovanih sojeva virusa sa sojem virusa genotipa B izolovanim u Australiji (soj Q5592) kretala se u intervalu od 79 do 83%. Na osnovu analize filogenetskog stabla virusa PI3, može se zaključiti da

svi domaći identifikovani sojevi navedenog patogena pripadaju genotipu C virusa PI3 goveda.

Ključne reči: virus parainfluenza 3, goveda, izolacija virusa, imunofluorescencija, RT PCR, sekvenciranje, molekularna karakterizacija, filogenetsko stablo

Naučna oblast: veterinarska medicina

Uža naučna oblast: mikrobiologija

UDK broj: 579.62 : 578.2 : 636.2

MOLECULAR CHARACTERISATION OF PARAINFLUENZA 3 VIRUS STRAINS OF CATTLE ISOLATED ON THE TERRITORY OF REPUBLIC OF SERBIA

ABSTRACT

The main objective of this doctoral thesis was the identification and molecular characterization of isolated strains of parainfluenza 3 (PI3) from cattle on the territory of the Republic of Serbia. The investigations included isolation of parainfluenza 3 virus from nasal swabs from cattle in tissue culture and identification of isolated strains of the virus by method of virus neutralisation, direct immunofluorescence and their molecular characterisation by method of polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers from conserved regions of the HN and F genes of the virus PI3 cattle, with sequencing and genotyping of domestic strains by help of their inclusion on the phylogenetic tree of mentioned pathogens. Phylogenetic analysis of the isolated strains was carried out on the basis of determination of the homology of the nucleotide sequences with the sequences of strains of the virus registered in gene base NCBI. Genotyping of domestic strains was done on the basis of nucleotide homology and position of local isolated virus strains on the phylogenetic tree, of PI3 virus.

In these experiments, reference strain SF4 of virus PI3 of cattle was used (isolated in Tennessee, USA). Nasal swabs originating from 119 cattle with symptoms of infection in upper parts of the respiratory tract were examined for the presence of the virus PI3 by method of isolation of virus on cell line MDBK (Madin Darby Bovine Kidney). Virus isolation was done after three passages of suspected material on cell line till the appearance of cytopathic effect. Cytopathic effect was detected in cell lines after inoculation of 11 tested samples, while applying the method of virus neutralisation and direct immunofluorescence, identification of the virus parainfluenza 3 were confirmed in 6 inoculated cell lines, but not confirmed in other 5 tested samples from nasal swabs of cattle.

All nasal swabs of cattle were then directly tested by the polymerase chain reaction with reverse transcription – RT PCR for presence of parainfluenza 3 virus strains of cattle. In addition to the six previously identified isolated strains of the virus PI3, the presence of the viral genome has been confirmed in two samples of nasal swabs in which the isolation of mentioned virus on cell line MDBK failed. The analysis of samples by RT-PCR were done by use of primers for the F gene of the virus PI3, and sequences of deoxyribonucleic acid - DNA of 400 bp were obtained as a confirmation the identification of parainfluenza virus 3 cattle.

All eight samples were tested by polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers for the conserved part of the HN gene of PI3 virus, and sequences of 647 bp were obtained. Eight sequences obtained by RT PCR using primers from F and HN gene were purified and sequenced directly by the method of Sanger. Assessment nucleotide sequence homology of all local virus isolated strains with corresponding sequences of registered PI3 virus strains from the database of genes were performed by the BLAST software. On the basis of the determined percentage of nucleotide homology between the nucleotide sequences of domestic strains of virus with strains of the virus PI3 from the gene base, positioning of domestic strains of PI3 virus in the phylogenetic tree were done with genotypisation of domestic strains of virus PI3 of cattle. To create a phylogenetic tree, MEGA 6 programme was used. The sequences of the eight tested strains of the PI3 virus of cattle showed the highest percentage of nucleotide homology with the isolated strains of this virus originated in China and belongs to genotype C (SD0835, SD811, SD805 and SD809), which ranged from 95% to 99%. Domestic isolated strains of PI3 virus are established in a slightly lower percentage of homology with the strains belonging also to genotype C, isolated from cattle in Korea (strain 12Q061) and Japan (strain HS9). The percentage of nucleotide homology observed in domestic isolates of the virus with strains of genotype A from Japan (isolate BN-CE) and China (isolate NM09) ranged from 82 to 84%. The homology of the isolated strains of the virus with genotype B strain isolated in Australia (strain Q5592) ranged from 79 to 83%. Based on the analysis of phylogenetic tree of

PI3 virus, it can be concluded that all domestic strains of virus belong to genotype C of PI3 virus of cattle.

Keywords: bovine parainfluenza 3 virus, cattle, virus isolation, immunofluorescence, RT-PCR, sequencing, molecular characterization, phylogenetic tree

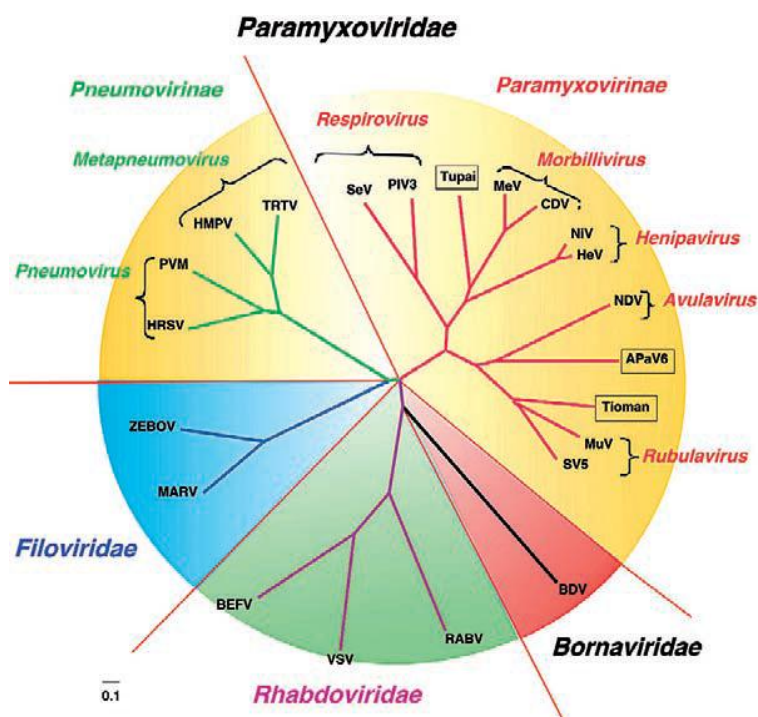
Science area: Veterinary medicine

Field area: Microbiology

UDK : 579.62 : 578.2 : 636.2

1. UVOD

Virus parainfluenze 3 goveda (PI3) spada u familiju *Paramyxoviridae*. Nekoliko najvećih i ekonomski najznačajnijih epidemija u životinjskom svetu dvadesetog veka izazvano je upravo virusima koji pripadaju ovoj familiji. Među njima su kuga goveda, štenećak pasa, New Castle bolest odnosno atipična kuga živine (**Frederiks at al. 2000**). Istoj familiji pripadaju i neki značajni uzročnici virusnih epidemija ljudi kao što su virus boginja i virus zauški. Familija *Paramyxoviridae* zajedno sa familijama *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* i *Bornaviridae* sačinjavaju red *Mononegavirales*. Red je uspostavljen na osnovu zajedničkih filogenetskih osobona navedenih familija koje se reflektuju u konzerviranim genskim domenima, sličnoj strategiji ekspresije gena i replikaciji. Sve navedene familije virusa pa i familija *Paramyxoviridae* u koju je svrstan virus parainfluenze 3 goveda, spadaju u viruse sa omotačem koji na svojoj površini imaju peplomere (antene) i sadrže genom koji se sastoji od jednog molekula negativnog lanca RNA.



Slika br. 1 Filogenetsko stablo reda *Mononegavirales*

Phylogenetic tree of members of the order *Mononegavirales*. Fener, MacLachan, Dubovi; *Veterinary Virology* 4. Edition, 2011. p. 300.

Familija *Paramyxoviridae* je podeljena u dve subfamilije i to *Paramyxovirinae* i *Pneumovirinae*. Familija *Paramyxovirinae* je sastavljena od rodova *Respirovirus*, *Rubelavirus* i *Morbilivirus* dok je familija *Pneumovirinae* sastavljena od rodova *Pneumovirus* i *Methapneumovirus*. Pored poznatih i sistematizovanih virusa u novije vreme su otkriveni i identifikovani novi virusi koji pripadaju familiji *Paramyxoviridae* ali još nisu u potpunosti sistematizovani. Među njima su najznačajniji virusi „fer de lance“ reptila, paramyxovirus delfina, Mapuera virus slepih miševa, Nariva virus glodara i nekoliko virusa pingvina koji se značajno razlikuju od do sada poznatih avijarnih paramiksovirusa. U istu familiju svrstan je i relativno skoro otkriven morbili virus kopitara koji je patogen i za ljude često sa fatalnih ishodom kao i canine parainfluenza virus 2, koji je vrlo sličan Simian virusu i izaziva inaparentnu respiratornu infekciju ali može biti i uzročnik oboljenja CNS- a kod pasa. Virus parainfluence 3 goveda spada u rod *Respirovirusa* i na osnovu molekularne karakterizacije odnosno položaja izolata na filogenetskom stablu, sojevi su podeljeni u 3 genotipa : A, B i C, (Neil i sar. 2015).

Virione paramyxovirusa karakteriše i polimorfizam zbog savitljivosti spoljašnjeg virusnog omotača – peplosa tako da se pored sferičnih pojavljuju i filamentozne forme virusne čestice. Veličina viriona parainfluence 3 kreće se od 80 do 300 nm, najčešće od 130 do 140 nm (Shibuta i sar. 1979). Virus sadrži helični simetrični nukleokapsid dužine 600 do 800 nm i dijametra od 13 do 18 nm. Genom virusa parainfluence sastoji se od jednog negativnog lanca RNA veličine od 15 do 16 kb (Wen i sar. 2012) Genom sadrži u svom sastavu 6 do 10 gena odvojenih nekodiranim sekvencama koje sadrže terminalne poliadenilne i inicijalne signale.

Paramyxovirinae

Rubulavirus - Simian virus 5 - 15246 nt



Avulavirus - Newcastle disease virus - 15156 nt



Respirovirus - Sendai virus - 15384 nt



Henipavirus - Hendra virus - 18234 nt



Morbillivirus - Measles virus - 15894 nt



Pneumovirinae

Pneumovirus - Human respiratory syncytial virus - 15222 nt



Metapneumovirus - Human metapneumovirus - 13350 nt



Slika br. 2 Sastavi genoma različitih rodova iz familije Paramyxovirusa

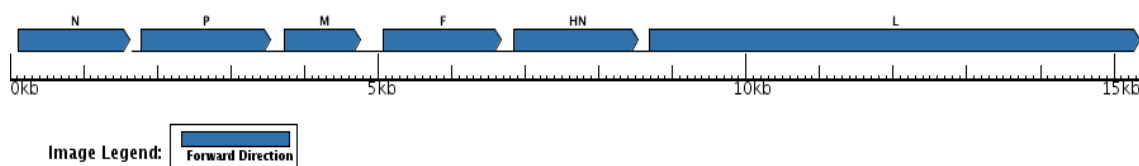
Izvor: Genoms of Paramyxoviruses. Fener, MacLachan, Dubovi; Veterinary Virology 4. Edition, 2011. p. 303.

Genom virusa PI3 goveda sadrži više gena u koje spadaju N, P, M, F, HN i L geni koji su odgovorni za kodiranje sinteze 6 strukturalnih virusnih proteina pored tri nestrukturalna proteina viriona (**Wen i sar. 2012**). Navedeni geni kodiraju sintezu virusnih proteina koji su nosioci najznačajnijih funkcija pomenutog virusa vezanih za njegovu antigensku specifičnost, virulenciju i replikaciju u ćeliji domaćina, dok funkcija nekih proteinskih komponenti virusne čestice nije u potpunosti razjašnjena. Gen P virusa PI3 kodira sintezu virusnih proteina C i V koji su antagonisti proizvodnje interferona u ćelijama domaćina u kojima je prisutan virus PI3 što ima za posledicu ostvarivanje imunosupresije u organizmu inficiranom pomenutim uzročnikom. (**Komatsu i sar. 2007**). Glikoproteinski F antigen ili fuzioni protein predstavlja strukturalnu komponentu peplomera koji grade spoljašnji virusni omotač – peplos koji je

odgovoran za fuziju virusnog omotača i citoplazmatične membrane ćelije domaćina, što omogućuje prodiranje virusa u ćelijsku citoplazmu kao i širenje virusa iz ćelije na ćeliju tokom razvoja virusne infekcije na nivou organizma. Fuzioni proteinski antigen predstavlja imunološki značajnu komponentu virusne čestice na osnovu čije antigenske specifičnosti može da se izvrši identifikacija sojeva virusa PI3 primenom odgovarajućih imunoloških i molekularnih metoda. Neaktivni prekursor fuzionog proteina F0 se sastoji od dve subjedinice F1 i F2 koje su međusobno spojene disulfidnom vezom. Fuzioni antigen virusa PI3 obavlja svoju funkciju posle aktivacije njegove F1 komponente što je posledica odvajanja manje subjedinice F2 od prekuzorskog F0 proteina posle čega ispoljava svoju funkciju u procesu vezivanja i prodiranja virusnih čestica u ćelije prijemčivog organizma.

Hemaglutininsko-neurimidazni protein HN ispoljava svojstvo hemaglutinacije i enzimsku funkciju neuraminidazne komponente virusa PI3. Pored proteina F on predstavlja strukturnu komponentu peplomera na omotaču virusa. Hemaglutininsko neuraminidazni protein predstavlja imunološki najznačajniju antigensku komponentu virusa PI3 jer stimuliše humoralni imunološki odgovor kod inficiranih jedinki koji se karakteriše sintezom neutralizujućih antitela protiv NH antigena. Ispitivanjem subjediničnih vakcina protiv virusa PI3 goveda, utvrđeno je da neutralizujuća antitela protiv HN i F antigena virusa imaju ključnu ulogu u specifičnoj zaštiti jedinki od infekcije pomenutim virusom. Pored toga hemaglutininski antigeni virusa su odgovorni za vezivanje virusa za površinu osetljive ćelije dok je neuraminidaza odgovorna za oslobađanje viriona iz ćelije domaćina kao i razgradnju sijalomukoidnih receptora na membrani ćelije a samim tim i za otpuštanje virusne čestice sa njene površine – kao na primer kod elucija odnosno otpuštanja virusa sa površine eritrocita za čije su se sijalomukoidne receptore sa N acetil neuraminskom kiselinom prethodno vezali svojim HN antigenima. Specifična antitela protiv HN i F proteina imaju najznačajniju ulogu u zaštiti goveda od infekcije virusom PI3 (**Klippmark i sar. 1990**). Protein M (matriks protein) je veliki hidrofobni molekul koji ima odlučujuću ulogu u zaštiti i stabilnosti genoma virusa odnosno njegove ribonukleinske kiseline - RNK i u formiranju nukleokapsida u toku virusne replikacije pomenutim virusom. Pored toga navedeni protein ima značajnu ulogu i u održavanju perzistentne infekcije kod inficiranih organizama. (**Vainionpaa i sar. 1994**). Proteini L koji predstavlja najveći virusni

protein i protein P koji je fosfoprotein čije sve funkcije nisu u potpunosti razjašnjene imaju značajnu ulogu u transkripciji i replikaciji virusa.



Slika br. 3 : genom virusa PI 3 goveda

<http://www.viprbrc.org/brc/viprStrainDetails.spg?ncbiAccession=EU277658&decorator=paramyxo>

Virus parainfluenze 3 goveda spada u relativno neotporne viruse. Organski rastvarači ga lako inaktiviraju (etar, hloroform, alkohol) što je osobina većine virusa sa omotačem zbog prisustva lipidnih komponenti u njemu. Nije otporan na visoku temperaturu i inaktivira se na 56 stepeni za 30 minuta. U sasušenom materijalu može dugo ostati aktivan. Titar virusa značajnije opada čuvanjem virusa na -20 °C nego na +4° C. Virus se najbolje održava na -80 ° C. Na temperaturii od 37 °C u prisustvu vlage od 90% virus gubi titar i do 5 log₁₀ TCID /ml u toku jednog dana (**Elezhaey i sar . 1989**).

Za izolaciju i umnožavanje virusa PI3 goveda može se koristiti više različitih ćelijskih linija. Najveći uspeh se postiže sa ćelijskim linijama homologih vrsta životinja kao što je ćelijska linija MDBK (**Allawe i sar. 2012, Greenberg i sar. 2005**) ali i na ćelijskim linijama drugih vrsta sisara (primer, ćelijska linija VERO) (**Breker Klassen i sar. 1996.**). Pojedini autori su uspešno umnožavali virus PI3 goveda i na kokošijim embrionima (**Marshall i sar. 1964.**) što ima svojih prednosti jer se na ovaj način mogu eliminisati neki drugi virusi koji su česti uzročnici sekundarnih infekcija, kao što je virus IBR-IPV, BRSV drugi. Vrlo često je potrebna adaptacija virusa na ćelijske linije pa se virus ne umnožava lako u prvoj pasaži. Virusna replikacija u ćelijskoj kulturi je obično praćena litičnim efektom (pojava citopatogenog efekta-CPE). Neke ćelijske

linije su se u međuvremenu adaptirale na izvesne paramiksovirus i postale "host cell sistem" (nije prisutan citopatogeni efekat virusa nego se virus kontinuirano umnožava u ćelijskoj liniji koja se takodje nesmetano umnožava i pasira) (**Frederiks i sar. 2000**). Formiranje sincicijuma in vitro i in vivo je jedna od osobina kod umnožavanja virusa parainfluence mada je pojava sincicijuma izraženija kod morbilivirusa. Acidofilne inkluzije su vidljive u citoplazmi inficiranih ćelija, dok je hemadsorpcija sa suspenzijom eritrocita petla i zamorca ustanovljena na ćelijskim linijama inokulisanim virusima parainfluence kao i nekim morbilivirusa.

Iako se umnožavanje svih paramiksovirusa odigrava u citoplazmi ćelija domaćina, ustanovljeno je da se virus može umnožavati i u nekim bezjedarnim ćelijama (**Frederiks i sar. 2000**). Virion se vezuje preko hemaglutitinsko -neuraminidaznog proteina za ćelijske receptore na membrani koji su najčešće sialoglikoproteinski ili glikolipidni receptori. Fuzioni F protein tada obavlja fuziju virusnog omotača i ćelijske plazma membrane u fiziološkim odnosno optimalnim uslovima pH sredine. Oslobođeni nukleokapsid ostaje intaktan sa sva tri svoja proteina N P i L koji su neophodni za transkripciju uz pomoć virionske RNA zavisne RNA polimeraze. Genom se transkribuje u 6 do 10 neprocesiranih molekula informacione ribonukleinske kiseline sekvencionalnom prekidanom sintezom jednog jedinog promotora. Ceo pozitivni lanac RNK je takodje sintetisan i služi kao matrica za replikaciju negativnog lanca genomske RNK virusa. Dok je većina gena virusa PI3 odgovorna za sintezu jedne proteinske komponente virusne čestice, P gen virusa iz podfamilije *Paramyxovirinae* kodira sintezu 2 do 5 različitih virusnih proteina . Sazrevanje viriona podrazumeva ugradnju virusnih glikoproteina u plazma membranu ćelije domaćina posle čega dolazi do povezivanja M proteina i ostalih neglikolizovanih proteina sa citoplazmatičnom membranom ćelije. Uz samu ćelijsku membranu se kompletira virusni nukleokapsid sa M proteinom što dovodi do potpunog formiranja viriona koji napušta ćeliju procesom pupljenja čime stiže i spoljašnji virusni omotač sa ključnim glikoproteinskim HN i F antigenima .

Virus parainfluence 3 goveda, izaziva oboljenje gornjih delova respiratornog trakta i ponekad zahvata organe celog respiratornog trakta. Vrata infekcije za parainfluenca 3 virus najčešće predstavlja sluznica nosa. Oboljenje se prenosi aerogeno

i predstavlja tipičnu kapljičnu infekciju koja se širi kohabitacijom zdravih sa obolelim jedinkama. Posle izvođenja oglada veštačke infekcije goveda, ustanovljena je pojava oboljenja sa izraženim kliničkim simptomima gornjih partija respiratornog trakta sa tendencijom descendentnog širenja na donje partije respiratornog trakta i pojave bronhopneumonije, ukoliko je inokulacija virusa eksperimentalnih životinja izvršena intratrahealno. Veštačka infekcija intranazalnim putem dovodi do pojave blažih simptoma respiratornog oboljenja izraženih samo u gornjim partijama respiratornog trakta. Iako bolest može imati visok morbiditet, mortalitet parainfluenca 3 kod goveda je nizak. Najčešće oboljevaju mlađe starosne kategorije, ali se bolest može otkriti i kod starijih goveda. Infekcija goveda virusom parainfluenca 3 može biti i asimptomatska inaparentna infekcija, dok u drugim slučajevima može biti praćena pojavom blagih simptoma poremećaja gornjih partija respiratornog trakta (kašalj, nosni iscedak, abdominalno disanje, hipertermija, ubrzano disanje, anoreksija), dok se ređe manifestuje pojavom razvijenih pneumonija (**Thorsen i sar. 1969**). Bolest najčešće prolazi bez posledica nakon 3 do 7 dana bolovanja, ukoliko ne dođe do sekundarnih infekcija. Letalitet inficiranih jedinki sa parainfluenca virusom je izuzetno nizak. Najveći problem predstavlja imunosupresivo dejstvo virusa PI3 čime se otvaraju putevi sekundarnim virusnim i bakterijskim infekcijama. Poznato je da virus parainfluenca 3 na više načina vrši supresiju proizvodnje beta interferona u domaćinu i tako snižava intenzitet i kvalitet imunog odgovora. Kao najčešći uzročnici sekundarnih infekcija pojavljuju se virusi infektivnog govedeg rinotraheitisa (IBR) (**Ghram i sar. 1988**), adenovirusi goveda, respiratorni sincicijalni virus goveda (BRSV), bovina virusna dijareja (BVDV), respiratorni bovini korona virus (RBCV) (**Storz i sar. 2000.**), zatim neke mikoplazme i Pasteurella vrste odnosno Majnhaimia haemolitica i M. multocida. Dok primarna infekcija virusom PI3 dovodi skoro redovno do leukopenije, pojava sekundarne infekcije, posebno bakterijske etiologije, dovodi u krvnoj slici do pojave leukocitoze (**Saunders i sar. 1964.**). Klinička slika, patološki i patohistološki nalaz mogu biti veoma različiti u zavisnosti od opšteg stanja jedinke, faktora stresa, pojave sekundarnih infekcija i same patogenosti uzročnika primarne i sekundarne infekcije. Pojedini autori su otkrili pojavu teških pneumonija sa obilnim proteinskim eksudacijama i prisustvom velikog broja makrofaga i polimorfonukleara u bronhiolarnom i alveolarnom epitelu i bez pojave sekundarne infekcije (**Jolly i sar. 1965**). Faktori stresa igraju odlučujuću

ulogu kao okidač u razvoju primarne bolesti infekcije virusom PI3 i kao takvi uvek pogoduju razvijanju bolesnog stanja i pojavi izraženijih simptoma nastalih usled sekundarne infekcije. Čelije respiratornog trakta koje pokazuju najveću osetljivost prema virusu PI3 goveda su alveolarne čelije tipa 2 (**Tsai i sar. 1975**).

Iako se kao najozbiljniji klinički i patološki nalaz kod primarne infekcije sa virusom PI3 javlja intersticijalna pneumonija, ukoliko dođe do sekundarnih infekcija posebno sa *Pasteurella* vrstama, bolest se komplikuje, klinička slika respiratorne infekcije postaje znatno ozbiljnija i neretko završava fatalno. Tada su na patoanatomskom pregledu skoro uvek makroskopski vidljivi znaci teške hemoragične i purulentne pneumonije, siva i crvena hepatizacija na plućima, jak otok i kongestija alveolarnih septa i dr. U patohistološkom nalazu vidljiva je ispunjenost alveola i bronhiola velikom količinom proteinskog eksudata sa mononuklearima, a u manjoj meri i polimorfonuklearnim čelijama. Formiranje sincicijuma kao i intercitoplazmatske inkluzije se pronalaze u čelijama epitela bronhiola i alveola. Teške pneumonije, nastale usled sekundarnih infekcija, atelektaze pluća i emfizemi često vode ka fatalnom ishodu kod teladi. Bolest se javlja najčešće u jesen i zimu pošto klima kao stresogeni faktor ima, pored infektivnog agensa, odlučujuću ulogu u razvoju bolesti. Najčešće stresogene predisponirajuće faktore, pored ekstremnih klimatskih uslova, predstavljaju i loša nega životinja, prenaseljenost, neprovetrenost objekata ili prevoznih sredstava, nekvalitetna i nedovoljna ishrana životinja. Oboljenje se često javlja posle transporta životinja zbog čega je i nazvano „sheeping fever“ ili „transportna bolest“ odnosno „transportna groznica“.

Različiti sojevi virusa Parainfluence 3 goveda izolovani su iz velikog broja životinjskih vrsta i to kod kamila (**Intisar i sar. 2010**), nosoroga, oriksa, Tompson antilope (**Niaga i sar. 1981**), obične gazele, bivola, divljeg afričkog govečeta, svinje, ali i kod ljudi koji su imali simptome poremećaja gornjih partija respiratornog trakta (uglavnom kod dece). Takođe je dokazano da su neki humani sojevi virusa PI3 patogeni za zamorca (**Horwood i sar. 2008**). **Shi i sar. 2014**. dokazali su patogenost virusa PI3 goveda genotipa C za albino zamorce i ispitali njegovu patogenezu. **Oshawa i sar. 1998** dokazali su da je infekcija zamoraca na farmi eksperimentalnih životinja bila izazvana humanim sojem virusa PI3. Tek **2012**. godine **Dong i sar.** uspeali su da inficiraju

laboratorijske miševе virusom PI3 goveda genotipom C, sa ispoljavanjem kliničke slike parainfluence. Ovaj poduhvat je doprineo novim izučavanjima i boljem razumevanju patogeneze same bolesti. Poslednji izolovani soj virusa PI3 delfina (**Nollens i sar. 2007**) sa respiratornim poremećajima je po svom genomu toliko sličan virusu parainfluence 3 goveda da su autori predložili njegovo svrstavanje u genotip B goveđih izolata virusa PI3 (**Eberkle i sar. 2015.**). Dva izolovana soja virusa PI3 svinja koja su izolovana u Sjedinjenim Američkim Državama (**Quao i sar. 2010.**) takođe spadaju u sojeve PI3 virusa goveda, što je ustanovljeno na osnovu epidemioloških karakteristika i nukleotidne homologije navedenih izolata sa ostalim izolatima parainfluence 3 goveda. Mogućnost virusa da izazove infekciju drugih vrsta nije iznenađenje ako se ima u vidu da neke epitope nukleokapsidnog proteina poseduju dva genotipa virusa PI3 goveda, dok sojevi trećeg genotipa B imaju zajednički epitop sa humanim sojevima virusa PI3 (**Ren i sar 2015.**). Sličnost jednog od najbitnijih imunogena virusa PI3, HN proteina, izuzetno je velika između humanih i goveđih sojeva virusa PI3 dok se dosta razlikuje od HN proteina Sendai virusa koji pripada istoj sistematskoj kategoriji (**Coelingh i sar. 1986**).

Virus PI3 zajedno sa virusima infektivnog bovinog rinotraheitisa odnosno bovinim herpes virusom 1 (IBR, BHV1), respiratornim sincicijalnim virusom goveda (BRSV), virusom infektivne bovine dijareje (BVDV), Koronavirusima i nekim Adenovirusima, predstavlja uzročnike takozvanog virusnog respiratornog sindroma goveda. Frekvencija zajedničkog pojavljivanja navedenih virusa kod jedinki sa izraženim respiratornim simptomima je toliko visoka da se na farmaceutskom tržištu već mogu naći reagensi koji povezuju dijagnostiku navedenih uzročnika jednom zajedničkom analizom (multiplex PCR), (**Horwood i sar. 2011.**).

Virus Parainfluence 3 dovodi do stvaranja neutralizujućih antitela prvenstveno protiv HN i F proteina. Karakteristično je da u imunološkom odgovoru domaćina prema PI3 virusu goveda, ćelijski imunitet ima veliki značaj. Jedinke koje su pozitivne na prisustvo antitela protiv virusa PI3 goveda, mogu naknadno oboleti od virusa PI3. Eksperimentima je dokazano da antitela nastala preboljevanjem ili kao produkt veštačkog aktivnog imuniteta (vakcinacijom), štite grla u smislu smanjenja intenziteta

simptoma bolesti kao i dužine trajanja bolesnog stanja, ali u malom procentu i kratkom vremenskom periodu štite jedinke od sledeće infekcije istim virusom.

U dijagnostici virusa PI3 najviše su u upotrebi metode izolacije i identifikacije virusneutralizacionim testom, metoda direktne imunofluorescencije (**Van der Marten et al. 1969.**), a poslednjih godina u svetu sve više su u upotrebi i metode lančane reakcije polimeraze (PCR), kao i direktno sekvenciranje PCR proizvoda u cilju detaljne molekularne identifikacije sekvence izolovanog virusa. Kao početni materijal za dijagnostiku virusa najviše se koristi nazalni bris od jedinki sa simptomima infekcije gornjih partija disajnih puteva iako je izolacija virusa uspela i iz mleka, testisa bikova vaginalnog brisa, pobačenog ploda i iz slezine (**Lilly i sar. 2004**). Virus se izlučuje u nosnom sekretu do sedmog, a u nekim slučajevima do devetog dana od početka pojave simptoma infekcije (**Crandel i sar 1974**). Za veću uspešnost izolacije virusa PI3 preporučuje se čuvanje brisa sa virusom potopljenim u minimalni esencijalni medijum i na temperaturi od -70°C do obrade materijala. U serološkim pretragama najčešće se koriste testovi hemaglutinacije i heminhibicije (**Rossi i sar. 1971.**), ELISA test i serumneutralizacioni test (**Neil i sar. 2015**).

Metoda izolacije virusa na ćelijskoj liniji i danas se smatra zlatnom standard metodom u virusološkoj dijagnostici. Najveći problemi u uspešnoj izolaciji virusa leže u pravilnom uzorkovanju i transportu uzroka do laboratorije, vremenu koje je potrebno da bi se završio regularan protokol metode koji može trajati i 21 dan (tri pasaže izolacije virusa) (**Oem i sar. 2013**), kao i posebna oprema i veštine samog analitičara (rad sa ćelijskim linijama, strogo sterilni uslovi rada i dr.). Uputstvo za uzorkovanje (**Sampling directive 2011, Virology division Celibridge Kildare, Department of agriculture, Republic of Ireland**) propisuje uzimanje šest briseva od različitih jedinki sa jednog žarišta što znatno povećava verovatnoću izolacije i tačnost postavljene dijagnoze. Treba imati u vidu da metoda izolacije virusa ne može otkriti prisustvo inaktivisanih virusa u ispitivanom materijalu.

Transport uzoraka i osetljivost virusa PI3 goveda prema različitim temperaturama i procentima vlage, od presudnog je značaja za izolaciju. Ustanovljeno je da virus PI3 može izgubiti i do $5 \log_{10}$ TCID u jednom danu, ukoliko se transport uzoraka u laboratoriju vrši bez hladnog lanca ili zamrzavanja briseva. Navedene

činjenice nas upućuju na sumnju da postoji značajna verovatnoća neuspešne izolacije virusa i iz briseva od jedinki obolelih od virusa PI3 od kojih je uzorak uzet na pravi način i u pravo vreme. Pojava citopatogenog efekta može biti vidljiva i posle nekoliko dana inkubacije u prvoj pasaži na ćelijskoj liniji, ali se u svim negativnim rezultatima prve pasaže izolacije virusa mora postaviti druga i treća pasaža. Svaka pasaža traje do 7 dana inkubacije ukoliko se ne pojavi citopatogeni efekat. Minimum od dvadeset jedan dan koliko je potrebno za tri pasaže izolacije virusa, predstavlja dug vremenski period od momenta postavljanja sumnje do postavljanja tačne dijagnoze. Veliki broj autora nije uspeo da izoluje virus PI3 na odgovarajućoj ćelijskoj liniji u prvoj i drugoj pasaži (**Gafer i sar. 2009, Fulton i sar. 2012., Kawakami i sar. 1966.**). Potrebno je uzeti u obzir da izolacija virusa koja se karakteriše pojavom citopatogenog efekta na ćelijskoj liniji koja je prijemčiva za rast više različitih vrsta virusa, nije dovoljna za postavljanje dijagnoze. Posle izolacije potrebno je uraditi identifikaciju virusa jednom od specifičnih virusoloških laboratorijskih metoda, kao što su virusneutralizacija ili metoda direktne imunofluorescencije što produžava vreme čekanja na finalnu dijagnozu (**Fulton i sar. 2012**). Reagens za metodu direktne imunofluorescencije predstavljaju monoklonska antitela protiv virusa PI3 goveda koja su preko trikarbamidskih veza konjugovana sa fluoresceinizotiocijanatom (FITC) (**Mohan i sar. 2008**) tako da epitopi na antitelima za vezivanje za specifičan antigen ostaju slobodni, a FITC dovodi do fluorescencije vezanog reagensa sa antigenom. Fluoresceinizotiocijanat ima eksicaticiju fluorescencije na 495 nm talasne dužine i emisiju na 525 nm koja se očitava kao jasna fluorescentna žutozelena boja (**Robinson i sar. 2000**). Međutim za metodu imunofluorescencije potrebno je izolovati i umnožiti virus na ćelijskoj liniji ili uraditi isečak preparat iz tkiva u kome je prisutan antigen. Navedeni postupak ukazuje na potrebu uvođenja drugih metoda koje imaju približnu pouzdanost (specifičnost i osetljivost), a zahtevaju znatno kraće vreme koje je potrebno za postavljanje konačne dijagnoze. Zbog toga je upotreba molekularnih metoda u dijagnostici virusnih bolesti dobila veliki značaj. Molekularne metode ne zahtevaju strogo sterilne uslove rada, dok se vreme od početka analize do postavljanja dijagnoze meri satima. Molekularne metode, kao što je polimeraza lančane reakcije (PCR), zasnivaju se na otkrivanju dela genoma u ispitivanom materijalu koji je visoko specifičan za jednu vrstu virusa. U poslednje vreme primenom specifičnih prajmera u virusološkoj dijagnostici, PCR metodom omogućeno je i otkrivanje dela

genoma koji je specifičan samo za određeni soj virusa (primer: prajmeri za otkrivanje samo China soja virusa klasične kuge svinja, prajmeri za otkrivanje La Sota soja virusa Newcastle bolesti živine (NDV) i dr.). Pored navedenih prednosti, jedino određene molekularne metode dijagnostike kao što je sekvenciranje, omogućavaju identifikaciju serotipova svih izolovanih sojeva virusa i određivanje njihove pozicije na filogenetskom stablu. Ovakva vrsta identifikacije uzročnika predstavlja novi kvalitet u dijagnostici uzročnika infektivnih bolesti koji nam ranije nije bio dostupan. Sekvenciranje dela genoma određenog uzročnika ima veliku upotrebnu vrednost u epizootiološkim i forenzičkim analizama.

Imunoprofilaksa infekcije goveda izazvane virusom parainfluence 3, sprovodi se vakcinacijom. Iako na tržištu postoje žive atenuirane i inaktivisane monovalentne vakcine protiv virusa PI3, danas su iz ekonomskih razloga sve više u upotrebi polivalentne vakcine protiv PI3, IBR i BRSV, kao najčešćih izazivača virusnog respiratornog sindroma goveda. Sojevi virusa PI3 goveda koriste se i kao master seed za vakcinaciju protiv humanog virusa PI3 kod ljudi (**Greenberg i sar. 2005**). Zamena F i HN glikoproteina između humanih i govedih sojeva virusa PI3, dovodi do restrikcije umnožavanja virusa u svojoj autohtonoj vrsti za koju je primarno bio izrazito patogen. Ova osobina virusa PI3 dovela je do pojave efikasnijih rekombinantnih vakcina protiv PI3. Sve registrovane vakcine protiv virusa PI3 stvaraju specifičan imunitet, međutim on ne traje dovoljno dugo (kraće od godinu dana) i u testu efikasnosti vakcine dolazi do pojave blagih respiratornih simptoma i kod vakcinisanih jedinki (**Pfizer, Technical Bulletin 2010**). Posle vakcinacije u testu veštačke infekcije, izolacija virusa je bila uspešna u 38% slučajeva u grupi vakcinisanih jedinki i u 63% kod nevakcinisanih jedinki. Pri tome, 6% vakcinisanih jedinki zahtevalo je terapijski tretman u vakcinisanoj grupi, dok je u nevakcinisanoj grupi taj procent iznosio 63%. Iako je atenuirana vakcina imunogenija, preporučuje se upotreba inaktivisanih vakcina koje nemaju neželjene sporedne efekte niti ograničenja u vakcinaciji kao atenuirana vakcina (**Gale i sar 2010**). Kada ovome dodamo činjenicu da prisustvo antitela protiv BPI3 virusa u cirkulaciji nije garancija zaštite jedinki od sledeće infekcije drugim sojevima virusa PI3, jasno je da kontroli i suzbijanju parainfluence 3 kod goveda treba posvetiti veću pažnju.

Sekvenciranjem izolovanih sojeva virusa PI3 goveda, može se odrediti prisustvo određenih genotipova virusa kao i njihova srodnost sa već postojećim izolovanim sojevima virusa PI3 u svetu. Mnogi autori su došli do iznenađujućih podataka koji su govorili u prilog tezi da virusi ne poznaju granice u svom širenju i da ne treba očekivati samo sojeve virusa PI3 koji su prisutni u zemljama bliskog okruženja. Današnji vidovi komunikacije i transporta ljudi i životinja, pogoduju lakom međunarodnom širenju virusa i izvesna podela svetskih regiona na osnovu prisusva određenih genotipova virusa PI3 više nije aktuelna. Godinama se smatralo da je genotip B virusa PI3 prisutan jedino u Australiji, da Sjedinjene Američke Države i Japan imaju na svojoj teritoriji jedino genotip A i slično. Novija istraživanja dokazala su prisustvo genotipa B u Južnoj Americi, a nova istraživanja sekvenciranja izolovanih virusa PI3 goveda u SAD dokazala su prisustvo sva tri genotipa A, B i C na njihovoj teritoriji (**Neil i sar.2015.**). **Konishi i sar. 2014.** otkrili su prisustvo prvih izolata virusa PI3 genotipa C na teritoriji Japana. Ova nova saznanja imala su kao jednu od posledica kompletnu preformulaciju plana imunoprofilakse u Severnoj Americi, s obzirom na to da se dosadašnja vakcinacija protiv virusa PI3 obavljala samo protiv genotipa A. **Wen i sar. 2012.** su molekularnom karakterizacijom i to sekvenciranjem dela HN i M gena virusa PI3, ustanovili da autohtoni izolat NM09 ne pripada, kako se do tada smatralo, genotipu C već genotipu A. Slični rezultati dobijeni su i molekularnom karakterizacijom humanih sojeva virusa PI3 gde su autori iz Saudijske Arabije dobili viši stepen nukleotidne homologije domaćih sojeva sa sojevima dalekog istoka, nego sa virusima iz zemalja svog okruženja sa bliskog istoka. Sekvenciranje i stepen nukleotidne homologije može dati odgovore na pitanja primarnog porekla sojeva virusa koji su prvobitno izolovani iz drugih životinjskih vrsta, kao što je slučaj sa virusom PI3 goveda izolovanog i godinama pogrešno posmatranog kao virus PI3 svinja. Ovakvih primera ima mnogo u današnje vreme i zato je cilj ove doktorske disertacije da se uz pomoć identifikacije i molekularne karakterizacije domaćih izolovanih sojeva virusa PI3 goveda, ustanovi njihova genotipska pripadnost i definišu virusi PI3 sa kojima domaći izolovani virusi pokazuju najviši stepen homologije u ispitanim sekvencama.

2. PREGLED LITERATURE

Prvu izolaciju paramiskovirusa 3 goveda na području Bliskog istoka izvršili su **Allawe i sar 2012.** ispitujući briseve goveda sa respiratornim simptomima na sekundarnoj embrionalnoj kulturi tkiva bubrega goveda. U izolaciji virusa nije bilo mikroskopski vidljivog citopatogenog efekta u prve dve pasaže. Tek petog dana inkubacije u trećoj pasaži došlo je do pojave citopatogenog efekta sa zaokrugljivanjem ćelija, degeneracijom i odlepljivanjem ćelija sa podloge, pri čemu je bilo vidljivo stvaranje giganstskih ćelija odnosno formiranja sincicijuma. Sojevi virusa identifikovani su metodama virusneutralizacije sa domaćim hiperimunim serumom protiv virusa PI3, testom direktne imunofluorescencije i heminhibicionim testom sa suspenzijom eritrocita zamorca. Došli su do zaključka da su metode virusneutralizacija kao i imunofluorescencija znatno osetljivije metode u poređenju sa metodom heminhibicije za koju je potreban visok titar virusa za jednu hemaglutinacionu jedinicu. Rezultati istraživanja su u skladu sa prethodnim ispitivanjima i rezultatima poređenja navedenih metoda. Na osnovu rezultata, zaključili su da je metoda direktne imunofluorescencije tri puta osetljivija od metoda hemaglutinacije.

U svom radu **Almeida Vaucher i sar. 2008.** ispitivali su mogućnost dijagnostike PI3 virusa goveda metodom konvencionalnog RT PCR u poređenju sa klasičnim virusološkim metodama. Kao pozitivnu kontrolu koristili su referentni soj SF4, a kao negativnu kontrolu koristili su ćelijsku liniju MDBK koja nije inokulisana virusom. Laboratorijsku izolaciju virusa izvršili su inokulacijom na ćelijskoj liniji MDBK, a potvrdu i identifikaciju virusa PI3 goveda metodom hemaglutinacije i direktne imunofluorescencije. Koristili su tri izolovana soja virusa PI3 poreklom iz Brazila i to dva izolovana iz nosnih briseva obolelih teladi, a treći soj bio je poreklom od slučajno inficirane-kontaminirane ćelijske linije MDBK. Za direktnu imunofluorescenciju koristili su inokulisanu ćelijsku kulturu MDBK posle 72 sata inkubacije. Preparate su fiksirali u apsolutnom acetonu 10 minuta, a inkubacija ispitivanog materijala sa

konjugatom trajala je 30 minuta na 37°C. Posmatrali su rezultate pod fluorescentnim mikroskopom i kao pozitivnu kontrolu koristili soj SF4. Sve identifikovane izolovane viruse PI3 goveda i referentni soj ispitali su metodom konvencionalnog RTPCR-a koristeći prajmere iz konzervisanog dela genoma virusa PI3 hemaglutininско-neuraminidaznog HN gena. U ispitivanju senzitivnosti metode postavljali su RT PCR reakciju sa različitim razređenjima pozitivnog materijala poznatih titrova virusa izraženim u jedinicama TCID₅₀/ml. Kao pozitivan rezultat PCR reakcije dobijali su proizvod veličine 1009 baznih parova. Ustanovili su da je osetljivost metode PCR na nivou 140 TCID₅₀. U testu specifičnosti metoda PCR je pokazala 100% specifičnosti. Svi izolati BPI3 uspešno su identifikovani metodom RTPCR i nijedan drugi virus koji je bio ispitivan sa navedenim prajmerima nije doveo do pozitivnog rezultata. RTPCR test bio je urađen sa tri izolata BPI3 iz Brazila, referentnim sojem SF4 virusa PI3 i sa 5 različitih paramiksovirusa i to: humani PI3 virus, virus štenećaka, Equine Influenza virus (soj H2N2), humani PI2 virus, Humani parainfluenca 1 virus i herpes virus goveda (BHV1). Iako je ispitivan mali broj uzoraka BPI3 virusa, autori su došli do zaključka da je metoda RT PCR u potpunosti zadovoljila sve zahteve za detekciju terenskih sojeva virusa PI3 goveda, što je u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima kod ispitivanja upotrebne vrednosti RT PCR metode.

Almeida Vaucher i sar. 2011. izvršili su karakterizaciju brazilskih terenskih izolovanih sojeva virusa PI3 goveda i izolovanog soja PI3 virusa iz kontaminirane ćelijske linije. Prvi soj virusa je izolovan iz kontaminirane ćelijske linije MDBK a ustanovljeno je i da je ćelijska linija PK15 takođe kontaminirana sa PI3 virusom goveda koji je kasnije takodje umnožen i izolovan na nekontaminiranoj ćelijskoj liniji MDBK. Kao referentan soj virusa BPI3 koristili su SF4 soj (USA), a izvršili su karakterizaciju dva soja virusa izolovana posle abortusa junica i jedan soj pod oznakom „DIO“ koji je izolovan iz nazalnog brisa teleta. Za dobijanje sekvence uradili su RTPCR reakciju prajmerima za deo HN gena i za deo L gena. Svi brazilski sojevi koji su kontaminirali ćelijske linije, kao i terenski sojevi, imaju vrlo jasnu visoku nukleotidnu homologiju sa istom HN sekvencom soja SF4. U Brazilu se, još od

1980. godine, koriste dve vakcine protiv virusa PI3 goveda proizvedene od SF4 soja i to inaktivisana i atenuirana vakcina. Obe vakcine su na tržištu Brazila dugi niz godina pa se moglo posumnjati da su izolovani sojevi ustvari vakcinalni sojevi. Međutim, neke osobine svih ispitanih izolata i iz kontaminiranih ćelijskih linija i terenskih izolata, pokazuju izvesne razlike od originalnog SF4 soja, što jasno ukazuje na činjenicu da se radi o terenskim sojevima. Kada su upoređivane dobijene sekvence dela L gena virusa PI3, one su imale nukleotidnu homologiju od preko 97% sa sojevima genotipa A i 84 do 89% nukleotidne homologije sa sojevima genotipa B.

Abinati i sar. 1961. veštačkom infekcijom zamoraca referentnim humanim i goveđim sojem virusa parainfluence 3 (sojevi HA1 i SF4), ustanovili su da je imuni odgovor izražen HI titrom, CF testom (komplement fiksacija, reakcija vezivanja komplementa) i nivoom antitela (antitela u testu neutralizacije), barem $3 \log_2$ viši prema homologom soju koji je korišćen za proizvodnju hiperimunog seruma, nego prema drugi ispitanim sojevima. Na ovaj način se uvek može, na osnovu razlike u titru prema referentnom soju virusa, odrediti koji je soj u pitanju (soj virusa koji je doveo do infekcije).

Almajhdi i sar 2012 izvršili su molekularnu karakterizaciju izolata humanog PI3 virusa Saudijske Arabije i ustanovili da je najveća nukleotidna homologija ispitanih njihovih domaćih sojeva virusa PI3 sa indijskim, kineskim i japanskim sojevima. Iako je humani virus parainfluence 3 prisutan u celom svetu, najviši nivo nukleotidne homologije nije bio sa sojevima iz zemalja okruženja, kao što su autori očekivali, već sa sojevima iz zemalja Dalekog istoka.

Breker Klassen i sar. 1996. upoređivali su sekvence F i HN gena različitih sojeva virusa PI3 goveda i utvrdili povezanost fenotipa sa patogenošću sojeva. PCR metodom dobili su sekvence F i HN gena, a sekvenciranje su uradili direktnom metodom po Sangeru. Poredili su tri soja i to SF4, SK217 i 910N soj. Sve virus su prethodno umnožili na ćelijskoj liniji Vero, prateći pojavu sincicijuma i to kako broja jedara jednog sincicijuma, tako i broja sincicijuma po jedinici površine. Pokušali su da ustanove korelaciju patogenosti

virusa sa veličinom i brojem sincicijuma na osnovu hipoteze da su sojevi koji stvaraju veći broj višejedarnih sincicijuma u isto vreme i patogeniji. Ustanovili su da samo promene na F genu bez promena na HN genu ne dovode do povećanja patogenosti niti do pojave većeg broja višejeradnih sincicijuma. Patogenost se menja jedino genetskim promenama na oba gena, F i HN. F i HN glikoproteine omotača poseduje veliki broj paramiksovirusa koji takodje stvaraju sincicijume. Virus PI3 goveda je prvi put izolovan 1959. godine.

Bhattacharyya i sar. 2011. preporučili su modifikaciju metode za direktnu imunofluorescenciju nativnih ćelija kulture tkiva. Predložili su zamenu formaldehida kao standardnog fiksacionog sredstva za kulturu tkiva, fiksacijom metanolom i acetonom na temperaturi od -20 st. C. Princip se zasniva na rehidrataciji, pri čemu se masnim rastvaračima odstranjuju masti i vrši trenutna precipitacija proteina. Oktilglikozid je supstanca koju su koristili kako bi se izbegao visok bekgraund koji se pojavljuje kod nekih antitela obeleženih fluoresceinom. Naučnici smatraju da je brže prenošenje pločice sa kulturom tkiva u aceton sa metanolom od velikog značaja za dobijanje preciznije slike imunofluorescencije. Uzorci mogu stajati nedeljama u sredstvu za fiksaciju preparata na -20 st. C. Takođe, gotovi obojeni preparati mogu da se koriste nekoliko nedelja ako se čuvaju u mraku na sobnoj temperaturi bez hlađenja i zamrzavanja.

Charlton i sar. su razmatrali potrebu za validacijom metode PCR i karakteristikama samog testa. Definisali su parametre za procenu osetljivosti detektabilnosti, tačnosti analize, specifičnosti i robustnosti same PCR metode. U proceni specifičnosti PCR metode oni navode parametre kao što su dizajn prajmera, „bekgraund“ signala DNK, uloga ukupne totalne količine DNK i njene čistoće, uslovi izvođenja reakcije kao što su parametri termoprocatora ili sastav pufera. Kao indikatore umnožavanja nespecifičnog produkta navode veličinu fragmenta koja se procenjuje na elektroforezi na gelu, visok „bekgraund“ signal u kome se nalazi očekujući proizvod, neočekivani bendovi kod pozitivnih i negativnih kontrola i fragmenti (proizvodi) očekivane dužine, ali koji se ne mogu iz materijala potvrditi drugim metodama, kao što su restrikcione analize i

dr. U proceni robustnosti PCR metode oni su razmatrali parametre kao što su koncentracija DNK samog uzorka, koncentracija prajmera, koncentracija Mg jona, temperaturni interval termosajklera ili prisustvo različitih komponenti u puferu. U proceni konzistentnosti rezultata, naučnici su razmatrali identičnost rezultata u slučaju promene laboratorije, promene laboratorijske opreme i promene ostalih uslova rada.

Crandel i sar. 1974, su ispitivali uporednu patogenost i intenzitet citopatogenog efekta soja SF4 soja i Varijant VSF4 soja virusa parainfluence 3 goveda. Varijant soj je nastao primarno od SF4 autohtonog terenskog izolovanog soja virusa PI3 goveda. Zaključili su da VSF4 soj stvara brži i obimniji citopatogeni efekat in vitro na kulturi tkiva MDBK od matičnog SF4 soja. Postavili su eksperiment, umnožili dovoljnu količinu varijant VSF4 i matičnog SF4 soja na ćelijskoj liniji MDBK i uradili kontrolisanu veštačku infekciju teladi. Pratili su da li je varijant soj kao citopatogeniji in vitro takođe patogeniji za sluznicu traheje. Pre inokulacije prikupili su uzorke nazalnih briseva svih životinja. Brisevi su bili od pamuka, uzeti iz obe nozdve sa grubljim trljanjem septuma i turbinata posle čega su brisevi potapani u 2 ml medijuma za ćelijske kulture. Brisevi su zamrzavani na -70°C do upotrebe. Telad su inokulisali sprejem intranazalno sa 0,2 ml virusne suspenzije titra $6,6 \log 10$ TCID /ml. Izolaciju virusa iz nazalnog brisa inficiranih goveda obavljali su svakodnevno postavljajući svaki bris na po 6 epruveta sa izraslom ćelijskom linijom i inokulišući po 0,2 μl filtriranog supstrata u kome je bio potopljen bris. Uspeli su da izoluju virus PI3 goveda u intervalu od prvog zaključno sa četvrtim danom posle infekcije. Virus nisu mogli izolovati ni iz jednog brisa sedmog ili četrnaestog dana posle infekcije. Oba virusa SF4 i VSF4 posle inokulacije dovela su do blagog febrilnog stanja sa blagom hipersalivacijom kod inficiranih grla u eksperimentu. Simptomi su bili vrlo blago izraženi. Samo u jednom slučaju došlo je do ozbiljnijih respiratornih simptoma gde je dokazano prisustvo bakterije iz roda *Pasteurella* kao uzročnika sekundarne infekcije. Ustanovili su da varijant soj, iako ima izraženiji citopatogeni efekat in vitro u poređenju sa matičnim SF sojem, nije patogeniji za telad od matičnog soja virusa.

Coelingh i sar. 1986. ispitivali su konzervirane epitope hemaglutinin neuraminidaza proteina humanog i goveđeg soja parainfluenca 3 virusa. Pripremili su sekvence i poredili epitope humanog i goveđeg glikoproteina uz pomoć monoklonskih antitela prateći postojanje sličnosti i razlika u njihovoj građi. Ustanovili su da su epitopi na delu D i F kao i dva mesta na delu A, HN glikoproteina humanog soja virusa PI3, iako vrlo konzervisana, identična sa istim epitopima goveđeg HN glikoproteina. Sličnost između HN proteina humanog PI3 i Pi3 virusa goveda mnogo je veća nego između humanog HN proteina i HN proteina Sendai virusa.

Dong i sar. 2012. ispitivali su mogućnost pronalaženja laboratorijskog modela za istraživanje virusa PI3 goveda iz genotipske grupe B i C. Do tada nije bilo poznato da i jedan soj iz navedenih serotipskih grupa može inficirati laboratorijske životinje. Samo virusi BPI3 serotip A mogli su se umnožavati na laboratorijskim životinjama. Uradili su eksperimentalnu infekciju laboratorijskih miševa sojem SD0835 koji je referentan soj genotipske grupe C virusa BPI3. Uspeli su da dobiju izraženu kliničku sliku respiratorne infekcije kod inficiranih miševa, a kao dokaz potvrdili su prisustvo virusa BPI3 metodom direktne imunofluorescencije u tkivu traheje i pluća inficiranih miševa. Ovim eksperimentom omogućena su detaljnija ispitivanja patogeneze virusa BPI3 serogrupe C u budućnosti.

Eberkle i sar. 2015. sekvencirali su kompletan genom virusa parainfluenca 3 koji je izolovan iz delfina sa poremećajima respiratornog trakta. Prvobitno je navedeni izolovani soj bio svrstan u posebnu grupu PI3 virusa, na osnovu relativno niske homologije prve ispitane sekvence genoma navedenog izolovanog soja sa ostalim poznatim sojevima virusa PI3. Eberkle i sar. su uradili kompletno mapiranje i sekvenciranje celog genoma i ustanovili visoku homologiju rasporeda nukleotida svih 6 gena sa izolatima PI3 virusa goveda genotipske grupe B. Na osnovu molekularnih analiza, autori su predložili svrstavanje soja virusa PI3 delfina u sojeve virusa PI3 goveda i to u genotipsku grupu B.

Elazhary i sar. 1979. ispitivali su stabilnost virusa BPI3 u aerosolu i nazalnim brisevima obolelih jedinki. Pratili su uticaj vremena, temperature, vlage i medijuma u kome se nalazi virus PI3. Ispitivanja su izvršili u podlogama Eagle MEM i nazalnom aerosolu zdravih neinficiranih jedinki. Pratili su titar virusa PI3 u sredini sa vlagom od 30 do 90% na temperaturama od 6 i 32 °C, u vremenu od nekoliko minuta posle uzimanja uzorka do naredna tri sata. Rezultati ukazuju na veliki značaj pravilnog uzimanja, čuvanja, vremena i načina transporta uzoraka briseva sa virusom PI3 do laboratorije. Na 32°C, brisevi koji su bili u E MEM-u gubili su na tiru virusa 1,3 log₁₀ u roku od 7 minuta, do gubitka od 4,2 log₁₀ TCID₅₀ u roku od 3 sata od uzorkovanja. Na 6°C pad titra bio je 0,4 log₁₀ TCID u roku od 7 minuta do pada titra od 1,6 log₁₀ TCID u roku od 3 sata. Ako se virus nalazio u aerosolu zdravih životinja kao svom prirodnom medijumu, titar virusa opadao je 3,6 log₁₀ TCID na 32°C u roku od 3 sata. U istom vremenskom intervalu, na temperaturi od 6°C pad titra je iznosio: sa 4,9 log₁₀ TCID_{50%} na 3,1 log₁₀ TCID_{50%}. Rezultati ukazuju na veliki značaj temperature i vremena koje protekne od uzorkovanja do dolaska uzorka u laboratoriju. Značaj procenta vlažnosti je mali kod čuvanja i transporta uzoraka na niskim temperaturama, ali ima veliki značaj na višim temperaturama transporta briseva jer se virus BPI3 posle tri sata nije mogao izolovati kada je transportovan i čuvan na 32°C, pri procentu vlage do 90%. Zaključili su da se brisevi moraju čuvati na temperaturi hladnjaka od 2-8°C i transportovati u laboratoriju u što kraćem roku. Poznato je da virusi lakše zadržavaju svoju vitalnost i stabilnost na niskim temperaturama i u kraćim vremenskim intervalima. Ipak, ovo je prvi dokaz da virus PI3 može izgubiti i 5 log₁₀ TCID_{50%} za 3 sata na temperaturi od 32°C, pri vlažnosti od 90%.

Fulton i sar. 2012. razmatrali su parametre kvaliteta laboratorijskih testova u dijagnostici oboljenja respiratornog sindroma goveda, kao i postojanje standardnih metoda u dijagnostici virusnih bolesti. Potpuna dijagnostika u veterinarsoj medicini trebalo bi da obuhvata tri aspekta i to: definiciju makroskopskih i mikroskopskih promena zahvaćenih organa, definiciju etiološkog agensa i faktore koji su doprineli razvoju bolesnog stanja (deficiti u ishrani, uslovi sredine i dr.). U laboratorijskim metodama koje se koriste u

dijagnostici virusa kao najvažnijih uzročnika respiratornog sindroma goveda, navodi se da je virusneutralizacioni test najčešći test koji se koristi i da, i dalje, predstavlja zlatni standard u dijagnostici virusnih bolesti onih izazivača koji stvaraju citopatogeni efekat na kulturi tkiva ili ćelijskoj liniji. Pored njega, koriste se i hemaglutinacija sa heminhibicijom kao i ELISA test, mada su navedene metode u široj upotrebi kod imunološko-seroloških analiza. Izolacija virusa je i dalje najčešće upotrebljavana laboratorijska metoda u postavljanju dijagnoze respiratornog sindroma goveda, mada treba imati u vidu da nisu svi virusni uzročnici i citopatogeni (acitopatogeni sojevi BVD virusa) te da se navedena metoda ne može koristiti samostalno, već je potrebna potvrda i identifikacija agensa čak i kada postoji prisutan CPE. Identifikacija se najčešće obavlja testom virusneutralizacije ili metodom direktne imunofluorescencije. U svakom slučaju, sama izolacija virusa traje minimum 7 dana u jednoj pasaži, a potrebno je uraditi 3 pasaže ukoliko se ne pojavljuje vidljiv citopatogeni efekat u prve dve pasaže. Trajanje izolacije virusa je predugo pa koristi od ovakve dijagnoze gube na značaju kada se posmatra ekonomski, ali i terapijski aspekt u veterinarskoj medicini i stočarstvu. Metoda direktne imunofluorescence je brza, osetljiva i specifična metoda u virusologiji, ali ima nedostatak što sam preparat ima ograničen vek trajanja i što je često neophodna primarna izolacija na kulturi tkiva. Ovakvi preparati se ne mogu poslati na potvrdu u neku drugu laboratoriju niti čuvati duže vreme. Razvoj molekularnih metoda doveo je do mogućnosti brzog postavljanja precizne dijagnoze. Molekularne metode ne zahtevaju toliko vremena niti preciznosti i iskustva u radu kao metode sa kulturom tkiva i ćelijskim linijama. Danas su najviše u upotrebi polimeraza lančane reakcije bazirane na gel elektroforezi (konvencionalni PCR, multiplex PCR) ili modifikovane kao polimeraza lančana reakcija čitana u realnom vremenu (real time PCR). Sve PCR reakcije zasnivaju se na umnožavanju dela genoma virusa na koji je postavljena sumnja i to uz pomoć visoko specifičnih prajmera (delova genoma odnosno gena, koji se sastoje od 18 do 22 nukleotida u rasporedu karakterističnom samo za traženi rod, vrstu ili serotip (serovar) virusa). Serološke metode su manje u upotrebi kad je reč o dijagnostici respiratornog sindroma goveda, pošto je ustanovljeno da prisustvo specifičnih

antitela protiv nekih uzročnika ne dovodi do zaštite od infekcije istim uzročnikom (primer za ovu tvrdnju je upravo virus parainfluence 3 goveda).

Frederick, Paul, Gibbs, 2000. u svom delu "Veterinarska virusologija" (3. izdanje) iznose sledeće podatke vezane za rod paramiksovirusa i parainfluencu 3 goveda. Familija *Paramyxoviridae* zajedno sa familijama *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* i *Bornaviridae* formiraju red *Mononegavirales*. Red je ustanovljen na osnovu filogenetskih sličnosti koje se ogledaju u konzerviranim genomskim domenima, sličnoj strategiji ekspresije gena i replikaciji. Svi virusi su sa omotačem i imaju peplomere. Paramyxovirusi imaju genom koji se sastoji od jednog negativnog lanca RNA veličine od 15 do 16 kilobaza. Peplomere se sastoje od dva proteina, hemaglutinin neuraminidaza HN i fuzionog proteina F. Vezivanje za ćeliju domaćina odigrava se preko HN proteina koji izaziva proizvodnju najvećeg broja antitela i smatra se najznačajnijim imunogenom virusa za humoralni odgovor domaćina. Za efikasnost vakcine neophodno je da on izaziva stvaranje antitela protiv HN i protiv F protein virusa. Fuzioni protein je najodgovorniji protein za vezivanje i ulazak virusa u ćeliju. Njegov inaktivni oblik prelazi u aktivni samo ukoliko ćelija domaćina poseduje odgovarajuću proteazu. Ukoliko ćelja domaćina ne poseduje odgovarajuću proteazu, virus ostaje neinfektivan za ćeliju domaćina. Familija Paramyxovirusa je podeljena u subfamilije *Paramyxovirinae* i *Pneumovirinae*. A subfamilija *Paramyxovirinae* se sastoji od rodova Respirivirus, Rubelavirus i Morbilivirus. Genom Respirovirusa, pa samim tim i Parainfluenca virusa 3 goveda, sastoji se od NP, P, M, F, HN I L gena. Najveći gen je L (large) gen koji se sastoji od preko 6000 nukleotida lanca RNA. Nukleoprotein NP ima funkciju u stabilizaciji i zaštiti genoma i njegove transkripcije. L I P proteini imaju funkciju transkriptaze i učestvuju aktivno u transkripciji genoma RNA. M je matriks protein i ima značajnu ulogu u stabilnosti viriona. Virus parainfluence 3 izaziva poremećaj gornjih partija respiratornog trakta, groznicu, depresiju, dispnoju, kašalj i hipersalivaciju. Bolest najčešće prolazi sama od sebe bez lečenja za 3 do 4 dana bolovanja, ukoliko ne dodje do sekundarnih infekcija. Ipak, u nekim okolnostima i bez sekundarnih infekcija može nastati intersticijalna pneumonija. Razvoju bolesti

pogoduju loši higijenski uslovi, prenaseljenost, loša ventilacija, loša ishrana, transport i ekstremni klimatski uslovi. Prebolele jedinke imaju dosta jak humoralni imuni odgovor koji se ogleda u visokom nivou antitela odgovornih za heminhibiciju, neuraminidaznu inhibiciju i neutralizaciju. Uloga celularnog imunog odgovora nije do kraja razjašnjena. Imuni odgovor je kratkog veka i prebolele jedinke mogu ponovo oboleti posle nekoliko meseci. Za dijagnostiku kao najpodesniji materijal smatra se nazalni bris uz koga se virus izoluje u intervalu od nultog do sedmog ili najkasnije devetog dana od pojave prvih simptoma. Među virusima koji spadaju u rod Repirovirusa najpoznatiji predstavnici su virus parainfluence goveda, pseći parainfluenca virus 2, mišiji parainfluenca virus (Sendai) i humani virus parainfluenca 3. Virus PI3 se umnožava u citoplazmi i inkluzije se nalaze samo u njoj, a kasnije i u jedru. Virion se sastoji od heličnog simetričnog nukleokapsida oblika riblje kosti dužine 600 do 800 nm i širine 18 nm.

Gužvić 2013. je priredio pregled istorijata sekvenciranja DNK i došao do zaključka da je razvijena već četvrta generacija sekvenciranja i da nauka u ovoj disciplini primenjene genetike takvom brzinom napreduje da ne isključuje mogućnost pojave novih metoda sekvenciranja pre samog objavljivanja rada. Za sekvenciranje humanog genoma bilo je potrebno 15 godina primarnim metodama sekvenciranja dok se isti posao danas može završiti za nekoliko sati metodama treće generacije sekvenciranja. Cena sekvenciranja pre nekoliko godina bila je mnogostruko veća u poređenju sa aktuelnom cenom za isto sekvenciranje novijim metodama. Prva generacija sekvenciranja obuhvata hemijsko vezivanje i Sanger metod sekvenciranja. Hemijsko vezivanje je metoda koja je brz napuštena zbog neophodnosti korišćenja nekih hemikalija koje su veoma jaki neurotoksini (hidrazin), a uz to bila je potrebna velika količina DNA s obzirom na to da se metoda morala uraditi kroz četiri ili osam reakcija. Sanger metod sa korišćenjem dideksinukleotida i danas je aktuelna i izvodi se u jednoj reakciji. Mogućnost automatizacije Sanger metode sa dideoksiterminalnim nukleotidima koji su obeleženi različitim bojama, ubrzalo je i znatno pojeftinilo sam proces sekvenciranja. Ova metoda korišćena je i kod prvog kompletnog sekvenciranja jednog bakterijskog genoma *Haemophilus influenzae*, prvog

eukariotskog genoma *Sacharomyces cerevisiae* i sl. Umesto radioaktivnih izotopa korišćene su fluorescentne boje, a automatizacija i veća brzina reakcije omogućeni su korišćenjem kapilare umesto gela pri čitanju reakcije. I danas se automatizovano direktno sekvenciranje po Sangeru smatra zlatnim standardom u sekvenciranju. Druga generacija sekvenciranja obuhvata 454 sekvenciranje sa luciferazom-ATP, Illumina sekvenciranje i SOLiD. Treća generacija sekvenciranja obuhvata “jon torent”, “single molecule real time (SMRT)” sekvenciranje, a četvrta generacija obuhvata metode sekvenciranja koja se naziva “nanopore” sekvenciranje.

Greenberg i sar 2005. ispitivali su vakcinu protiv parainfluence 3 kod ljudi koja je bila pripremljena od goveđeg soja virusa PI3. Prethodno je dokazano da je u testu na primatima vakcina pripremljena od goveđeg PI3 soja štitila vakcinisane jedinke. Virus humane parainfluence je drugi izazivač bronhiolitisa i pneumonije kod dece (odmah posle respiratornog sincicijalnog virusa). Goveđi parainfluenca virus 3 je već bio u kliničkim ispitivanjima kao živa intranazalna vakcina za zaštitu dece od infekcije humanim sojevima virusa parainfluence 3. Kao antigen korišćen je Kansas 15626/84 soj virusa koji je umnožen na MDBK ćelijskoj liniji. Vakcinisana su deca starosti od dva meseca, a vakcinacija je ponovljena u četvrtom, šestom i dvanaestom mesecu života. Dokazano je da je vakcina imunogena i bezbedna za upotrebu kod dece.

Gafer i sar. 2009. izvršili su izolaciju i identifikaciju soja virusa PI3 kod ovaca i koza koristeći referentni soj PI3 virusa goveda, kao i specifičan hiperimuni serum protiv virusa PI3 goveda. U karakterizaciji virusa koristili su i konvencionalnu RT PCR metodu i to sa prajmerima konzerviranog dela F gena BPI3 genoma virusa goveda. Ispitali su 125 nosnih briseva ovaca i koza koje su imale simptome respiratornog oboljenja. U tri slučaja uspeli su da izoluju virus PI3 iz ispitujućeg materijala ovaca kao i iz referentnog soja virusa PI3 goveda. Umnožavanje virusa su uradili na ćelijskoj liniji MDBK, po standardnoj proceduri, i citopatogeni efekat svih izolata su dobili u trećoj slepoj pasaži. Izolate su identifikovali metodom virusneuralizacije, hemaglutinacije, kao i

metodom direktne imunofluorescencije. Nešto slabiji rezultati u testu hemaglutinacije nastali su usled potrebe za visokim titrom virusa koji je potreban za jednu hemaglutinacionu jedinicu, odnosno zbog slabije osetljivosti same laboratorijske metode. Test neutralizacije virusa izvršili su sa hiperimunim serumom protiv virusa PI3 goveda koji su nabavili iz Ajove SAD (Iowa, USA). U molekularnoj identifikaciji sojeva virusa PI3 koristili su metodu RT PCR i prajmere za F gen PI3 virusa goveda, koje je koristio Lion i sar. 1997. Uspešnost seroloških metoda ukazuje na veliku genetsku podudarnost između virusa sojeva PI3 goveda i ljudi, i PI3 ovaca i koza. Metodom RT PCR dobili su PCR proizvod koji ima istu dužinu od 400 baznih parova koja se dobija sa istim prajmerima u pretrazi govedih sojeva PI3 virusa. Rezultate RT PCR reakcije su čitali na 1,5% agarozu gelu sa etidijum bromidom.

Gale C. i sar. 2010. u svom radu o ulozi Parainfluenca virusa 3 kod goveda, navode nekoliko podataka vezanih za raširenost i profilaktičnu zaštitu protiv virusa PI3 goveda. Na tržištu se mogu naći žive atenuirane vakcine protiv PI3 goveda kao i inaktivisane vakcine. Atenuirane vakcine se ne smeju aplikovati gravidnim jedinkama zbog mogućnosti abortusa. Preporučuje se inaktivisana vakcina. Iako inaktivisana vakcina sporije stvara imunitet, poželjnija je i sigurnija. Atenuirana vakcina stvara imunitet ranje, ali se ona može aplikovati samo pre pojave bolesti, simptoma i već prisutnog uzročnika. Junice koje su vakcinisane inaktivisanom vakcinom pokazale su veću zaštitu od kontrolne grupe i nakon prirodne infekcije, a samo 6,6% vakcinisanih jedinki je zahtevalo tretman. U grupi nevakcinisanih jedinki lečenje je bilo potrebno kod 36,6% jedinki. Kod upotrebe atenuirane vakcine ustanovljeno je smanjenje intenziteta simptoma respiratornih infekcija posle prirodne inficiranosti virusom PI3. U grupi vakcinisanih jedinki bilo je moguće izvršiti izolaciju virusa u 38% slučajeva, dok je u nevakcinisanoj grupi jedinki izolacija uspela u 63% slučajeva. Osnovni zaključak je da vakcina dovodi do boljitka u smislu procenta zaštite od bolesti i smanjenja intenziteta simptoma u kliničkoj slici, ali isto tako da vakcina ne štiti 100% od infekcije BPI3 virusom ni kod jedne starosne kategorije, bilo da se koristi inaktivisana ili atenuirana vakcina.

Ghram i sar. 1998. ispitivali su klinički i imunološki odgovor goveda na veštačku infekciju virusom IBR (BHV1) i PI3 virusa goveda. Ustanovili su da u mešanoj infekciji klinička slika ima jače izražene simptome, dok u jednostrukoj veštačkoj infekciji virusom PI3 simptomi nisu ni prisutni kod svih inficiranih jedinki (asimptomatska, subklinička infekcija). Takođe, ustanovljeno je da imuni odgovor kasni kod kombinovane infekcije IBR i PI3 virusima i da je značajno niži nivo antitela na oba virusa nego kod teladi inficiranih samo IBR virusom ili samo BPI3 virusom. U veštačkoj infekciji sva telad bila su slobodna od PI3 virusa nultog dana. Virus PI3 mogao je da se izoluje iz nazalnog brisa od prvog do šestog dana posle infekcije, ali i 13., 16. i 23. dana posle infekcije, od teladi koja su inficirana obema virusima. Od teladi koja su inficirana samo PI3 virusom, virus PI3 je mogao da se izoluje do 11. dana iz nazalnog brisa i 23. dana posle infekcije. Titar antitela protiv PI3 virusa kod teladi inficirane samo virusom PI3 mogao je da se detektuje ELISA testom tek 23. dana posle infekcije. Nivo serumskog kortizola bio je povećan kod teladi inficirane obema virusima. Nivo kortizola kod teladi inficirane samo PI3 virusom bio je viši nego kod teladi inficirane IBR virusom.

U svom radu na identifikaciji više domaćih izolata virusa parainfluence 3 goveda, **Horwood i sar. 2008.** dolaze do zaključka da postoje dve različite serogrupe virusa PI3 goveda. Ispitujući kompletan genom nekih sojeva koje su prethodno izolovali, kao i sekvence PCR reakcije koje su dobili korišćenem prajmera RspV1 i MR2 iz konzerviranog dela genoma koji kodira M (matriks) protein, došli su do zaključka da tri izolata imaju nukleotidnu podudarnost višu od 92% u celom genomu, što je u saglasnosti sa ispitivanjem nukleotidnih razlika između humanih sojeva. Međutim, ispitivanjem sekvence koja kodira M protein u sedam ispitivanih sojeva ustanovili su signifikantnu razliku među njima koja ih svrstava u genotipsku grupu A i genotipsku grupu B virusa PI3 goveda. Tri soja su pokazala podudarnost sekvence sa referentnim Kansas sojem (pripadnik genotipa A) od 93%, dok ostala četiri izolata imaju podudarnost sa istim sojem u 83,9 do 84,5%. Podudarnost u nukleotidnoj sekvenci između četiri navedena soja bila je veća od 98,5 što ukazuje na činjenicu da pripadaju drugoj antigenoj grupi B koja je do sada ustanovljena samo na teritoriji Australije.

Jedan od navedena četiri ispitana izolovana soja pod oznakom Q5592 imao je najveći genom među PI3 virusima od 15498 i duži je za 18 nukleotidnih baza od do sada najvećeg genoma soja N910. Postoji mogućnost da je genotip B virusa PI3 nastao od sojeva koji su prešli sa druge vrste i postali infektivni agens za goveda. Poznato je da PI3 virus može inficirati različite vrste klase vertebrata kao što su ljudi, ovce, bizoni, koze, zamorci i kamile. Navedene vrste infekcija već su dokazane kroz mnoga istraživanja te je poznato da zamorci mogu oboleti od humanih sojeva PI3, ljudi od govedih sojeva, a goveda od sojeva PI3 virusa ovaca i koza. Ova tvrdnja predstavlja osnovu za hipotezu da je B serogrupa sojeva PI3 virusa goveda ustvari skup PI3 virusa koji su primarno bili infektivni agensi za drugu životinjsku vrstu. Filogenetska analiza urađena je pomoću programa MEGA 3.1.

Horwood i sar. 2011. ispitali su osetljivost odnosno limit detekcije virusa PI3, IBR i BVD u multipleks reakciji real time RT PCR, u poređenju sa klasičnim RTPCR reakcijom kojom se dokazuje samo jedan virus (singleplex reakcija). Ustanovili su da se sva tri virusa mogu uspešno dijagnostikovati multipleks RTPCR reakcijom i da je stepen detekcije multiplex i singleplex RTPCR reakcije potpuno isti za iste titre virusa. Za reakciju multiplex TRPCR za tri različita virusa nije bio potreban viši titar virusa u početnom materijalu u odnosu na titar virusa početnog materijala za RT PCR reakciju koji detektuje samo jedan virus.

Intisar i sar. 2010. godine izvršili su izolaciju govedeg PI3 virusa, kod kamila sa simptomima pneumonije u Sudanu. Prikupili su uzorke od 273 kamile sa izraženom pneumonijom na četiri različite lokacije (klanice) i testirali uzorke metodom Ag Elisa testa, izolacijom virusa i RTPCR reakcijom sa prajmerima za otkrivanje dela F gena koji kodira F fuzioni protein virusa BPI3. Od 273 uzorka, u šest uzoraka je potvrđeno prisustvo virusa PI3 što iznosi 2,1%. Oligonukleotidne prajmere koje su koristili dizajnirao je Lyon 1997. godine i oni su odabrani iz dela konzervisanog dela gena za F protein PI3 virusa goveda. RT PCR proizvod se sastojao od 400 bp (baznih parova). Viruse su izolovali i

umnožavali na ćelijskoj liniji MDBK metodom adsorpcije na izrasloj ćelijskoj liniji u trajanju od 90 minuta, nakon čega je višak inokulata odliven, a podloga za rast zamjenjena podlogom za održavanje. Žetva je obavljena tek 8. do 10. dana inkubacije kada je citopatogeni efekat bio izražen na 80% ćelija MDBK.

Jolly i sar. 1965. ustanovili su da infekcija virusom PI3 goveda može dovesti do težih pneumonija i bez komplikovane sekundarne infekcije. Bronhiolitis i pneumonija su dokazani u nekoliko eksperimenata. U histopatološkom nalazu ovih pneumonija preovlađuje izrazita dilatacija i kongestija intraalveolarnih krvnih sudova. Alveole i bronhiole sadrže različitu količinu proteinskog eksudata i ćelija, i to pretežno makrofaga, ali i polimorfonukleara. Karakterističan nalaz predstavlja veliki broj acidofilnih inkluzionih telašaca u alveolarnim makrofagima, bronhijalnom i alveolarnom epitelu. Mortalitet obolelih od PI3 virusa goveda je relativno nizak, ukoliko ne dolazi do sekundarnih bakterijskih infekcija.

U ispitivanju antigenskih varijacija govedih i humanih sojeva virusa Parainfluence 3, **Klippmark i sar. 1990.** godne definisali su podudarnost epitopa na četiri različita proteina i to tri humana i šest govedih sojeva virusa parainfluence 3. Sojevi su ispitivani uz pomoć 60 monoklonskih antitela. Panel monoklonskih antitela koje su koristili bio je pripremljen prema epitopima na HN, F, N i M proteinima virusa parainfluence 3. Svaki soj je karakterisan uz pomoć ELISA testa i hemaglutinacionog testa. Ustanovljene su najveće razlike između epitopa na HN proteinu humanih i govedih sojeva. Jedan epitop F proteina i N proteina se takođe razlikuje kod humanih sojeva i govedih sojeva virusa PI3. Na osnovu rezultata, goveđi izolati PI3 virusa smatraju se međusobno homolognim i različitim od humanih sojeva virusa PI3. Dva glikoproteina imaju odlučujuću ulogu u zaštiti od infekcije virusom Parainfluence i to su HN i F protein. Od 20 monoklonskih antitela za epitope N proteina humanog PI3 virusa, dvanaest reaguje sa svim humanim i goveđim sojevima virusa. Jedanaest od šesnaest monoklonskih antitela za epitope M proteina humanog PI3 virusa, reaguje sa svim humanim i goveđim sojevima virusa. Nalazi ukazuju na visoku konzerviranost proteina F i M među goveđim i

među humanim sojevima virusa. Na osnovu ovakvih rezultata može se zaključiti da imunizacija ljudi goveđim sojem virusa PI3 može dovesti do produkcije važnih antitela, ali imunizacija ljudi humanim sojem provociraće stvaranje čitavog spektra neuralizujućih antitela protiv humanog PI3 virusa i dati kompletniju imunološku zaštitu.

U svom istraživanju **Kawakami i sar. 1966.** uspeli su da izoluju virus BPI3 ne samo iz nosnih briseva, već i iz mleka inficiranih krava. Ukupno su izolovali 37 različitih sojeva virusa PI3 goveda, a ispitivanjem 50 uzoraka mleka od krava sa respiratornim simptomima, uspeli su da izoluju virus PI3 iz 14 uzoraka. Mesec dana kasnije od istih krava virus PI3 je izolovan samo iz jednog uzorka mleka od 32 pregledana uzorka. Istog dana je počela izolacija virusa PI3 od ostih grla iz nazalnih briseva i ni u jednom slučaju nije izolovan virus PI3. Kod svih grla kod kojih je uspela izolacija virusa PI3 iz mleka, ustanovljen je značajno povećan broj somatskih ćelija u mleku, što ukazuje na mogućnost inflamatornog procesa. Svi sojevi virusa PI3 iz mleka identifikovani su metodom virusneutralizacije sa hiperimunim serumom protiv virusa PI3 goveda. Izolacija virusa na ćelijskoj liniji uspela je tek u drugoj pasaži i to između šestog i devetog. dana inkubacije. Izolati su doveli do citopatogenog efekta na ćelijskoj liniji embrionalnog bubrega teleta, ali ne i na ćelijskoj liniji bubrega majmuna. Međutim ispitivanjem supernatanta ćelijske linije bubrega majmuna, ustanovljen je visok titar virusa PI3, iako nije došlo do mikroskopski vidljivog oštećenja ćelija.

Komatsu i sar. 2007. dokazali su da P gen paramiksovirusa dovodi do stvaranja proteina koji je antagonist interferonu i na taj način izazivaju imunosupresiju. Virusni proteini koji su odgovorni za antagonizam prema interferonu različiti su kod različitih paramiksovirusa. Naučnici su ispitali upravo supresivno odnosno antagonističko delovanje proteina goveđeg paramiskovirusa 3 prema interferonu beta. Dokazali su da P gen proizvodi C i V protein koji supresuje RNA koja stimuliše produkciju interferona beta. V protein direktno blokira signal za aktivaciju gena za produkciju interferona beta. Protein C paramiksovirusa 3 goveda i Sendai virusa umereno dovode do supresije

proizvodnje interferona beta inhibirajući molekul koji je izazivač i okidač aktivacije proizvodnje interferona beta.

Konishi i sar. 2014. izvršili su genomsku karakterizaciju prvog soja virusa BPI3 iz Japana, koji pripada genotipskoj grupi C. Postojeći izolat HS9 potvrdili su RTPCR reakcijom sa prajmerima za P gen koji je kreiran prema genotipu soja 910N. Dobili su pozitivan nalaz prisustva genoma virusa PI3 i dobijeni produkt su sekvencirali. Upoređivanjem sekvence PCR produkta iz P gena sa ostalim sekvencama iz baze gena, ustanovili su visok nivo homologije soja HS9 sa kineskim serotipom SD0835 koji se smatra referentnim predstavnikom genotipske grupe C virusa BPI3. Sledeće ispitivanje uradili su sa devet pari prajmera koji su kreirani prema genotipu soja SD0835. Dobijene sekvence su poredili sa ostalim sekvencama iz baze i utvrdili da ceo genom japanskog soja HS9 ima isti broj nukleotida kao i SD 0835 i da je šest nukleotida kraće od prvog serotipa 910N, koji su koristili za poređenje. Homologija genomskih sekvenci HS9 izolata sa sojem SD0835 iznosila je 98%, dok je sa sojem 12Q061 iznosila 98,5%. Nizak nivo homologije novog japanskog soja HS9 u P sekvenci gena prve RTPCR reakcije, ukazuje na potrebu menjanja protokola i prajmera koji se koriste za detekciju virusa BPI3 u Japanu, jer korišćeni prajmeri za P gensku sekvencu kreirani prema soju 910N neće detektovati sve virusne izolate sa niskim procentom nukleotidne homologije u identičnoj sekvenci.

Lazić Sava i sar. u svojoj studiji o virusnim infekcijama teladi u neonatalnom periodu, razmatraju faktore stresa i mikroorganizme koji učestvuju u nastanku respiratornog sindroma teladi. Kao najčešće faktore stresa koji izazivaju respiratorni sindrom, navode ambijentalnu temperaturu, vlagu, prašinu, gasove, zamor, gladovanje, žeđ i deficit u ishrani goveda. Ovi faktori dovode do primarne respiratorne virusne infekcije među kojima je i virus PI3 goveda. Lazić i sar. navode da je eksperimentalno dokazano da virus PI3 goveda dovodi do smanjenja ekspresije Fc i C3b receptora na alvelarnim makrofagima, što značajno smanjuje sposobnost fagocitoze, a time dovodi i do imunosupresije.

Infekcija virusom parainfluekce 3 dovodi do pojačanih kontrakcija glatke muskulature disajnih puteva što mehanički olakšava kolonizaciju pluća mnogim patogenim bakterijama. Bakterije koje se pojavljuju kao sekundarni etiološki agensi transportne groznice su najčešće *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnis*, *Arcanobact. pyogenes*, *Staph. aureus* i *Staphylococcus pneumoniae*. Kao sekundarni agensi infekcije respiratornog sindroma goveda navode se i mnoge mikoplazme kao što su: *M. bovis*, *M. dispar*, *M. hyorhinitis*, *M. bovirhinitis*, kao i neke vrste hlamidija.

Lyon i sar. 1997. utvrdili su prisustvo virusa Parainfluekce tip 3 kod ovaca obilelih od visna maedi virusa i to sa prajmerima za F gen koji su dizajnirani za otkrivanje virusa PI3 kod goveda. Ovce koje su obolele od visna maedi bolesti često mogu razviti ozbiljne simptome pneumonije sa alveolitisom, ali je utvrđeno da maedi visna virus ne izaziva imunodeficijenciju. Prvi put je virus PI3 otkriven kao primarni uzročnik ozbiljnih infekcija donjih partija respiratornog trakta kod dece 1996 godine, a zatim i kod malih preživara. Virus PI3 izaziva stvaranje sincicijuma na ćelijskoj liniji, kao i visna maedi virus. Izolacija PI3 virusa RTPCR metodom urađena je sa prajmerima koji su iz konzervisanog dela fuzionog F proteina, zajedničkog za goveda i ljude. U PCR reakciji prvo su uradili denaturaciju uzorka od 10 minuta na 95° C, zatim je reakcija ponovljena 35 puta, i sa finalnom ekstenzijom na 72 °C u trajanju od 10 minuta. Amplifikovani proizvod PCR reakcije su analizirali na gel elektroforezi na 1,5 % agarozu gelu, uz prisustvo etidijum bromida. Koristili su prajmere PS1810, PS1873, PAS2142 i PAS2273. Samo sa kombinacijom prajmera PS11873 i PAS2273 dobijena je pozitivna reakcija i potvrđeno prisustvo genoma PI3 virusa, pri čemu je dobijen produkt RTPCR reakcije od 400 bp. Temperaturni profil je bio sledeći: denaturacija 95°C, vezivanje prajmera na 51 °C i ekstenzija na 72 °C.

U svom radu **Lilly i sar. 1970.** navode da je virus BPI3 izolovan do sada i iz mleka, pobačenog ploda i testisa nezrelog bika. U jesen se povećava broj obolelih grla što je u saglasnosti sa uticajem klime kao stresnog faktora. PI3 virus ima sposobnost infekcije goveda uprkos postojanju anti - PI3 antitela u

cirkulaciji, a slična zapažanja su ustanovljena i u ispitivanju infekcija ljudi sa virusom PI3. Iako prisustvo anti PI3 antitela dovodi do ublažavanja simptoma novonastale infekcije, manje izražene hipertermije i pojave drugih respiratornih simptoma bolesti, navedena specifična antitela ne sprečavaju infekciju u potpunosti.

Maidana i sar. 2012. izolovali su virus PI3 goveda iz nosnog brisa bivola. Izolovane sojeve su sekvencirali i uporedili sa sekvencama argentinskih izolata virusa PI3 poreklom od goveda. Došli su do neočekivanog rezultata da su iz bivola definitivno izovani sojevi BPI3 virusa i to genotipa B, dok se svi terenski izolovani sojevi poreklom od goveda virusa PI3 nalaze u genotipu A i C. Oni smatraju da genotip B predstavlja izolate virusa PI3 koji su do nedavno inficirali drugu životinjsku vrstu i od skoro predstavljaju sojeve na koje su osetljiva goveda. Ovu tvrdnju potkrepili su saznanjima da je virus PI3 do sada izolovan iz goveda, ljudi, koza, bizona, zamoraca, crnog i belog nosoroga, ovaca i kamila, ali i činjenicom da virus PI3 zamoraca može inficirati ljude. Goveđi sojevi PI3 dokazani su kod ljudi i ovaca, a ovčiji PI3 sojevi izolovani su kod goveda. Sojevi virusa BPI3 (tri izolata) izolovani su iz nosnog i vaginalnog brisa (jedan soj) i dva soja samo iz vaginalnog brisa. Poredeći sekvencu M gena ustanovili su najveću sličnost izolovanog soja iz bufala sa australijskim sojem koji je predstavnik BPI3 B genotipa. Kada su uporedili i šest terenskih izolata iz Argentine koji su izolovani iz goveda, potvrdili su da su izolati iz bivola goveđi paramiksovirus tip 3, ali su takođe utvrdili da šest terenskih izolata iz goveda pripadaju genotipskoj grupi B i C. Ovo su ujedno prvi izolovani sojevi genotipske grupe B i C van Kine i Australije. RTPCR reakciju su izvršili iz umnoženog virusa sa ćelijske linije MDBK. Virus su inokulisali, umnožili, zamrzli i odmrzli ćelijsku liniju tri puta kako bi oslobodili virus, centrifugirali suspenziju kako bi odstanili ćelijski debris i supernatant koristili kao materijal za RTPCR reakciju. Koristeći prajmere za M gen, dobijena je sekvenca od 328 baznih parova koja je kasnije poređena sa ostalim sekvencama.

Marshal i sar. 1964. uspeali su da izoluju virus PI3 goveda na kokošijim embrionima i poredili su izolaciju sa izolacijom istih uzoraka na BEK ćelijskoj

liniji. Kao kontrolni virus koristili su SF4 soj. Studija je dokazala visoku osetljivost i prijemčivost četrnaestodnevnih embrioniranih jaja na govedi PI3 virus posle inkubacije od četiri dana na 37°C. Za inokulaciju je korišćen uzorak nazalnog brisa goveda koji je inokulisan u amnionsku šupljinu, a posle inkubacije amnionska tečnost je ispitivana na prisustvo virusa PI3. Ustanovili su da je titar virusa u amnionskoj tečnosti bio viši u svim slučajevima nego na BEK ćelijskoj liniji. Embrioni su imali još jednu prednost u odnosu na ćelijsku liniju BEK, a to je odsustvo mogućnosti umnožavanja IBR virusa u slučaju kombinovanih i sekundarnih infekcija jedinke. Nekoliko goveda od kojih su uzeti brisevi, imali su mešanu infekciju PI3 i IBR virusa. Virus IBR se umnožava na ćelijskoj liniji BEK, kao i virus PI3, dok se virus IBR ne može umnožiti u kokošijim embrionima. Ovim načinom može se izbeći maskiranje nalaza PI3 virusa citopatogenim efektom IBR virusa (lažno negativni nalaz PI3 usled sporijeg CPE-a, alterirane ćelije usled CPE-a IBR virusa i usled pozitivne potvrde prisustva IBR virusa). Umnožavanje virusa PI3 goveda u pilećim embrionima ne dovodi do njihovog uginuća.

Mohan i sar. 2008. ispitivali su značaj metode imunofluorescencije u dijagnostici. Obeležavanje antitela fluoresceinizotiocijanatom i njegovim vezivanjem preko trikarbamidskih veza, dovodi do obeležavanja antitela fluoresceinskom bojom pri čemu se uopšte ne smanjuje mogućnost reagovanja antitela prema specifičnom antigenu. Ipak za preciznu dijagnostiku imunofluorescencijom potrebno je veliko iskustvo u čitanju rezultata kao i spretnost pri radu u samoj pripremi preparata.

Neill i sar. 2015. izvršili su identifikaciju sojeva virusa PI3 goveda koji cirkulišu na teritoriji Sjedinjenih Američkih Država. U prethodnim ispitivanjima dokazali su da su svi sojevi pripadali genotipu A virusa BPI3. Nova istraživanja upotpunila su nalaz i ustanovila da na teritoriji SAD cirkulišu već duži niz godina i sojevi genotipa B i C koji su do sada ustanovljeni u Aziji (genotip C), Australiji (genotip B) i Argentini (genotipi A, B i C). Uradili su kompletno sekvenciranje genoma šest izolovanih sojeva, od kojih su po dva pripadala

svakom genotipu virusa PI3. Predložili su da se genotipska grupa A može podeliti u tri subgrupe na osnovu procenta homologije rasporeda nukleotida. Podela u dve subgrupe izolata virusa PI3 iz genotipa A je već ranije predložena. Predložili su takođe i podelu grupe izolata genotipa B u dve podgrupe, pošto su dva američka izolata genotipa B imala međusobnu podudarnost u rasporedu nukleotida od 99,3%, dok su sa australijskim sojevima (referentni soj genotipa B virusa PI3) imali podudarnost od samo 92,7%. Genotipska grupa C je po njihovim istraživanjima grupa sa najvišom homologijom i podela u podgrupe nije potrebna. Nukleotidna homologija američkih izolata sa korejskim izolatom genotipa C 12Q061 iznosila je 98,7%. U testu serumneutralizacije referentni serum protiv genotipa A virusa PI3 i to soja SF 4, davao je jače reakcije sa C sojevima nego sa sojevima genotipa B i ostalim sojevima genotipa A. Ipak titar virusneutralizacije soja SF 4 bio je uvek jači najmanje 4 puta ($2 \log_2$) nego virusneutralizacija ostalih sojeva. Ovakav nalaz ukazuje na prilično velike antigene razlike među sojevima virusa PI3 goveda. Predložili su da se genotipska grupa A podeli u subgrupe tako da već poznati izolati ISU92 i 910N pripadnu jednoj subgrupi, druga subgrupa bi bila sastavljena od sojeva SF4 i TX-81, dok bi treća grupa bila formirana od izolata NM09 i TVLMD60. U ranijim ispitivanjima izolacije virusa PI3 kod svinja, izolovani su sojevi TX81 i ISU92. Kasnijom analizom imunog odgovora, titra umnožavanja virusa u svinjama i govedima, kao i ispitivanjem nukleotidne homologije, ustanovljeno je da navedeni sojevi pripadaju originalno sojevima virusa PI3 goveda.

Nyaga i sar. 1981. u svom radu su naveli dokaze o oboljenju divljih papkara u Africi koje je izazvano sa virusom Parainfluenze 3 goveda. Bolest se širila kohabitacijom domaćih goveda i divljih preživara u onim predelima nacionalnih parkova Kilifi i Masai Mara gde dolazi do njihovog mešanja. Tako su dokazali prisustvo antitela protiv virusa PI3 goveda u krvnom serumu velike južnoafričke antilope, Iland velike antilope, Tompson gazele, impale i afričkog bufala. Antitela nisu pronađena kod zebri, bradavičastih svinja i orix gazela koje su takođe bile u bliskom kontaktu sa domaćim preživarima. Kod jednog seruma domaćeg govečeta i jednog seruma Iland gazele ustanovljen je titar od preko 1024 hemaglutinacione jedinice što sigurno govori o akutnom stanju bolesti.

Naučnici navode da je još Cotrall 1978. ustanovio da HI titar od 10-40 govori o preležanoj infekciji sa PI3 virusom, dok goveda sa klinički izraženim simptomima parainfluence, imaju titar od 320 HJ i više.

Nollens i sar. 2007. uspeli su da izoluju virus parainfluence iz 19 godina starog atlantskog delfina sa respiratornim simptomima ulcerativnog laringitisa i traheitisa. Dva genomska fragmenta odnosno sekvence F gena i gena koji kodira virusnu polimerazu poređena su sa ostalim identičnim sekvencama u bazi podataka gena. Ustanovljeno je da ovaj virus ima velike razlike od do sada izolovanih sojeva BPI3 i da se može smatrati kompletno novom grupom parainfluenca virusa.

Obenrader 2012. izvršio je analizu Sangerove metode sekvenciranja proizvoda PCR reakcije. Dve metode sekvenciranja razvijene su nezavisno jedna od druge 1974. godine i to metoda Maxam Guilbert i Sanger metod. Oba tima su 1980. godine podelila Nobelovu nagradu za ovo otkriće. Sanger metod koji se zove i dideoksi sekvenciranje ili metoda završavanja lanca, bazira se na dodavanju dideoksinukleotida normalnim nukleotidima koji su nađeni u DNA. Dideoksi nukleotidi su u osnovi isti kao i normalni nukleotidi samo što imaju hidrogensku grupu na 3C atomu, a ne hidroksilnu grupu OH koju imaju normalni nukleotidi. Kada se ovako modifikovan nukleotid integriše u sekvenci, to onemogućava vezivanje sledećeg nukleotida. Ova pojava se javlja zbog toga što se fosfodiesteraska uobičajena veza ne može nagraditi između dideoksinukleotida i sledećeg normalnog nukleotida te se lanac na tom mestu završava. Sekvenciranje se po Sangeru prvobitno vršilo u četiri odvojene reakcije, pri čemu je svaka reakcija sadržala smešu normalnih nukleotida i dideoksinukleotida iste vrste sa polimerazom. Količina dideoksi nukleotida bila je sto puta manja u odnosu na normalne nukleotide u svakoj reakciji za četiri različita nukleotida. Ova metoda po Sangeru ubrzo je automatizovana i pripremljena tako da se može izvesti u samo jednoj reakciji. Svi nukleotidi i svi dideoksinukleotidi nalazili su se u zajedničkoj reaktivnoj mešavini, ali su dideksinukleotidi bili obeleženi sa četiri različite boje za četiri različita nukleotida (C, A, G i T). U navedenom automatskom sekvenciranju svaki

terminalni dideoksinukleotid imao je određenu boju u zavisnosti od nukleotida i mogao je da se očita optičkim uređajima kao različita talasna dužina za svaku vrstu nukleotida. S obzirom na to da svaka boja fluorescira na određenoj talasnoj dužini, laser ih očitava i kao rezultat dobijamo elektroforegram sa pikovima različitih boja koje predstavljaju različite nukleotide kojima se završava lanac.

Ohkura i sar. 2013. izvršili su kompletno sekvenciranje genoma terenskog izolovanog soja virusa parainfluence 3 goveda pod oznakom BN-1. Virus su izolovali iz nosnog brisa i umnožili na ćelijskoj liniji MDBK. Navedeni soj su atenuirali pasažama na pilećim embrionalnim fibroblastima i tako dobili vakcinalni atenuirani soj BN-CE, koji se koristi za vakcinaciju goveda protiv virusa PI3 u Japanu. Oba genoma su posle kompletnog sekvenciranja svrstana u genotip A virusa PI3 goveda, pri čemu i terenski BN-1 i vakcinalni BN-CE soj imaju 15480 baznih parova u svom genomu, što je identično kao i genom izolata 910N, ali 24 nuleotida više od genoma Kansas/15624/84 soja. Kada su upoređene sekvence terenskog i vakcinalnog soja BN-1 i BN.CE, i to poređenjem celog genoma, ustanovili su razliku u samo šest nukleotida. Kada su uporedili raspored aminokiselina oba soja, ustanovili su razliku u dve aminokiseline i to jednu razliku u F genu i jednu razliku u L genu. Uzimajući u obzir da se radi o dva soja koji imaju različiti epizootiološki značaj (jedan soj je patogen, drugi je atenuiran i služi kao master seed za vakcinu), genomske sekvence oba soja prihvaćene su od strane Svetske banke gena „GenBANK“ kao originalni sojevi virusa PI3 goveda.

Oem i sar. 2013. izvršili su molekularnu karakterizaciju soja virusa parainfluenze tip 3 kod goveda izolovanog u Koreji. Ispitivan je terenski izolovani soj virusa PI3 i urađeno je sekvenciranje kompletnog genoma soja 12Q061. Novootkriveni soj se razlikuj od dosadašnjih izolovanih sojeva i ne spada u genotipsku grupu BPIV3 A i BPIV3 B. Vrlo je sličan kineskom soju SD0835 koji je klasifikovan u genotipsku grupu C. Ovo je prva molekularna karakterizacija soja PI3 virusa goveda u Koreji. Uzorkovano je pet briseva od goveda sa respiratornim simptomima. Izvršena je ekstrakcija RNK kao i izolacija virusa na ćelijskoj liniji MDBK. Posle centrifugiranja supstrata brisa,

fluid su filtrirali kroz filter sa porama od 450 nm i inokulisali na MDBK ćelijsku liniju. Inokubirali su inokulisanu ćelijsku liniju na 36 °C u trajanju od pet dana do pojave citopatogenog efekta. Citopatogeni efekat koji je izazvao virus PI3 dobili su tek u trećoj slepoj pasaži. Da bi uradili molekularnu karakterizaciju, uradili su RTPCR reakciju sa prajmerima za HN deo gena i dobili produkt od oko 650 bp. Sekvenciranje su uradili na ABI310 Genetic Analyzeru i u MEGA programu izvršili filogenetsku analizu. Ustanovili su da korejski soj u ovoj sekvenci ima sličnosti sa kineskim sojem SD0835 u 98,5%, dok sa Kansas sojem i Q5592 ima nukleotidnu homologiju između 70 i 92 %. Na osnovu filogenetske analize, ustanovljeno je da korejski izolovani soj definitivno pripada genotipu C čiji je najpoznatiji predstavnik upravo kineski soj SD0835.

Oshawa i sar. 1998. izvršili su molekularnu karakterizaciju virusa parainfluence 3 koji je izolovan iz zamoraca u Japanu, pod oznakom GPvPI3. Kada su poredili homologiju sekvenci soja virusa iz zamoraca GPvPI3 sa humanim i goveđim sojevima virusa PI3, došli su do zaključka da je ispitujući soj imao vrlo visok stepen homologije u rasporedu nukleotida sa humanim sojem virusa PI3 i da je infekcija zamoraca nastala prenošenjem humanog soja virusa sa čoveka u koloniju zamoraca eksperimentalnog centra u kome je virus i izolovan. Ovakvi podaci ukazuju na genetske promene koje dovode do prilagođavanja postojećih virusa drugim ciljnim vrstama te se postavlja pitanje sa kolikom sigurnošću se neki izolat može nazvati autohtono patogenom one vrste životinja iz koje je prvi put izolovan, ukoliko je homologija sa drugim postojećim sojevima ciljne vrste veoma visoka.

U ispitivanjima efikasnosti vakcine protiv virusa PI3 u **Pfizer animal Helath Technical buletin 2010.** ustanovljeno je da monovalentna vakcina protiv PI3 virusa goveda daje veoma dobre rezultate u zaštiti teladi od infekcije. Vakcina je aplikovana intranazalno i dala je nešto nižu serokonverziju nego vakcina aplikovana parenteralno. Iako u momentu oglada veštačke infekcije nisu sva vakcinisana grla imala merljiv titar antitela protiv PI3 (70,8% pozitivno), titar vakcinsanih jedinki je bio mnogo viši od titra nevakcinisanih jedinki, sedam dana kasnije. Izlučivanje virusa nakon testa veštačke infekcije kod vakcinisanih

grla bilo je 99,9% manje nego u kontrolnoj grupi. Vakcinisana grla imala su slabije izražene kliničke simptome i vrlo retko su reagovala hipertermijom za razliku od nevakcinisanih kontrolnih jedinki.

Quao i sar. 2010. izvršili su kompletno sekvenciranje genoma dva soja virusa parainfluenca 3 izolovanih iz svinja u Sjedinjenim Američkim Državama. Virus su izolovani iz moždanog tkiva svinja i nose oznake Texas 81 i ISU92. Odgovarajući geni navedena dva soja su isti u svojoj dužini u svim segmentima osim u F genu. Ispitivanje homologije sekvenci karakteristične za replikaciju i domaćin specifičnog rasporeda aminokiselina dva soja virusa izolovanih iz svinja, ustanovili su da virusi originalno potiču od goveđih PI3 virusa. Filogenetska analiza individualnih gena navodi na zaključak da su izolati novi članovi grupe virusa BPI3 i da se mogu svrstati u genotipsku grupu A virusa parainfluence goveda. Sve analize ukazuju da se radi o varijant soju virusa PI3 goveda koji je promenio vlasnika i prilagodio se domaćoj svinji kao vrsti, ali bez pojave kliničkih simptoma. Oba soja su vrlo slabo patogena za svinje u punoj kondiciji. Kada su poredili rezultate homologije aminokiselina, ustanovili su homologiju od 100% u N, P, M i F genu između PI3 goveda i Texas 81 soja. U HN proteinu homologija je iznosila 99,8% a u L proteinu 98,7%. Izolat ISU92 pokazivao je aminokiselinsku homologiju sa goveđim sojevima PI3 virusa u intervalu od 97,15 do 98,2%.

Rossi i sar. 1971. ispitivali su odnos SN titra i HI titra virusa PI3, ali i virusa BVD i IBR. Virus PI3 umnožavali su na ćelijskoj liniji MDBK. Žetvu virusa PI3 vršili su šestog dana posle inokulacije virusa na ćelijsku liniju. IBR virus daje brži CPE u poređenju sa PI3 virusom i kompletan CPE virusa IBR je vidljiv već četvrtog dana kada je i prikupljena žetva virusa. U slučaju mešane infekcije u ispitujućem materijalu, ovu činjenicu moramo imati u vidu jer je kompletan CPE izazvan virusom IBR završen pre pojave CPE koji nastaje od PI3 virusa. Preklapanje citopatogenog efekta ovog tipa može dovesti do pojave lažno negativnog nalaza na prisustvo virusa PI3 goveda u ispitujućem materijalu.

Robinson i sar. 2000. analizirali su upotrebu boja u metodi imunofluorescencije. Najznačajnije fluorescentne boje koje se koriste u imunofluorescenciji su: FITC koji ima ekscitaciju na 495 nm, a emisiju na 525 nm talasne dužine i daje zelenu boju; rodarmin koji ima ekscitaciju na 552 nm talasne dužine, a emisiju na 570 nm talasne dužine i daje crvenooranž boju; „Teksas red“ boja koji se ekscitira na 596 nm, a emituje na 620 nm talasne dužine i daje crvenu boju. Od ostalih boja za bojenje DNA najčešće se koristi etidijum bromid, koji ima ekscitaciju na 493 nm i emisiju na 620 nm i daje crvenooranž boju.

Ren i sar. 2015. objavili su rezultate mapiranja epitopa nukleokapsidnog proteina virusa PI3 goveda genotipa C. Identifikaciju su izvršili uz pomoć šest monoklonskih antitela protiv nukleokapsidnog proteina virusa PI3 tip C, koristeći izolat SD0835. Identifikovali su tri epitopa na ispitivanom proteinu od kojih su dva epitopa - 5E5 i 7G5 otkrivena i identifikovana na nukleoproteinu i govedeg i humanog virusa parainfluence 3. Interesantan je nalaz da slabije konzervisan epitop 6F8 poseduju samo goveđi virus parainfluence 3 genotipa C i A, dok ga humani sojevi PI3 i goveđi sojevi PI3 genotipa B ne poseduju.

Saunders i sar. 1964. izvršili su eksperimente veštačke infekcije različitih starosnih kategorija goveda sa virusom PI3 goveda i bakterijama roda Pasteurella, primenjujući različite načine infekcije. Došli su do zaključka da put infekcije nema presudnu ulogu u brzini pojavljivanja i intenzitetu simptoma. Postoji značajna obrnuto srazmerna korelacija između visine titra antitela protiv PI3 pre veštačke infekcije i intenziteta simptoma posle infekcije. Karakterističan nalaz je izražena leukopenija kod svih teladi koja su inficirana samo sa PI3 virusom u ogledu. Ukoliko je veštačka infekcija izvršena sa PI3 virusom goveda i bakterijama iz roda Pasteurella, leukopenija nije bila izražena, a u nekim slučajevima je kao odgovor na bakterijsku infekciju došlo i do pojave leukocitoze. Klinička slika nakon veštačke infekcije samo sa BPI3 virusom kretala se od asimptomatske do lakših oblika oboljenja respiratornog trakta, dok je kombinovana infekcija sa Pasteurella vrstama i virusom PI3 rezultirala

simptomima teške pneumonije i moribudnog stanja sa neretkim letalnim ishodom.

Sakai i sar. 1987. sekvencirali su delove genoma PCR proizvoda virusa BPI3 i to iz NP, P, C i M gena i uradili poređenje, odnosno nukleotidnu homologiju sekvenci i aminokiselina između sojeva BPI3, humanog paramiksovirusa 3, Sendai virusa, New Castle virusa i virusa boginja. Kao početni materijal poslužili su im sojevi 910N, M i SC virusa BPI3 umnoženi na ćelijskoj liniji MDBK. Sekvenciranje su uradili direktnom metodom dideoksi sekvenciranja po Sangeru. Poređenjem sekvenci između navedenih virusa, došli su do zaključka da je virus BPI3 vrlo sličan virusu HPI3, ali takođe i Sendai virusu miševa. Poređenje nukleotidnih sekvenci, ali i aminokiselina ova tri virusa, ukazuje na činjenicu da oni predstavljaju posebnu podgrupu virusa u okviru iste sistematske kategorije i da se znatno razlikuju od virusa New Castle i virusa boginja. Postoji visoka konzerviranost dela genoma koji kodira sintezu NP i M proteina između virusa BPI3, HPI3 i Sendai virusa, za razliku od P i C gena gde je nukleotidna homologija među sojevima niska. Kada su uporedili aminokiselinsku homologiju, došli su do zaključka da postoji visoka homologija između BPI3 i HPI3 i to 86% u NP proteinu, 76% u C proteinu i 62% u P proteinu. Homologija aminokiselina BPI3 i Sendai virusa iznosila je 58% u NP proteinu i 62% u M proteinu, dok je podudarnost aminokiselina u proteinima P i C 24% odnosno 35%. Aminokiselinska homologija BPI3 sa NDV i virusom boginja je na nivou do 20%. Signifikantna je visoka podudarnost nukleotidnih sekvenci i aminokiselina u genima i proteinima NP, P, C i M između virusa BPI3, HPI3 i Sendai, kao i velika razlika u navedenim parametrima između BPI3 i ostalih virusa iste sistematske kategorije (virus boginja i NDV).

Shi i sar. 2014. uspeali su da u biološkom ogledu veštačke infekcije inficiraju zamorce sojem SD 0835 genotipa C virusa PI3 goveda i da dobiju izraženu kliničku sliku. Pre navedenog eksperimenta jedino je uspevala veštačka infekcija eksperimentalnih životinja sojevima PI3 virusa goveda koji su pripadali genotipu A i to sa ograničenim uspehom. Inficirali su intranazalnim putem 16 zamoraca i kod svih jedinki dobili kliničku sliku respiratornih

oboljenja, dok su dva inficirana zamorca uginula trećeg dana posle inokulacije sa patološkim nalazom teške pneumonije. Kod ostalih zamoraca, na patohistološkom nalazu bila je vidljiva teška pneumonija sedmog dana posle inokulacije, koja je završavala skoro potpunom konsolidacijom i atelektazom lobusa. Virus izolacijom dokazano je umnožavanje virusa PI3 goveda u visokom titru i to kako u plućima, tako i u tkivima traheje. Potvrdili su da je zamorac idealan eksperimentalni model za praćenje patogeneze infekcije PI3 virusom goveda.

Suzu i sar. 1987. ispitivali su homologiju nukleotidnih sekvenci F i HN gena kao i aminokiselinski sastav F i HN proteina između BPI3, HPI3 Sendai i drugih respirirusa. Ustanovili su da BPI3 pokazuje 80% ukupne homologije sa HPI3 virusom. Podudrnost sa Sendai virusom iznosi 45%, dok je homologija između BPI3 i SV5 i NDV na nivou 20%. HN protein BPI3 i HPI3 virusa imaju potpuno isti broj aminokiselina i on iznosi 572. Homologija HN proteina BPI3 iznosi 77% sa HPI3 virusom, 47% sa Sendai virusom i po 21% podudarnosti sa SV5 i NDV. Kada su ispitivali homologiju F proteina ustanovili su da BPI3 ima jednu aminokiselinu manje od HPI3 virusa i da homologija BPI3 sa HPI3 iznosi 80%, sa Sendai virusom 44%, sa Sv5 virusom 23% i sa NDV 22%. Očigledno je da se grupa virusa u koju spadaju BPI3, HPI3 i Sendai virus izdvaja od ostalih virusa iz iste sistematske kategorije. Stepenn konzerviranosti F i HN glikoproteina koji imaju ulogu u vezivanju virusa za ćeliju, kao i penetraciji virusa u ćeliju, niža je nego za M i NP proteine, ali znatno viša nego za P i C proteine virusa. F i HN proteini svih virusa iz iste sistematske grupe, uključujući i SV5 i NDV, imaju protein specifične strukture kao kratke, ali dobrokonzervirane aminokiselinske sekvence, što ukazuje na činjenicu da te strukture i sekvence imaju veze sa aktivnošću ovih glikoproteina.

Shioda i sar. 1988. ispitivali su sličnosti i razlike varijantnih sojeva virusa PI3 goveda, upoređujući sekvence gena koji kodiraju proteine omotača virusa. Ispitivali su sekvence gena za membranski protein M, fuzioni protein F i hemaglutininsko-neuraminidazni protein HN. Sekvencirali su tri soja BPI3 virusa

i to M, SC i MR, koji su derivati divljeg soja YN. M i SC sojevi se ne razlikuju i imaju slabu hemaglutininsko neuraminidaznu aktivnost, ali M soj virusa izaziva stvaranje obimnijeg sincicijuma od SC soja. MR virus, koji je varijant derivat M soja virusa i ima visoku H i N aktivnost, ali vrlo slabu indukciju sincicijuma, razlikovao se od M soja virusa u samo jednom nukleotidu u M, F i HN sekvenci. 193. aminokiselina HN proteina je „Leu“ u MR soju i „Phe“ u M soju virusa. Ova informacija vrlo jasno pokazuje da samo jedna razlika u aminokiselini jednog proteina dovodi do redukcije hemaglutinacije i neuraminidazne aktivnosti.

Storz i sar. 2000. zaključili su da se, pored bakterija iz roda *Pasteurella*, kao sekundarni agens infekcije u respiratornom sindromu goveda često javlja i respiratorni bovini korona virus (RBCV). Bakterija je izolovana iz tkiva pluća i to u titru 10^3 do 10^7 PFU po gramu plućnog tkiva. U 25 od 26 slučajeva uginuća usled sekundarnih infekcija Shepping fever, otkriveno je prisustvo *Pasteurella* spp i respiratornog korona virusa goveda. U većini slučajeva u patoanatomskom nalazu bili su prisutni znaci subakutne eksudativne i nekrotizirajuće lobarne pneumonije, koja je karakteristična za bakterijske infekcije pluća sa *Paterella* spp, ali mnogi lobuli su imali patohistološke promene koje su se zasnivale na pojavi bronhiolitisa i alveolitisa, koji je karakterističan za pneumonije virusne etiologije. U osamnaest klinički normalnih grla kod kojih nije uspela izolacija korona virusa, dokazano je prisustvo visokog titra anti-korona antitela metodom HI testa, dok je prisustvo antitela protiv *Pasteurella haemolytica* kasnije otkriveno. Koristeći Evansov kriterijum naučnici su dokazali da je respiratorni korona virus goveda bio primaran infekt u respiratornom sindromu goveda, dok je *Pasteurella* bila sekundarni infektivni agens. Prvi put je dokazano da u virusnom respiratornom sindromu goveda, pored IBR, BVD, PI3 i BRS virusa, učestvuje i respiratorni korona virus goveda (RBCV).

Schmidt i sar. 2000. dokazali su ulogu fuzionog i hemaglutininsko neuraminidaznog glikoproteina govedeg PI3 virusa na restrikciju replikacije virusa PI3 kod primata. Zamenili su F i HN glikoprotein na humanom PI3 virusu

sa goveđim glikoproteinima. Goveđem soju PI3 virusa zamenili su originalne glikoproteine humanim glikoproteinima F i HN. Obema virusima, kao i originalnim sojevima bez izmenjenih glikoproteina, izvršili su veštačku infekciju rezus majmuna i ustanovili da svako prisustvo F i HN glikoproteina goveđeg PI3 virusa dovodi do znatno slabijeg umnožavanja virusa u primata. Ovim putem su dokazali ulogu F i HN glikoproteina na replikaciju virusa, a samim tim i na patogenost BPI3 sojeva za primata. Ova osobina iskorišćena je za proizvodnju vakcine od BPI3 sojeva virusa i njihovu upotrebu kod ljudi i drugih primata.

Shibuta i sar. 1979. izvršili su karakterizaciju virusa PI3 goveda. Dokazali su da BPI3 virus sadrži minimum pet struktirnih proteina, od kojih su dva glikoproteini. Dokazali su veliku sličnost BPI3 virusa sa Sendai virusom, a elektronskom mikroskopijom i veliku sličnost sa humanim PI3 virusom. Virus PI3 goveda je nepravilna sfera sa velikim brojem kratkih antena na svojoj površini. Elektronskom mikroskopijom dokazali su da je virus BPI3 čestica različite veličine, čiji se dijametar kreće od 80 do 300 nm, ali najčeće od 130 do 140 nm. Viruse su prethodno umnožavali na ćelijskoj liniji MDBK, a kao referentan soj koristili su soj 910 N.

Thorsen i sar. 1969. ispitivali su reakcije novorođene teladi na modifikovani atenuirani virus PI3 koji su koristili kao vakcinu. Došli su do zaključka da se vakcinalni soj nije prenosio na kontrolna nevakcinisana grla i da je vakcinalni soj doveo do pojave titra antitela protiv Pi3 goveda dve nedelje posle vakcinacije. Kao vakcinalni virus koristili su atenuiran SF4 soj virusa PI3 goveda, koji je umnožen na primarnoj kulturi tkiva bubrega goveda. Telad za eksperiment su odvajana 12 sati nakon rođenja i nisu hranjena kolostrumom. Test veštačke infekcije uradili su sojem virusa SF4 u titru $10^{7.5}$ log₁₀ TCID₅₀

/ml izolovanog u Ontariju (Kanada). Ustanovili su da je febrilno stanje zapaženo kod obe grupe teladi drugog dana posle vakcinacije, a kod nevakcinisanih grla febrilno stanje trajalo je pet do devet dana posle vakcinacije. Utvrdili su da jedna doza vakcinje protiv parainfluence goveda dovodi do solidne zaštite protiv

bolesti. Nijedo kontrolno grlo u eksperimentu nije imalo antitela protiv virusa PI3, što je znak da se vakcinalni soj nije prenosio na nevakcinisana grla. Virus je bio izolovan nakon testa veštačke infekcije kod obe grupe teladi, ali je sekrecija patogenog soja virusa trajala kraće u poređenju sa kontrolnim grlima.

Tehnologija rekombinovane DNK supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/8270 objašnjava suštinu PCR reakcije i suštinu sekvenciranja po Sangeru sa dideoksi nukleotidima. Metoda je otkrivena 1983. godine. Ukoliko ne postoji interes da se dođe do proteina, već samo do sekvence genoma, onda se umesto kloniranja koristi polimeraza lančana reakcija. Suština je da se u tri temperaturna koraka u n ciklusa dobije 2^n fragmenata sekvenci, što je dovoljna količina da se u 30 do 50 ponavljanja ciklusa dobije broj replika sekvenci koji se može makroskopski očitati na gel-elektroforezi i koristiti za dalje obrađivanje (sekvenciranje). U prvom koraku se na temperaturi od 90°C denaturišu dvolančana DNK. Spuštanjem temperature na 65°C prajmeri, odnosno oligonukleotidi, vezuju se za jedan i drugi lanac DNA tako da oiviče sekvencu. Podizanjem temperature na 72°C aktivira se DNK polimeraza, koja je odgovorna za sintezu lanca. Korišćenjem Taq polimeraze iz bakterije *Thermophilus aquaticus* izbegnuto je denaturisanje enzima zbog njegove rezistencije prema visokim temperaturama. Mogućnost izbegavanja denaturacije enzima i njegovog ponovnog dodavanja za svaki sledeći ciklus, rešila je problem koji je ometao automatizaciju i ponavljanje ciklusa reakcije bez dodavanja reagenasa.

Tsai i sar. 1975. izvršili su veštačku infekciju teladi koja su se normalno hranila kolostrumom i teladi koja nisu primila kolostrum. Pratili su pojavu ultrastrukturnih promena veštački inficiranih jedinki na plućima bronhoalveolarnih partija, i to u intervalu od petog do dvanaestog postekspozicionog dana. Elektronskom mikroskopijom ustanovili su veliku agregaciju virusnih nukleokapsida u citoplazmi bronhoalveolarnog epitela, alteraciju ćelija i bazalnih telašaca u inficiranim ćelijama, propadanje ćelijske membrane i otpuštanje viriona u lumen. Ustanovili su da BPI3 virus najviše oštećuje alveolarne ćelije tipa II. Virus je u većem procentu izolovan iz plućnog tkiva nego iz trahealnog tkiva ili sadržaja traheje. Epitelijalne ćelije

traheobronhijalnog stabla predstavljaju primarne meta ćelije za virus PI3 goveda.

Van Der Maaten i sar. 1969. istraživali su mogućnost umnožavanja virusa PI3 u različitim ćelijskim linijama i primarnim kulturama tkiva metodom direktne imunofluorescencije, kao i rasprostranjenost virusa u ćelijama i organima kod veštački inficiranog hrčka virusom PI3 goveda. Direktnom imunofluorescencijom dijagnostikovali su PI3 sa ćelijskih linija na kojima je bio inokulisan virus PI3. Preparate su sušili, fiksirali apsolutnim acetonom, konjugat reagens inkubirali sa ćelijama 30 minuta i ispirali fosfatnim puferom pH 7,4. Došli su do zaključka da se virus PI 3 dobro i brzo umnožava u ćelijskoj liniji MDBK, kao i u primarnoj kulturi tkiva bubrega goveda, dok se ne umnožava u fibroblastičnoj ćelijskoj liniji EBT. Prvi znaci imunofluorescencije mogu se primetiti već 90 minuta posle inokulacije virusa, dok se vrh infekcije ćelija MDBK linije dešava oko 30 sati posle inokulacije, kada je sloj ćelijske linije još uvek očuvan. Nakupine antigena u citoplazmi dovoljno su jasno vidljive već 18 sati posle infekcije. Nakon 30 sati od inokulacije, broj nakupina antigena se smanjuje, ali se veličina citoplazmatskih granula povećava upravno srazmerno pojavi citopatogenog efekta. Fluorescencija je vidljiva samo u citoplazmi inficiranih ćelija, a kasnije i u jedrima. Kod veštački inficiranog hrčka pojava imunofluorescencije je utvrđena u epitelu nazalne šupljine, traheje i bronhija. Imunofluorescencija nije ustanovljena u epitelnim ćelijama bronhiola, alveola ili korespondirajućih limfnih čvorova donjih partija respiratornog trakta. Van der Maarten je ispitivao raširenost virusa PI3 u organima digestivnog i respiratornog trakta kod prirodno inficirane i eksperimentalno inficirane teladi. Za dokazivanje prisustva virusa PI3 koristio je metodu direktne imunofluorescencije. Kod prirodno obolele teladi i kod teladi veštački inficirane intranazalnim putem, virus je otkriven u materijalu nosnog brisa i ćelijama epitela gornjih partija disajnih puteva. Međutim, kod teladi veštački inficirane intratrahealno većom dozom virusa, virus je metodom TFA otkriven i u epitelnim ćelijama svih respiratornih organa i u slezini. Kao infektivni materijal koristio je referentni soj SF4 virusa PI3, u dozi od $7 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Kod intratrahealno inficirane teladi virus je otkriven u bronhijalnom i bronhiolarnom epitelu, kao i u ćelijama

alveolarnog epitela. Iako je moguće umnožavanje virusa u slezini, smatra se da je pozitivan nalaz uzrokovan gutanjem ćelija epitela disajnih puteva prilikom kašlja, pošto ni u jednom organu digestivnog trakta nisu pronađene pozitivne ćelije na prisustvo PI3 virusa metodom imunofluorescencije. Takođe je zaključeno da je zahvaćenost epitelnih ćelija donjih partija respiratornog trakta virusom PI3, kod veštački inficirane teladi znatno veća nego u slučaju veštačke infekcije laboratorijskog modela (hrčka) istim virusom. Iako su granule antigena bile vidljive u testu direktne imunofluorescencije u svim epitelnim ćelijama disajnih puteva, indikativna je činjenica da su velike nakupine antigena u citoplazmi bile vidljive najčešće u ćelijama alveola.

U radu koji se odnosi na ispitivanje genoma i proteina parainfluenca virusa, **Vainionpaa i sar. 1994.** navode da je parainfluenca virus tipični predstavnik familije *Paramyxoviridae* i roda *Paramyxovirinae*. Genom virusa sastoji se od oko 15000 nukleptida i uvek se nalazi u obliku jednog negativnog lanca RNK, (kod Parainfluenca virusa oko 15462 nukleotida). F gen parainfluenca virusa sastoji se od 1845 do 1851 nukleotida i svi sojevi pokazuju visok stepen konzerviranosti - preko 94% (u aminokiselinskom sastavu i do 97%). Poređenja F gena nekih virusa ukazuju na evolutivnu vezu između animalnih i humanih sojeva parainfluenca virusa. Za razliku od F gena, HN gen ima velike varijacije i najveća podudarnost od 62% nađena je između Sendai virusa i PI3 virusa goveda. Genom PI3 kodira sintezu šest strukturnih proteina i dva ili više nestrukturnih proteina. HN protein je glikopoliptid, koji ima odlučujuću ulogu u stvaranju neutralizujućih antitela, predstavlja jak imunogen, a upotrebom rekombinantnih vakcina ustanovljeno je da je neophodan i u procesu fuzije virusa. Posедуje aktivnost neuraminidaze i hemaglutinacije. F protein odgovoran je prvenstveno za fuziju virusne čestice i penetraciju virusa u ćeliju. Sastoji se od dva polipeptida, distalnog i većeg prokimalnog, koji su spojeni disulfidnim vezama. Takođe, izaziva stvaranje neutralizujućih antitela i poseduje osam antigenih mesta na sebi. NP protein je čvrsto vezan za RNA i igra esencijalnu ulogu u stabilnosti nukleokapsida. Uloga NP proteina u transkripciji i replikaciji nije do kraja razjašnjena. Kao i druge unutrašnje komponente viriona (proteini M, P i L), protein NP ne izaziva značajan

humoralni imuni odgovor, ali se smatra da ima uticaja u stvaranju ćelijskog imuniteta - T-cell imuniteta. Proteini P i L imaju esencijalnu ulogu kao komponente RNA zavisne RNA polimeraza aktivnosti. Hidrofobni protein M čvrsto je vezan za omotač virusa i ima najznačajniju ulogu u medijaciji jezgra nukleokapsida i površinskih glukoproteina, koji sačinjavaju antene na omotaču virusne čestice. M protein ima značajnu ulogu i u održavanju perzistentne infekcije.

Virology division, Backweston Campus, Ceilbridge, Kildare, Department for agriculture, fisheries and food, Republic of Ireland, (sampling directive) 2011. pripremili su uputstvo za uzorkovanje materijala nazalnim brisevima u slučaju sumnje na prisustvo virusa koji izazivaju respiratorne infekcije kod goveda. Najveća uspešnost u izolaciji respiratornih virusa je ukoliko se materijal uzorkuje nazalnim brisom između trećeg i petog dana od početka infekcije i što pre posle pojave prvih simptoma na osnovu kojih je postavljena sumnja. Svako uzorkovanje nazalnog brisa sedmog dana i kasnije, kada je već došlo do pojave puruletnog nosnog iscetka, smanjuje verovatnoću izolacije virusa iz materijala. Brisevi za izolaciju virusa treba da budu od pamuka i da se nikako ne transportuju suvi već isključivo što pre potopljeni u tečnost (čista voda, fiziološki rastvor, MEM i sl.). Uzorkovane briseve treba što pre transportovati do laboratorije jer količina virusa počinje da opada u brisu onog momenta kada je on uzet. Poželjno je ne zamrzavati, već briseve transportovati na temperaturi frižidera do laboratorije. Smatra se da uzimanje najmanje šest ili više briseva od jedne pojave zaraze, umnogome povećava verovatnoću izolacije virusa i postavljanje pozitivne dijagnoze.

Večerov i sar. 2003. izvršili su molekularnu karakterizaciju ruskih izolovanih sojeva virusa PI3 koristeći prajmere za sekvencu dela HN gena. Komparativna analiza njihovih rezultata ukazuje na činjenicu da neki sojevi imaju veliku sličnost sa severnoameričkim sojevima čiji je najpoznatiji predstavnik Kansas soj SF-4/32. Druga grupa sojeva virusa PI3 iz Rusije, imala je visok nivo nukleotidne homologije u sekvenci sa japanskim izolatima.

Najveća razlika između ispitivanih sojeva je bila 8 % u rasporedu nukleotida u sekvenci i 4% u rasporedu u sastavu aminokiselina iste sekvence.

Wen i sar. 2012. izvršili su molekularnu karakterizaciju virusa parainfluence 3 goveda pod oznakom NM09, koji je izolovan u Kini. Umnožili su soj na ćelijskoj liniji MDBK i izvršili kompletno sekvenciranje genoma navedenog soja, dobivši dužinu genoma od 15456 nukleotida. Slično ostalim PI3 izolatima, NM09 soj se sastojao od šest gena koji kodiraju devet proteina virusa. Nukleotidnom filogenetskom analizom sekvenci mariks i hemaglutinin neuraminidaza gena, dokazali su da ispitivani soj pripada genotipskoj grupi A virusa BPI3, uprkos činjenici da su dosadašnji kineski izolovani sojevi pripadali genotipskoj grupi C. Potvrđuju egzistenciju sojeva oba genotipa, C i A, na teritoriji Kine već duži vremenski period.

Zhu i sar. 2011. prvi su izvršili izolaciju i karakterizaciju četiri izolovana soja virusa parainfluence 3 goveda u Kini. Filogenetska analiza dela NH gena četiri soja iz Kine i kompletnog genoma soja SD0835, ukazuju na činjenicu da četiri kineska soja ne pripadaju ni genotipu A BPI3 virusa niti genotipu B BPI3, i možda predstavljaju novu genotipsku grupu koju treba klasifikovati kao BPI3 genotip C. Od 63 ispitana nazalna brisa, izolovali su virus BPI3 u četiri slučaja (pozitivan nalaz RTPCR reakcijom sa prajmerima za detekciju sekvence HN gena). Sojeve su umnožili na ćelijskoj liniji MDBK uzgajane sa Gibco MEM i dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma. Ćelije su umnožili na dvadesetčetvorobunarskoj mikroploči, uradili absorbciju ispitujućeg materijala u trajanju od 60 minuta na 37°C, odlili ostatak inokuluma i zamenili podlogu za rast podlogom za održavanje ćelija (MEM sa 4% fetalnog telećeg seruma). RT PCR reakciju uradili su kovencionalnim PCR metodom sa elektroforezom i gelom, koristeći prajmere NH seq1 i HN fwd. Dobili su proizvode PCR reakcije koji su imali 647 baznih parova. Da bi potvrdili podatke HN sekvence iz četiri izolata, uradili su kompletno sekvenciranje soja SD835 koristeći deset pari prajmera. Filogenetsko poređenje četiri soja i SD0835 soja, uradili su poređenjem sekvenci za HN i M gen sa sekvencama humanih i goveđih registrovanih sojeva u bazi, koristeći program MEGA verziju 4. HN

sekvence imale su nukleotidnu podudarnost sa australijskim sojem Q5592 u 82%. Kada su koristili i sekvence za M gen (sa prajmerima Mfwd i Mseq1, dobivši proizvod PCR od 1048 baznih parova), podudarnost sa navedenim sojem je bila 83,3%, dok je podudarnost nukleotida između četiri izolata iznosila do 99,4%. Kompletni genom izolata SD0835 sadržao je 24 nukleotidne baze manje nego najduži genom serotipa Q5592. Australijski soj je ranije već svrstan u poseban genotip u odnosu na prethodno otkrivene sojeve jer je imao nisku podudarnost nukleotida u odnosu na sve do tada otkrivene sojeve virusa PI3 goveda. Četri kineska izolata na osnovu HN sekvence razlikuju se i od genotipske grupe „A“ i od australijske genotipske grupe „B“ i smatraju se posebnom novom genotipskom grupom „C“. Da bi potvrdili navedenu hipotezu, izvršili su poređenje sekvence za M matrix gen. Međutim, ova sekvenca dala je podudarnost od 99% sa australijskim izolatima. Zhu i sar. navode u svom radu i činjenicu da se u bazi gena nalazi veoma mali broj sekvenci za virus PI3 goveda, te da je vrlo teško uraditi preciznu definiciju podudarnosti sa sojevima iz različitih delova sveta, jer je njih u bazi gena vrlo malo za virus parainfluenze 3 goveda. Zhu i sar. tvrde da je PI3 definitivno prepoznat kao jedan od najvažnijih primarnih respiratornih patogena kako mlađih, tako i starijih uzrasnih kategorija u intenzivnom stočarstvu.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je identifikacija i molekularna karakterizacija izolovanih sojeva virusa parainfluence 3 goveda na teritoriji Republike Srbije.

Da bi se ostvario postavljeni cilj, definisani su sledeći zadaci:

1. Da se metodom izolacije virusa na kulturi tkiva i virusneutralizacijom ispituju uzorci nosnih briseva različitih rasnih i starosnih kategorija goveda sa izraženim kliničkim simptomima oboljenja gornjih partija respiratornog sistema na prisustvo virusa parainfluenca 3;
2. Da se izvrši identifikacija izolovanih sojeva virusa parainfluence 3 goveda, primenom metode direktne imunofluorescencije;
3. Da se primenom metode lančane reakcije polimeraze sa reverznom transkripcijom (RT PCR) uz korišćenje prajmera za F gen virusa PI3 goveda, ispituju svi uzorci nosnih briseva iz kojih nije izolovan virus PI3 na kulturi tkiva
4. Da se primenom metode lančane reakcije polimeraze sa reverznom transkripcijom (RT-PCR), uz korišćenje odgovarajućih oligonukleotidnih prajmera koji detektuju sekvencu molekula virusne RNK koja kodira sintezu F antigena virusa PI3, ispituju sojevi pomenutog virusa i proizvodi RT-PCR reakcije pripreme za sekvenciranje;
5. Da se primenom metode lančane reakcije polimeraze sa reverznom transkripcijom (RT-PCR), uz korišćenje odgovarajućih oligonukleotidnih prajmera koji detektuju sekvencu molekula virusne RNK, koja kodira sintezu HN antigena virusa PI3, ispituju sojevi pomenutog virusa i proizvodi RT-PCR reakcije pripreme za sekvenciranje;

6. Da se izvrši sekvenciranje RT-PCR proizvoda F i HN gena domaćih sojeva virusa PI3 metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru;
7. Da se izvrši molekularna karakterizacija na osnovu poređenja homologije nukleotidnih sekvenci F i HN gena domaćih sojeva izolovanih virusa, sa odgovarajućim sekvencama drugih izolovanih sojeva virusa parainfluence 3 goveda, koji se nalaze u međunarodnoj bazi podataka iz banke gena;
8. Da se na osnovu rezultata poređenja sekvenci odredi položaj domaćih izolovanih sojeva virusa PI3 na filogenetskom stablu i definiše njihova genotipska pripadnost.

4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

MATERIJAL ZA ISPITIVANJE

Uzorci - Početni materijal za ispitivanje (nosni brisevi goveda)

Početni materijal za ispitivanje predstavljaju nosni brisevi 119 goveda poreklom sa farmi i iz privatnog sektora, prikupljenih sa teritorije Republike Srbije. Goveda od kojih su uzeti nosni brisevi pripadaju različitim proizvodnim i starosnim kategorijama i svi su imali izražene kliničke simptome respiratornih infekcija. Nosni brisevi prikupljeni su u cilju ispitivanja prisustva i izolacije virusa parainfluence 3 goveda. Prikupljeni uzorci nosnih briseva potopljeni su u 2 ml hranljive podloge Eagle MEM ili u fosfatni pufer pH 7,2 i čuvani na temperaturi od -20°C do početka ispitivanja. Osam nosnih briseva uzorkovano je bez tečnosti i ovim brisevima dodato je 2 ml Eagle MEM-a, nakon dopremanja u laboratoriju.

Materijal koji je korišćen u metodi izolacije i virusneutralizacije:

- Referentni soj SF4 goveđeg virusa parainfluence 3, titra od $10^{5,0}$ TCID₅₀%, umnožavan u ćelijskoj liniji MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), poreklom iz American Bioresearch PO Box 6099, Sevierville, Tennessee, 37864 USA (Dr John Black);
- Kontinuirana ćelijska linija MDBK („Madin Darby bovine kidney“ – ćelijska linija bubrega teleta) nabavljena je iz banke ćelijskih linija Zooprofilaktičkog eksperimentalnog Instituta iz Breše (Italija);
- Bakteriološki filteri za jednokratnu upotrebu sa veličinom pora od 400 nm proizvođača Whatman;
- Podloga za rast i održavanje ćelijske linije Eagle MEM (minimalni esencijalni medijum) proizvođača PAA;
- Mešavina antibiotika i antimikotika koja u sebi sadrži penicilin, streptomycin i amfotericin B, proizvođača PAA;
- Fetalni teleći serum proizvođača “Biochrom”;

- Mikroploče za rast ćelijskih linija, izolaciju i virusneutralizaciju od 24 bunara i sa 96 bunara, proizvođača “Sardshtedt” iz Nemačke, EU.
- Hiperimuni serum protiv virusa PI3 goveda, pripremljen imunizacijom kunića referentnim sojem SF4 virusa PI3 goveda.

Za izvođenje metode izolacije i virusneutralizacije virusa korišćena je sledeća oprema: invertni mikroskop (proizvođač: Cajs “Zeiss” - Nemačka), frižider, zamrzivač, termostat, laminarna komora, centrifuga, vortex i mikropipete.

Materijal koji je korišćen u metodi direktne imunofluorescencije:

- Ćelijska linija MDBK (Madin Darby bovine kidney) proizvođača - banke ćelijskih linija, iz Breše (Italija), „Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia - Italia“;
- Antibiotik-antimikotik, mešavina za ćelijske linije, proizvođača PAA (EU);
- Podloga za rast “Eagle MEM” proizvođača PAA (EU);
- Fetalni teleći serum, proizvođača “Biochrom” ;
- FITC konjugat za PI3 - kunićeva monoklonska antitela protiv virusa PI3, proizvedena na kuniću i obeležena fluoresceinizotiocijanatom (proizvođač: “ Bio X, Belgium” - Bio iks Belgija);
- Pufer pH 7,2, aceton, destilovana voda.

U metodi direktne imunofluorescencije korišćena je sledeća oprema: termostat sa 5% CO₂ (proizvođač: “Binder” Binder), laminarna komora klase II A (proizvođač: Aquaria, EU), zamrzivač na -20° C (proizvođač: LTH); frižider sa temperaturom 2-8° C (proizvođač: “Whierpool” Whierpool USA), fluorescentni mikroskop, proizvođača „ZEISS“ model: „AXIO A2 Observer Invert microscope“, mikropipete i mikroskopske pločice.

Materijal koji je korišćen za metodu RT PCR - lančanu reakciju polimeraze

Materijal koji je korišćen za ekstrakciju nukleinske kiseline:

- Ekstrakcija virusne RNK iz pripremljenih uzoraka izolata virusa PI3 sa ćelijske linije, vršena je primenom kita: Pure Link RNA Mini Kit za 50 reakcija, proizvođača „Ambion by Life technology“, za 50 RNA ekstrakcija. Navedeni dijagnostički kit se sastoji od sledećih reagenasa i potrošnog materijala: 50 Mini Spin cartridge Columns (kolona), QIAGEN Proteinase K, Pufer za ispiranje 1, Pufer za ispiranje 2, Pufer za razaranje (lysis buffer), Tuba (2ml) (Collection Tubes), Tuba od 1,5 ml. Ostale potrebne supstance za ekstrakciju RNA su 2 mercaptoethanol i 96-100% ethanol;
- Oprema koja je korišćena za ekstrakciju virusne RNA su: laminarna komora, centrifuga sa rotorom za mikrotube od 1,5 ml brzine do 16000 o/min, zamrzivač, frižider, termostat, vortekas, termoblok za inkubisanje uzoraka sa ležištem za minitube i mikropipete.

Materijal koji je korišćen za izvođenje PCR reakcija:

- Reagensi za smešu neophodni za izvođenje RT PCR reakcije: QIAGEN One Step RT-PCR Mix Kit – (proizvođača QIAGEN Inc., Valencia, CA, SAD) koji se sastoji od: 5 x Qiagen One Step RT-PCR Buffer, 5xQsolution, Qiagen OneStep RT-PCR enzyme mix, dNTP Mix, Rnase - free water;
- Par oligonukleotidnih prajmera sa sekvencom nukleotida, koji amplifikuju deo gena molekula virusne RNK koji kodiraju sintezu F proteina goveđeg virusa parainfluenca 3, proizvođača Applied Biosystems, UK, (Lingley House, 120 Birchwood Boulevard Warrington, Cheshire WA3 7QH);

Tabela 1. Prajmeri za RTPCR reakciju za sekvencu F gena (Lyon i sar. 1996.)

Prajmeri za sekvencu F gena virusa parainfluence 3 goveda	
SENSE F	5'CATTGAATTCATACTCAGCAC3'
ANTISENSE R	5'AGATTGTCGCATTTAGCCTC3'

- Par oligonukleotidnih prajmera sa sekvencom nukeotida koji amplifikuju deo gena molekula virusne RNK, koji kodiraju sintezu hemaglutinin neuraminidaza (HN) proteina govedeg virusa parainfluenca 3, proizvođača Applied Biosystems, UK, (Lingley House, 120 Birchwood Boulevard Warrington, Cheshire WA3 7QH).

Tabela 2. Prajmeri za RTPCR reakciju za sekvencu HN gena (Zhu i sar. 2011)

Prajmeri za sekvencu NH gena virusa parainfluence 3 goveda	
HN fwd	5'GAATGACTCATGATAGAGGTA3'
HN seq1	5'AGGACAACCAGTTGTATTACAT3'

Reakcija RT PCR izvođena je u termoprocesoru proizvođača Eppendorff.

Materijal koji je korišćen za elektroforezu PCR proizvoda:

Materijal koji je korišćen za izvođenje elektroforeze proizvoda PCR reakcije u svom sastavu sadržavao je:

- Pufer za elektroforezu koji je u svom sastavu sadržavao: tris basu, bornu kiselinu, etidijum bromid i destilovanu vodu;
- Boju za PCR proizvod (5 x loading dye), proizvođača Fermentas, EU;

- Obojen Gen ruler za elektroforezu od 100 do 1000 baznih parova, proizvođača Fermetnas;
- Gel za elektroforezu koji se sastoji od 1,5 g agaroze „top vision“, proizvođača Fermentas (molecular biology grade) i 75 ml pufera za elektroforezu sa dodatkom etidijum bromida koji ima ekstinkciju na 493 nm i emisiju na 620 nm talasne dužine i daje fluorescentno narandžastu boju (**Robinson i sar. 2000**).

Za elektroforezu PCR proizvoda korišćena je strujna jedinica za elektroforezu i kada sa držačem gela za elektroforezu. Za vizualizaciju proizvoda elektroforeze korišćen je transiluminator.

Materijal koji je korišćen za purifikaciju proizvoda RT-PCR reakcije:

- Mini Elute PCR purification kit za 250 reakcija (for purification of PCR products (60bp-4Kbp), proizvođača Qiagen (USA), koji u sebi sadrži sledeće reagens: Pufer PB (binding buffer), Pufer PE (wash buffer), Pufer za ispiranje (Elution buffer), pH indikator, boju za produkt (loading dye), kolone sa filterom (mini elute spin columns), alkohol- etanol 96-100%;
- Za prečišćavanje PCR proizvoda korišćena je sledeća oprema: centrifuga za mikrotube do 13000 o/min, laminarna komora, mikropipete i nastavci za mikropipete od 1-10 µl, mikropipete i nastavci za mikropipete od 2-200 µl, mikropipete i nastavci za mikropipete od 50-1000 µl, tube za kolekciju filtrata od 1,5 ml, ampule od 1,5 ml, vorteks.

Materijal koji je korišćen za sekvenciranje dobijenih proizvoda RT PCR reakcije:

- Formamid, izopropanol, prajmeri iz konzerviranog dela F i HN gena koji su prethodno navedeni u materijalu koji je potreban za izvođenje RT PCR reakcije;
- Oprema koja je korišćena za sekvenciranje PCR proizvoda obuhvata sledeće uređaje: centrifuga sa rotorom za mikrotube do 15 000 rpm, frižider, zamrzivač,

termo procesor Eppendorff, sekvencer „ABI PRISM Genetic Analyzer 310“, mikropipete i nastavci za jednokratnu upotrebu.

Materijal koji je korišćen za određivanje nukleotidne homologije i

formiranje filogenetskog stabla:

- Sekvence F gena sledećih sojeva virusa parainfluence3: BN-CE, Japan 1, Japan2, BN-1, TVMDL24, 92-7783_ISU-92, porcine paramyxo virus strain Frost, Kansas/15626/84, SF4, Shipping Fever, Swine parainfluenza virus 3 81-19252_Texas-81, Porcine paramyxovirus strain Texas, NM09, HPIV3/A US/6/2007, HPIV3 homo sapiens/PER/FLI3288/2010, Q5592, SD0835, HS9, 12Q061, SRB001, SRB002, SRB003, SRB004, SRB005, SRB006, SRB062 i SRB100.
- Sekvence HN gena sledećih sojeva virusa parainfluence3: BN-CE, Japan 1, BN-1, TVMDL24, 92-7783_ISU-92, Kansas/15626/84, DIO, cds, SF4, Shipping Fever, 81-19252_Texas-81, NM09, HPIV3/A, US/6/2007, Q5592, SD0835, SD0805, SD0809, SD0811, HS9, 12Q06BJ/023/08, SRB001, SRB002, SRB003, SRB004, SRB005, SRB006, SRB062 i SRB100.

M E T O D E

Metoda izolacije i virusneutralizacije

Metoda izolacije i virusneutralizacije izvršena je po standardnoj operativnoj proceduri koju je propisao OIE Terrestrial manual, International standard settings, 2015. i sadržala je sledeće korake:

- Prikupljeni uzorci nosnih briseva goveda sa respiratornim simptomima čuvani su na temperaturi od -20°C do početka rada;
- Svi nosni brisevi odmrzavani su i homogenizovani na vorteksu u trajanju od nekoliko sekundi;
- Sadržaj iz uzoraka nosnih briseva preliven je u mikrotube zapremine od 1,5 ml;
- Uzorci su zatim centrifugovani u trajanju do 5 minuta na 2500 obrtaja /min;
- Dobijeni supernatanti su posle centrifugovanja uzoraka filtrirani kroz bakteriološke filtere sa porama promera od 400 nm;
- U udubljenja mikroploče sa 24 bunara za kulturu tkiva sa ravnim dnom, razliven je po 1 ml suspenzije ćelijske linije MDBK;
- Podloga Eagle MEM-a sadržavala je 10 % fetalnog telećeg seruma, sa antibioticima i antimikotikom za ćelijske linije;
- Posle 24 sata inkubacije, podloga je odlicena sa ćelija i izvršena je inokulacija uzoraka filtrata nosnih briseva u količini od po 100 μl ;
- Posle perioda potrebnog za adsorpciju virusa na ćelije kulture tkiva u trajanju od 1 h, a zatim je dodata nova podloga za održavanje, koja se sastojala od MEM-a sa 2% fetalnog telećeg seruma u zapremini od po 1 ml;
- Referentni soj SF4 virusa PI3 goveda inokulisan je u zasebna udubljenja mikroploče za kulturu tkiva pod rednim brojem 21 i 22, dok su udubljenja sa

ćelijama pod rednim brojem 23 i 24, u koje nije inokulisan ispitujući materijal, služila kao kontrola tkiva u ogledu;

- Mikroploče su zatvorene tako što su oblepljene parafilmom i inkubisane na temperaturi od 37 °C u prisustvu 5% CO₂;
- Sve mikroploče sa inokulisanim ćelijskim linijama svakodnevno su posmatrane na prisustvo citopatogenog efekta;
- Ukoliko je došlo do pojave citopatogenih promena u inokulisanim ćelijskim linijama pre perioda od 24 sata, takav rezultat je smatran nespecifičnim usled citotoksičnog efekta koji nije bio izazvan prisustvom virusa;
- Mikroploče su inkubisane dok citopatogeni efekat nije zahvatio 75% ćelija;
- Posle pojave izraženog citopatogenog efekta u inokulisanim ćelijskim linijama, inkubacija je prekidana, a materijal sa umnoženim virusom je zamrzavan;
- Ćelije sa inokulisanim uzorcima koji nisu doveli do pojave citopatogenog efekta, u prvoj pasaži su inkubisani do isteka perioda od 7 dana;
- Posle 7 dana, sve ćelijske linije u kojima nije došlo do pojave citopatogenog efekta zamrzavane su i odmrzavane 3 puta, nakon čega su nove ćelijske linije ponovo inokulirane materijalom prve pasaže na isti način, što je predstavljalo drugu pasažu ispitivanog materijala u procesu izolacije virusa;
- Ukupno vreme ispitivanja uzoraka suspektnog materijala na prisustvo virusa PI3 iznosilo je 21 dan, odnosno 3 pasaže u trajanju od 7 dana inkubacije inokulisanih ćelijskih linija, pri čemu su uzorci ispitivanog materijala koji nisu izazivali pojavu citopatogenog efekta, posle tri pasaže proglašavani negativnim na prisustvo virusa PI3;
- Uzorci ispitivanih nosnih briseva koji su u inokulisanim ćelijskim linijama doveli do pojave citopatogenog efekta, ispitivani su metodom virus neutralizacije na ćelijskoj liniji MDBK uz korišćenje imunog seruma protiv virusa PI3 dobijenog metodom hiperimunizacije kunića sojem SF4 navedenog virusnog antigena, sa titrom specifičnih antitela od 1:128;

- Svi supernatanti kultura tkiva poreklom od uzoraka nosnih briseva koji su doveli do pojave citopatogenog efekta su titrirani u razređenjima tako što su razređenja svakog supernatanta postavljena u 5 kolona na ćelijskoj liniji MDBK. Titar virusa je obračunat po Kerberu.
- Virusneutralizacija je izvođena tako što su prethodno napravljena dvostruka razređenja titriranih supernatanata suspektnog materijala ispitivanog na prisustvo virusa PI3 u udubljenja mikroploča za kulturu tkiva u duplikatu, uz korišćenje Eagle MEM sa 2 % fetalnog telećeg seruma kao rastvarača;
- Virus neutralizacija vršena je u jednom redu razređenja supernatanta dodavanjem iste zapremine specifičnog hiperimunog seruma u svako udubljenje dok je paralelni red mikroploče sa identičnim dvostrukim razređenjima suspektnog materijala služio kao kontrola virusa;
- Posle inkubacije od jednog sata na 37°C, u svako udubljenje mikroploče dodato je po 50 µl suspenzije ćelija linije MDBK u Eagle MEM-u sa 2% fetalnog telećeg seruma;
- Mikroploče sa ispitivanim uzorcima hermetički su zatvorene parafilmom i inkubisane na temperaturi od 37°C, uz svakodnevno posmatranje na prisustvo citopatogenog efekta;
- Dokaz neutralizacije virusa sa hiperimunim serumom protiv virusa PI3 predstavlja izostanak citopatogenog efekta u dva ili više dvostrukih razređenja virusa u odnosu na red sa istim razređenjima virusa u kojima virus nije bio neutralizovan, tako da je doveo do pojave citopatogenih promena.

Metoda direktne imunofluorescencije (DIF, TFA)

Metoda direktne imunofluorescencije izvršena je po uputstvu proizvođača monoklonskih antitela protiv virusa PI3 goveda konjugovanih sa fluoresceinizotiocijanatom- FITC, po sledećoj proceduri:

- Svi izolovani sojevi virusa koji su doveli do pojave citopatogenog efekta inokulisani su na 24 sata staru ćelijsku liniju MDBK, u udubljenja mikroploče sa ravnim dnom za kulturu tkiva;
- Pred samu inokulaciju virusa, zamenjena je podloga za rast (Eagle MEM sa 10% fetalnog teleće seruma sa antibioticima i antimikoticima) podlogom za održavanje ćelijske linije koja je imala isti sastav sa smanjenim procentom fetalnog telećeg seruma koji je iznosio 2%;
- U udubljenja mikroploče sa ćelijskom linijom, inokulisano je po 25 mikrolitara ispitujućeg materijala;
- U dva udubljenja inokulisan je referentni soj SF4 virusa PI3 goveda, a poslednji red ćelijske linije bio je neinokulisan, da bi poslužio kao kontrola tkiva u testu direktne imunofluorescencije;
- Mikroploče su inkubisane u termostatu na 37 °C u prisustvu 5% CO₂ dok citopatogeni efekat nije zahvatio oko 50% ćelija;
- Mikroploče su, posle inkubacije, ispirane sa PBS puferom pH 7,2 i osušene na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta;
- Fiksiranje ćelijske linije u udubljenjima mikroploča sa ravnim dnom obavljeno je uz pomoć 80% acetona sa 20% metanola, u trajanju od 30 minuta (**Bhattacharya i sar 2010**), posle čega je u svako udubljenje dodato po 50 mikrolitara radnog rastvora konjugata za direktnu imunofluorescenciju za dokazivanje prisustva antigena virusa PI3 goveda;

Dijagnostički serum koji je korišćen za izvođenje metode direktne imunofluorescencije, sadržavao je monoklonska antitela protiv virusa parainfluence 3 goveda, konjugovana sa fluoresceinizotiocijanatom - FITC, proizvođača: "Bio X, Belgium" (Bio iks, Belgija).

- Mikroploče su inkubisane u vlažnoj komori na 37°C, u trajanju od 45 minuta;
- Posle inkubisanja višak konjugata uklanja se iz udubljenja, a mikroploče su dva puta ispirane sa PBS pH 7,2 i treći put destilovanom vodom;
- Mikroploče su zatim osušene na sobnoj temperaturi i posmatrane pod vidnim poljem fluorescentnog mikroskopa u mračnoj komori, pri čemu su kao pozitivne kontrole služila udubljenja sa ćelijama inokulisanim referentnim sojem SF4 virusa PI3, dok su kao negativna kontrola služila udubljenja sa ćelijskim linijama koje nisu inokulisane;
- Jasno izražena žutozelena fluorescencija granula u citoplazmi, a kasnije i u jedrima inokulisanih ćelija, predstavlja dokaz prisustva antigena virusa parainfluence 3 goveda u ispitivanom materijalu.

Metoda lančane reakcije polimeraze - PCR

Lančanoj reakciji polimeraze - PCR prethodila je ekstrakcija virusne nukleinske kiseline a sama PCR reakcija se sastojala iz sledećih faza:

- Priprema smeše i izvođenje RT PCR reakcije po propisanom termalnom protokolu;
- Elektroforeza PCR produkta;
- Vizuelizacija PCR proizvoda (čitanje rezultata RT PCR reakcije).

Ekstrakcija RNK

Postupak ekstrakcije RNK virusa PI3 iz ispitujućeg materijala, izvršen je po uputstvu proizvođača kita za ekstrakciju RNK, “Ambion bz Life technology”, po sledećoj proceduri:

- Kao ispitujući materijal za ekstrakciju RNK upotrebljeni su identifikovani virusi PI3 goveda, izolovani i umnoženi na ćelijskoj liniji MDBK;
- Ekstrakcija RNK urađena je po uputstvu proizvođača kita za ekstrakciju RNK proizvođača “Ambion by Life technologies” RNA Mini Kit;
- U mikrotube od 1,5 ml sipano je po 500 µl ispitujućeg materijala;
- U mikrotube je zatim dodato po 500 µl pufera za razaranje (lysis buffer), sa 1% β merkaptetanola i etanola od 96-100% u istoj zapremini;
- Mešavina je homogenizovana na vorteksu u trajanju od nekoliko sekundi;
- Mikrotube su centrifugirane nekoliko sekundi na 8000 o/min da bi se otklonili tragove smeše sa zapušača i sprečila unakrsna kontaminacija otvaranjem ampula;
- Sadržaj smeše filtriran je u kolonama za mikrofiltraciju centrifugiranjem, u trajanju od 1 minut, pri brzini od 8000 o/min;
- Filtrat je odbačen zajedno sa sabirnom ampulom za sakupljanje filtrata i u nastavku rada korišćene su nove sabirne ampule;
- U svaku kolonu za mikrofiltraciju dodato je po 700 µl prvog pufera za ispitivanje, posle čega su kolone centrifugirane u trajanju od 1 minut na 8000 o/min;
- Filtrat je odbačen sa tubom za sakupljanje filtrata i dodavano je 500 µl drugog pufera za ispiranje;
- Sadržaj je centrifugiran 1 minut pri brzini od 8000 o/min;

- Kolone za mikrofiltraciju centrifugirane su sa praznom ampulom za sakupljanje filtrate, u trajanju do 3 minuta, pri brzini od 13000 o/min, kako bi se odstranili svi tragovi poslednjeg pufera za ispiranje;
- Kolone za mikrofiltraciju prebačene su u otvorene mikrotube od 1,5 ml, dodato je 50 µl rastvarača za otpuštanje ribonukleinske kiseline sa filtera i centrifugirane su dva minuta, pri brzini od 12000 o/min;
- Ekstrahovana ribonukleinska kiselina čuvana je u zamrzivaču na -20⁰C do nastavka postupka, odnosno do postavljanja RT PCR reakcije;
- Ekstrakcija RNK iz svih ostalih uzoraka suspektnog materijala, posle čije inokulacije u kulturu tkiva nije došlo do pojave citopatogenog efekta (nosni brisevi iz kojih nije izolovan virus), izvršena je direktno iz nosnih briseva po prethodno navedenoj proceduri.

Priprema reakcione smeše i izvođenje lančane reakcije polimeraze RT PCR

Da bi se izvršila RT PCR reakcija, pripremljena je smeša reagenasa za odvijanje reakcije. S obzirom na to da se analizira prisustvo virusne RNK, reakciji PCR mora prethoditi proces reverzne transkripcije (RT), zbog čega se koriste kitovi za smešu koji imaju jedan korak više (RT PCR) i služe za PCR reakcije kada se ekstrahuje RNK.

Smeša za RT PCR reakciju napravljena je prema uputstvu proizvođača komercijalnog kita Qiagen za RNK viruse "One step RT PCR Q".

Tabela 3. Sastav smeše za ispitivanje jednog uzorka metodom RT PCR

Supstanca	Količina
RNA-sa slobodna voda	6 μ l
5x Qiagen One step RT PCR Buffer	4 μ l
dNTP mix	0,8 μ l
5 X Q solution	4 μ l
Forward primer (10 μ M)	1,2 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1,2 μ l
Qiagen One Step RT PCR enzyme mix	0,8 μ l

Sve analize izvršene metodom RT PCR obavljene su u zapreminama od po 20 μ l, koje su pripremljene od 18 μ l smeše reagenasa i 2 μ l uzorka nukleinske kiseline, u mikrotubama od 200 μ l. Pripremljene smeše sa uzorcima postavljane su u termalni procesor za izvođenje PCR reakcije, proizvođača Eppendorf. Korišćeni su sledeći termalni protokoli:

Tabela 4. Termalni protokol za RT PCR reakciju sa prajmerima konzervisanog dela genoma iz F gena (**Lyon i sar. 1996.**)

Parameter	Temperatura °C	Vreme	Ponavljjanje
Reverzna transkripcija	47	30 min	1
Inicijalna denaturacija	94	2 min	1
Denaturacija	94	45 sec	35
Kaljenje	51	45 sec	
Ekstenzija	72	1 min	
Finalna ekstenzija	72	5 min	1

Očekivana veličina PCR proizvoda iznosi 400 bp.

Tabela 5. Termalni protokol za RT PCR reakciju sa prajmerima konzerviranog dela genoma iz HN gena (**Zhu i sar. 2011**)

Parameter	Temperatura °C	Vreme	Ponavljjanje
Reverzna transkripcija	50	30 min	1
Inicijalna denaturacija	93	3 min	1
Denaturacija	94	45 sec	35
Kaljenje	49	45 sec	
Ekstenzija	72	1 min	
Finalna ekstenzija	72	10 min	1

Očekivana veličina PCR proizvoda iznosi 647 bp.

Postupak izvođenja elektroforeze RT PCR proizvoda

Gotovi proizvodi RT PCR reakcije razdvajani su na elektroforezi nanošenjem po 5,5 μ l proizvoda PCR sa dodatkom boje u svako udubljenje gela.

Za elektroforezu upotrebljen je tris-acetat-EDTA pufer sa etidijum bromidom i gel pripremljen sa 2% agaroze u puferu za elektroforezu.

tabela 6. parametri elektroforeze

Parametar	Vrednost
Napon struje	120 V
Jačina struje	30 mA
Vreme izlaganja	60 minuta

Posle završene elektroforeze, rezultati PCR reakcija pročitani su postavljanjem gela na transiluminator pod UV svetlom.

U jedan bazen gela za elektroforezu nalivena je ista zapremina smeše sekvenci različitih dužina (ruler), sa mešavinom produkata (100 – 1000 bp), koja je služila kao vizuelni pokazatelj za procenu veličine PCR proizvoda.

Pozitivna reakcija ispoljava se pojavom traka fluorescentnonarandžaste boje u širini bazena na gelu i na mestu koje odgovara veličini sekvenci prema broju baznih parova, u poređenju sa elektroforeziranom sekvencama sadržanim u ruleru.

Metoda purifikacije proizvoda RT-PCR (prečišćavanje PCR proizvoda)

Metoda za prečišćavanje PCR proizvoda izvršena je po uputstvu proizvođača reagenasa (kita) za purifikaciju PCR produkta (Mini Elute purification kit, proizvođača Qiagen). Prečišćavanje proizvoda PCR reakcije izvršeno je po sledećem protokolu:

- Pripremljeni su radni rastvori svih pufera u kitu dodavanjem etanola u propisanoj količini po preskripciji proizvođača;
- Gotovom proizvodu PCR reakcije dodat je pufer PBS u zapremini pet puta većoj od zapremine gotovog proizvoda RT PCR reakcije;
- Smeša je homogenizovana na vorteksu u trajanju od nekoliko sekundi;
- Posle toga, smeša je prebačena u mini kolone za filtriranje centrifugiranjem;
- Zatim je izvršeno centrifugiranje uzoraka smeše u trajanju od 1 minut na 8000 o/min;
- Filtrati su odbačeni i u mini kolone dodato je po 750 μ l pufera PE (purificate elution) za prečišćavanje;
- Sadržaj uzoraka smeše u minikolonama centrifugiran je 1 minut na 8000 o/min;
- Zatim je izvršeno odbacivanje filtrate, dok su kolone još jednom centrifugirane 1 minut na 8000 o/min do potpunog odstranjivanja pufera PE sa membrane;
- Minikolone su zatim prebačene u nove tube za sakupljanje prečišćene DNK;
- U svaku minikolonu dodato je po 10 μ l pufera EB (elution buffer) za otpuštanje prečišćene DNK;
- Miniklone su inkubisane 1 minut na sobnoj temperaturi od 20-22°C;
- Posle toga izvršeno je centrifugovanje uzoraka u kolonama 1 minut na 8000 o/min i dobijene su prečišćene dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), odnosno

proizvodi RT PCR reakcije u novim mikrotubama koje su spremljene za sekvenciranje;

- Uzorci prečišćene DNK odlagani su i čuvani na temperaturi od -20°C do postupka sekvenciranja.

Metoda sekvenciranja proizvoda RT-PCR

Sekvenciranje PCR proizvoda izvršeno je metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru. Kao pripremnu etapu u sekvenciranju bilo je potrebno pripremiti uzorak za sekvenciranje koji podrazumeva dodatno prečišćavanje proizvoda PCR izopropanolom i denaturaciju formamidom na sledeći način:

- U svaku minutubu sa prečišćenom DNK dodato je po 80 µl 75% izopropanola i smeša je inkubisana 15 min na sobnoj temperaturi u mraku;
- Smeša je centrifugirana 45 min na 2000 o/min;
- Supernatant je odliven i tubice su centrifugirane 2 min na 7000 o/min;
- Mikrotube su naknadno sušene u mračnoj komori na sobnoj temperaturi 15-30 min;
- Osušeni proizvod je denaturisan dodavanjem 10µl formamida;
- Tubice sa formamidom su inkubisane 2 min na 95°C i 2 min na 4°C;
- Sadržaj tubica prebačen je u strip tubice za sekvenciranje;
- Ovim postupkom je proizvod PCR-a bio pripremljen za finalni postupak sekvenciranja.

Sekvenciranje proizvoda PCR reakcije obavljeno je metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru, kome je prethodila priprema reakcione smeše koja je imala sledeći sastav:

Tabela 7. Sastav reakcione smeše za sekvenciranje DNK proizvoda

Reagens	Količina
Dye mix	2 μ l
Dye buffer	2 μ l
Prajmer F (forward ili reverse)*	1,2 μ l
H ₂ O	1,8 μ l
Uzorak prečišćenog proizvoda RT PCR	3 μ l
Ukupna količina smeše	10 μ l

Termalni protokol za sekvenciranje imao je sledeće parametre:

Tabela 8. Termalni protokol za sekvenciranje F sekvence F gena

Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
96 °C	1 min	
96°C	10 sec	X 35
50°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	do 24 sata	

Oprema koja je korišćena za sekvenciranje PCR proizvoda obuhvata: centrifugu sa rotorom za mikrotube do 15 000 rpm, frižider, zamrzivač, termo procesor Eppendorff i sekvencer „ABI PRISM Genetic Analyzer 310.

Utvrđivanje homologije nukleotidnih sekvenci domaćih sojeva sa sekvencama registrovanih sojeva virusa PI3 goveda iz banke gena

Postupak utvrđivanja procenta nukleotidne homologije F i HN sekvenci domaćih izolovanih sojeva virusa sa odgovarajućim sekvencama registrovanih virusa PI3 iz baze gena, izvršena je primenom BLAST softvera i baze gena NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Izrada filogenetskog stabla virusa PI3 goveda sa pozicioniranjem izolovanih sojeva navedenog virusa sa teritorije Republike Srbije

Položaj domaćih sojeva na filogenetskom stablu virusa dobijenog na osnovu sekvenci F i HN gena, određen je upotrebom programa MEGA 6.0. i algoritma "Maksimum Parsimony method". Upotrebom istog programa i algoritma formirano je i filogenetsko stablo sa vremenom grananja izolovanih sojeva virusa.

REZULTATI

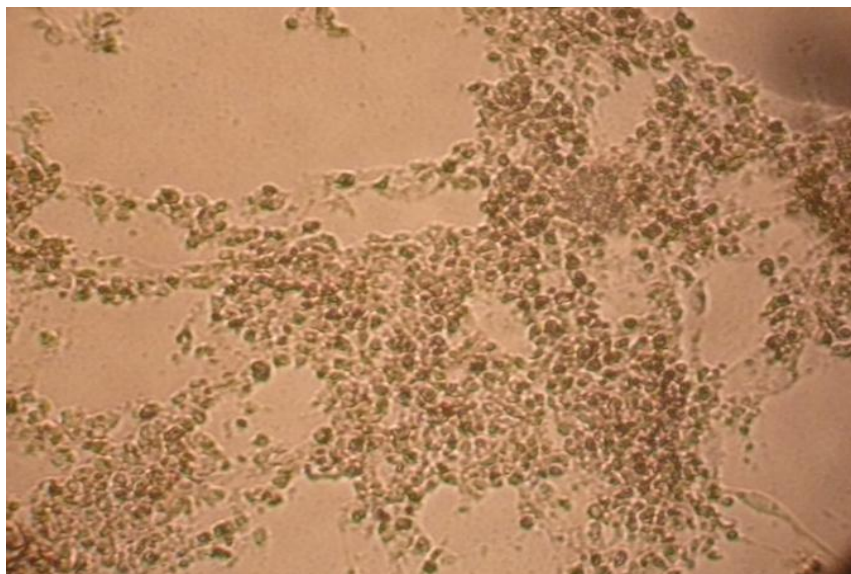
Rezultati izolacije i virusneutralizacije virusa PI3 goveda iz nazalih briseva

Ispitani su nosni brisevi 119 goveda različitih rasnih i starosnih kategorija sa teritorije Republike Srbije, koji su imali simptome poremećaja gornjih partija respiratornog trakta. Inokulisana ćelijska linija MDBK sa ispitujućim materijalima je inkubisana na 37° C u prisustvu 5% CO₂ u trajanju od 7 dana. Prisustvo citopatogenog efekata praćeno je svakodnevno. Svaki material koji nije dao citopatogeni efekat bio je inokulisan na drugu pasažu posle 7 dana inkubacije, trostrukim zamrzavanjem i odmrzavanjem prethodne pasaže. Postupak je kod negativnog nalaza ponovljen ukupno 3 puta (tri pasaže od 7 dana). U prvoj i drugoj pasaži nije došlo do pojave citopatogenog efekta ni u jednom ispitanom materijalu. Citopatogeni efekat referentnog soja virusa SF4 je dobijen u prvoj pasaži.

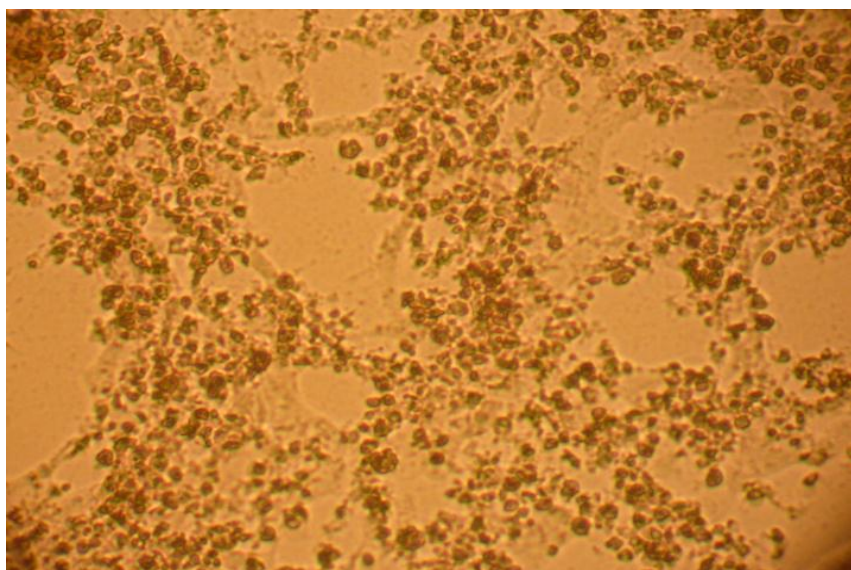
U trećoj pasaži tokom izolacije virusa na ćelijskoj liniji MDBK došlo je do pojave citopatogenog efekta 11 inokuliranih uzoraka nosnih briseva (9,24%).

U testu virusneutralizacije, četiri domaća izolovana soja virusa su pokazala titar neutralizacije od 1:16 (4 log₂), i to kod virusa pod oznakom: SRB001, SRB002, SRB003 i SRB005. Dva izolovana virusa imala su titar neutralizacije 1:8 (3log₂), i to virusi pod oznakom SRB004 i SRB006. Referentni virus SF4 imao je titar 1:64 (6 log₂), dok su rezultati VN testa ostalih pet izolovanih sojeva virusa bili negativni.

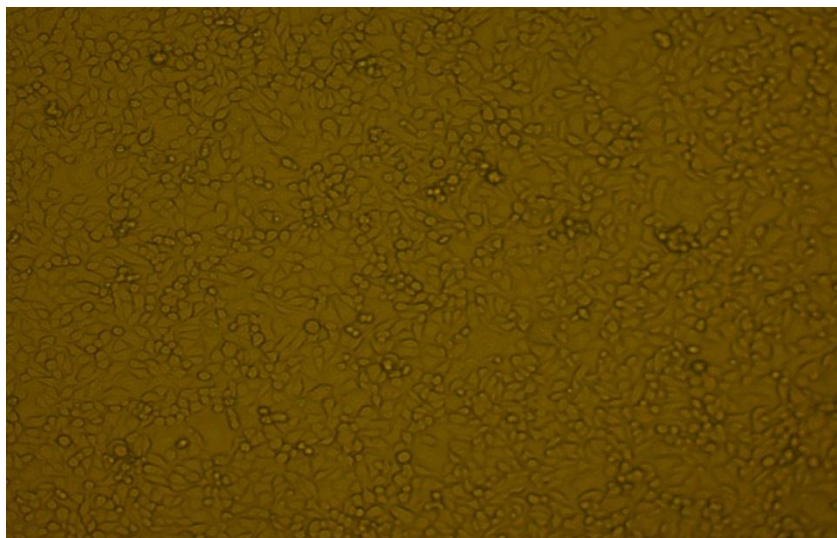
Testom virusneutralizacije potvrđeno je prisustvo virusa PI3 goveda u šest nosnih briseva.



Slika br. 4: Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji MDBK posle 72 sata od inokulacije soja SRB001 virusa PI3



Slika br. 5: Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji MDBK posle 72 sata od inokulacije soja SF4 virusa PI3



Slika br 6: Neinkulisana ćelijska linija MDBK

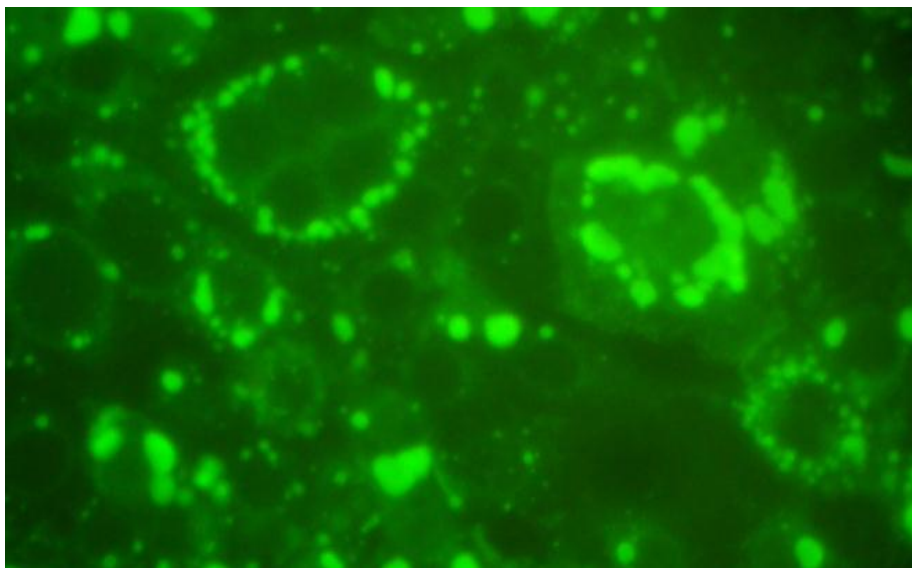
Rezultati identifikacije virusa PI3 goveda metodom direktne imunofluorescencije (TFA, DIF)

Svih 11 uzoraka suspektnog materijala koji su doveli do pojave citopatogenog efekta, inokulisani su na ćelijsku liniju MDBK, postavljenu u mikroploči za kulturu tkiva, i inkubirani do pojave citopatogenog efekta koji je zahvatio 40% do 50% ćelija.

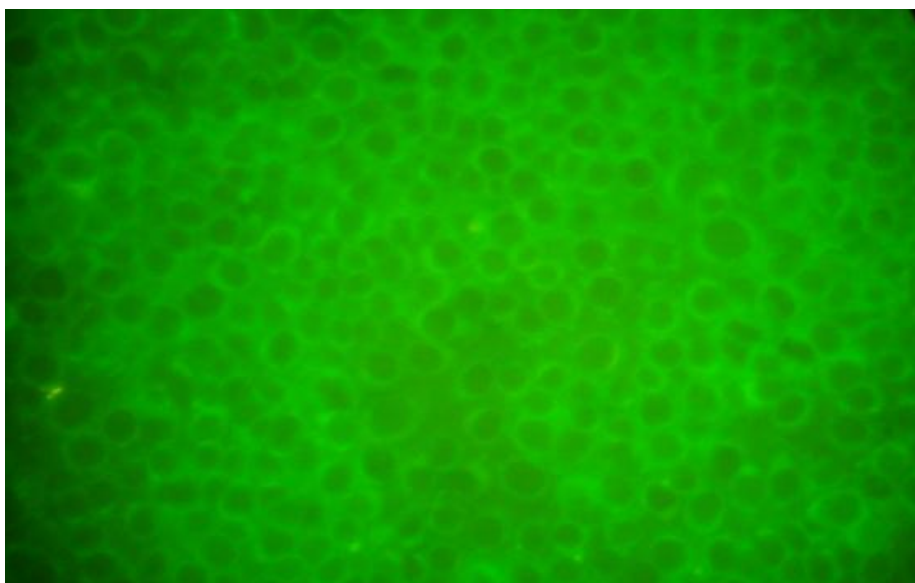
Svi uzorci ćelija sa prisutnim citopatogenim efektom (CPE) u mikroploči, ispitani su testom direktne imunofluorescencije sa konjugatom monoklonskih antitela protiv virusa PI3 goveda, obeleženih fluoresceinizotiocijanatom (komercijalni reagens, konjugat proizvođača BIO X Belgija).

Pozitivan rezultat prisustva antigena virusa PI3 goveda metodom direktne imunofluorescencije, dobijen je ispitivanjem ćelijske linije MDBK inokulisanih sa šest uzoraka izolovanih domaćih sojeva virusa PI3 goveda, koji su prethodno identifikovani metodom virusneutralizacije.

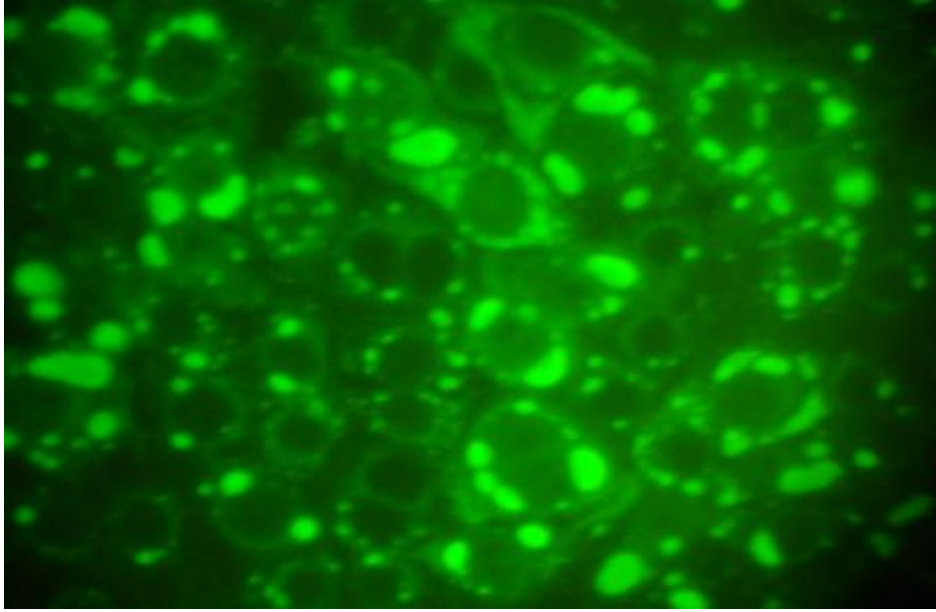
Ostalih pet uzoraka izolovanih virusa na ćelijskoj liniji MDBK dalo je negativan rezultat u testu direktne imunofluorescencije, kao i prethodno u testu virusneutralizacije.



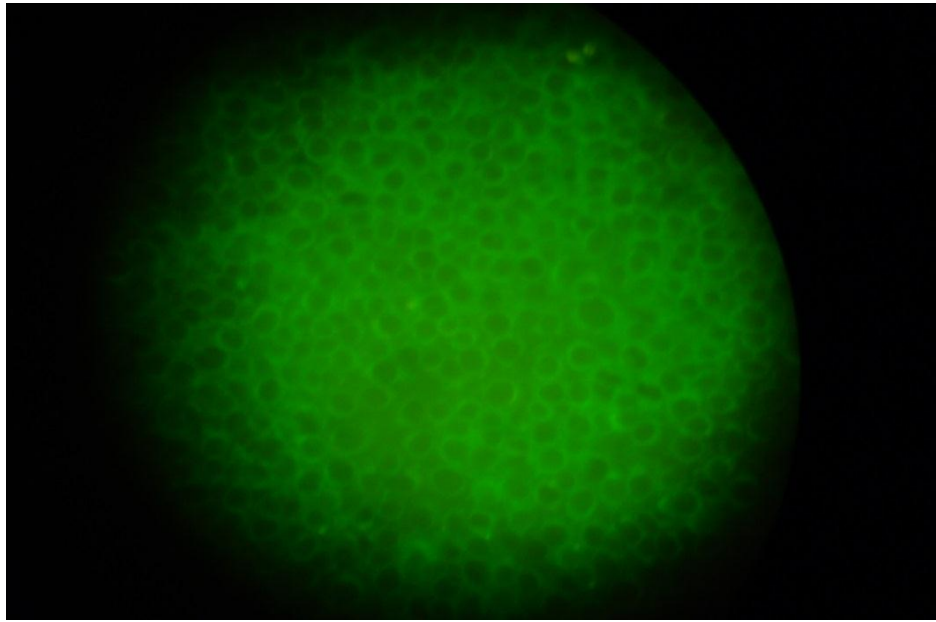
Slika br. 7: Pojava fluorescencije posle 72 sata od inokulacije soja SF4 virusa PI3 u ćelijsku liniju MDBK



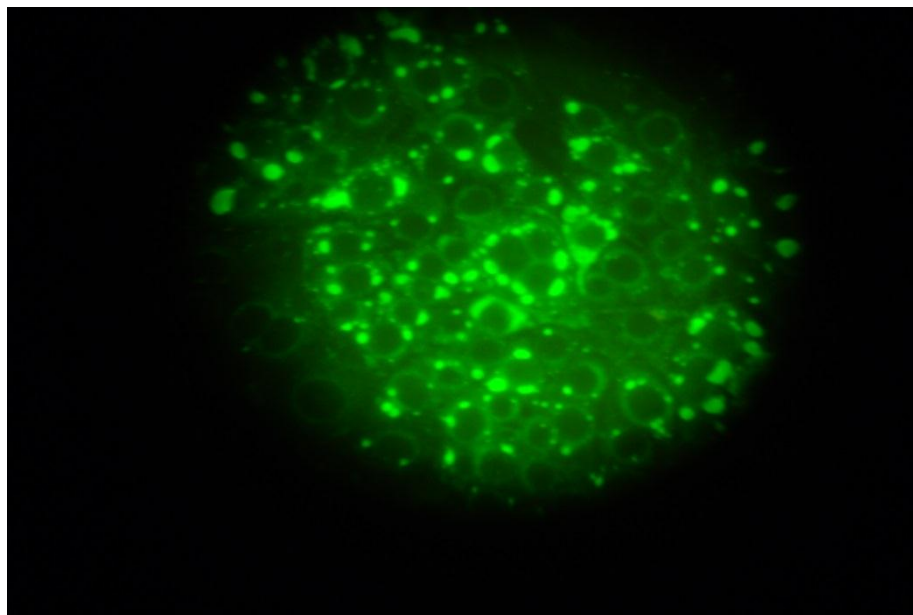
Slika br. 8: Neinokulisana ćelijska linija MDBK (metoda direktne imunofluorescencije)



Slika br. 9: Pojava fluorescencije posle 72 h od inokulacije soja SRB004 virusa PI3 u ćelijsku liniju MDBK



Slika br. 10: Neinokulisana ćelijska linija MDBK (realna slika vidnog polja)



Slika br.11: Pojava fluorescencije posle 72 h od inokulacije soja SRB004 virusa PI3 u ćelijsku liniju MDBK (realna slika vidnog polja)

5.3. Rezultati RT PCR reakcije

Rezultati RT PCR reakcije sa prajmerima za dobijanje sekvence F gena

Za dokazivanje prisustva genoma izolovanih sojeva virusa PI3 goveda, korišćeni su prajmeri koji otkrivaju sekvencu F gena virusa PI3.

Pozitivan rezultat metodom RT PCR definisan je sekvencom F gena genoma virusa PI3 goveda od 400 baznih parova, koja se detektuje na transiluminatoru posle izvršene elektroforeze na gelu.

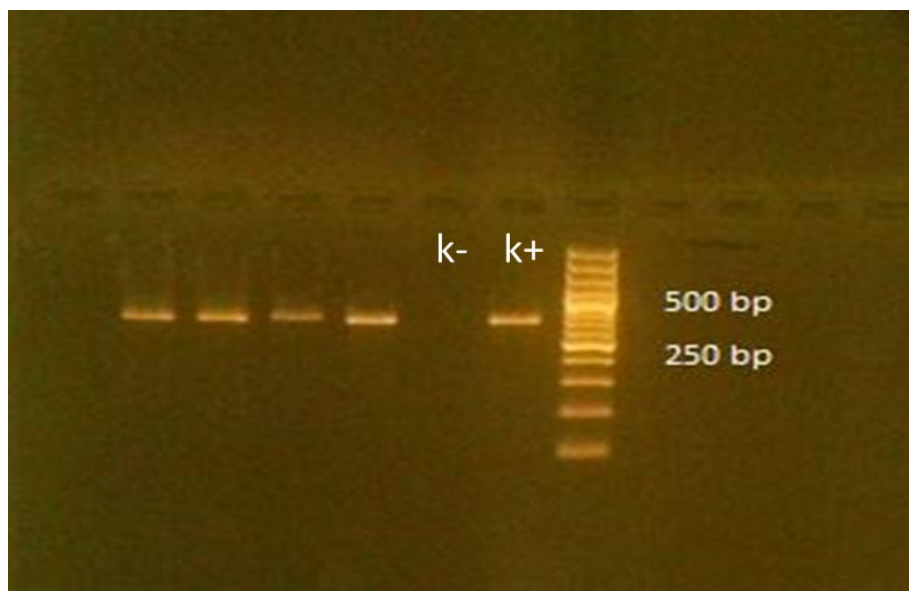
U procesu RT-PCR reakcije potvrđeno je prisustvo genoma virusa PI3 goveda kod šest ispitanih materijala koji su predhodno dokazani metodom direktne imunofluorescencije.

Ostalih pet uzoraka koji su doveli do pojave citopatogenog efekta na ćelijskoj liniji MDBK i koji su dali negativan nalaz metodom direktne imunofluorescencije, posle

ispitivanja metodom RT PCR takođe su bili negativni na prisustvo genoma pomenutog virusa.

Naknadno je izvršeno ispitivanje ostalih prikupljenih materijala (nazalnih briseva goveda) koji nisu doveli od pojave citopatogenog efekata tokom tri pasaže izolacije virusa na ćelijskoj liniji MDBK i koji su metodom izolacije virusa proglašeni negativnim.

Kod dva uzorka ispitivanog materijala nosnih briseva, označenih kao SRB062 i SRB100, utvrđeno je prisustvo genoma virusa PI3 goveda metodom RT PCR, po prethodno opisanoj metodologiji, uz korišćenje odgovarajućih prajmera.



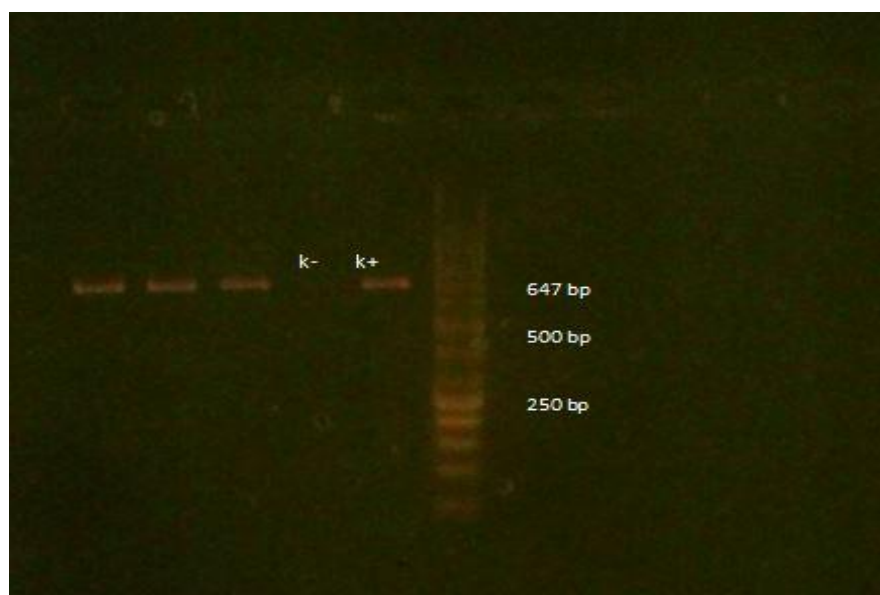
Slika br. 12: DNK fragmenti domaćih sojeva SRB001, SRB002, SRB004 i SRB005 virusa PI3 dobijenih metodom RT PCR uz korišćenje prajmera za F gen (proizvodi od 400 bp), pored negativne (-k) i pozitivne kontrolne (+k) sa gen rulerom

Rezultati RT PCR reakcije sa prajmerima za dobijanje sekvence HN gena

Svi materijali (osam uzoraka) pozitivni na prisustvo virusa PI3 goveda, ispitani su reakcijom RT-PCR uz korišćenje prajmera za deo HN gena koji kodira sintezu HN proteina virusa PI3 goveda.

Kod svih osam ispitanih uzoraka suspektnog materijala ustanovljeno je prisustvo genoma virusa PI3 goveda i dobijena je sekvenca HN gena koja se sastoji od približno 647 baznih parova.

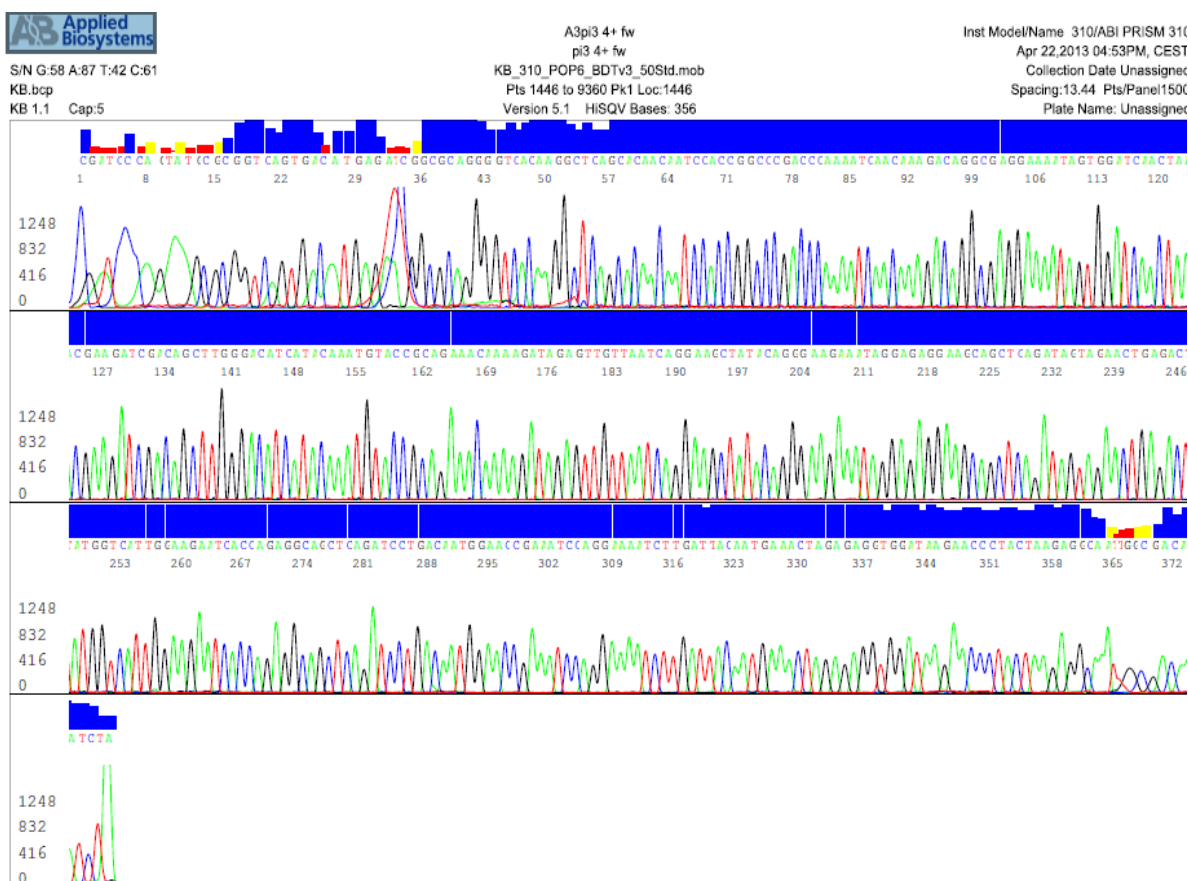
Svi dobijeni proizvodi reakcije RT PCR sačuvni su za proces purifikacije i za sekvenciranje.



Slika br.13: DNK fragmenti domaćih sojeva SRB001, SRB002 i SRB003 virusa PI3 dobijenih metodom RT PCR uz korišćenje prajmera za HN gen (proizvodi od 647 bp), pored negativne (k-) i pozitivne kontrolne (k+) sa gen rulerom

Rezultati sekvenciranja domaćih izolovanih sojeva virusa parainfluence 3 govoda

Sekvenciranjem osam proizvoda reakcije RT PCR koja je izvršena uz korišćenje prajmera za deo F gena, dobijene su sekvence koje imaju dužinu od 400 nukleotida, dok su sekvenciranjem osam proizvoda reakcije RT PCR, koja je urađena sa prajmerima za deo HN gena, dobijene sekvence koje imaju dužinu od oko 647 nukleotida.



Slika br. 14: Elektroforegram sekvence F gena prvog domaćeg izolovanog soja SRB001 virusa PI3 govoda

Sve sekvence su ispitane BLAST programom (Basic Local Alignment Search Tool) u cilju dobijanja rezultata nukleotidne homologije sekvenci domaćih izolovanih sojeva virusa sa nukleotidnim sekvencama virusa PI3 iz međunarodne baze gena. Sekvence i nukleotidna homologija prikazani su u tabelama koje slede.

Nukleotidne sekvence F gena domaćih izolovanih sojeva virusa PI3 i njihova nukleotidna homologija sa sekvencama drugih registrovanih sojeva

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB001, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 11.

Tabela br. 11: Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja virusa SRB001

Virus BPI3, soj SRB001
Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja virusa SRB001
CTCAGCACCGATCCCCAAGAAAGCGCGGTGACGACAAATGAGAACGGCGCAGGGGTCACAA GGCTCAGCACAACAATCCACCGGCCCGACCCAAAATCAACAAAGACAGGCGAGGAAAATA GTGGATCAACTAACGAAGATCGACAGCTTGGGACATCATACAAATGTACCGCAGAAACAAA AGATAGAGTTGTTAATCAGGAAGCTATACAGGGAAGAAATAGGAGAGGAAGCAGCTCAGAT AGTAGAACTGAGACTATGGTCATTGGAAGAATCACCAGAGGCAGCTCAGATCCTGACAATG GAACCGAAATCCAGGAAAATCTTGATTACAATGAACTAGAGAGGTGGATAAGAACCCTAC TAAGAGGCAAA

Sekvenca F gena domaćeg izolovanog soja virusa pod oznakom SRB001, pokazala je najviši procenat nuklotidne homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripadaju genotipu C (SD0835, HS9 i 12Q061) i ona je iznosila preko 95%.

Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipovima A i B, kretala se u intervalu od 80% do 83%, što je prikazano u Tabeli br. 12.

Tabela br. 12: Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja virusa SRB001

Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB001 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	96%
JQ063064.1	NM09	83%
AF178654.1	Kansas/15626/84	82%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	81%
DQ166824.1	Porcine paramyxovirus strain Texas	81%
EU277658.1	Q5592	81%
AF178655.1	Shipping Fever	81%
AB770485.1	BN-CE	80%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	80%
DQ166823.1	Porcine paramyxovirus strain Frost	80%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB002, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 13.

Tabela br. 13. Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja SRB002 virusa PI3

Virus BPI3, izolovani soj SRB002
Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja virusa SRB002
TACTCAGCACCGATCCCCAAGAAAGCGCGGTCAGTGACAATGAGAACGGCGCAGGGGTAC AAGGCTCAGCACACAATCCACCGGCCCGACCCAAAATCAACAAAGACAGGGCAGGAAAA TAGTGGATCAACTAACGAAGATCGACAGCTTGGGACATCATACAAATGTACCGCAGAAACA AAAGATAGAGTTGTTAATCAGGAAGCTATACAGGGAAGAAATAGGAGAGGAAGCAGCTCA GATAGTAGAACTGAGACTATGGTCATTGGAAGAATCACCAGAGGCAGCTCAGATCCTGACA ATGGAACCGAAATCCAGGAAAATCTTGATTACAATGAAACTAGAGAGGTGGATAAGAACCC TACTAAGAGG

Sekvenca F gena domaćeg izolovanog soja virusa pod oznakom SRB002, pokazala je najviši procenat homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripadaju genotipu C (SD0835, HS9 i 12Q061) i ona se kretala od 96% do 99%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipovima A i B (NM09, Q5592, BN CE, BN1 i dr.), kretala se u intervalu od 81% do 83%, što je prikazano u Tabeli br. 14.

Tabela br. 14. Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB002

Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB002 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	96%
JQ063064.1	NM09	83%
AF178654.1	Kansas/15626/84	82%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	82%
DQ166824.1	Porcine paramyxovirus strain Texas	82%
EU277658.1	Q5592	81%
AF178655.1	Shipping Fever	81%
AB770485.1	BN-CE	81%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	81%
DQ166823.1	Porcine paramyxovirus strain Fros	81%
AB770484.1	BN-1	80%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB003, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 15.

Tabela br. 15. Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja SRB003 virusa PI3

Virus BPI3, izolovani soj SRB003
Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja SRB003 virusa PI3
CTCAGCACCGATCCCAAGAAAGCGCGGTCAGTGACAATGAGAACGGCGCAGGGGTCACAA GGCTCAGCACACAACAATCCACCGGCCCGACCCAAAATCAACAAAGACAGGCGAGGAAAATA ATGGATCAACTAACGAAGATCGACAGCTTGGGACATCATACAAATGTACCGCAGAAACAAA AGATAGAGTTGTTAATCAGGAAGCTATACAGGGAAGAAATAGGAGAGGAAGCAGCTCAGAT AGTAGAACTGAGACTATGGTCATTAGAAGAATCACCAGAGGCAGCTCAGATCCTGACAATG GAACCGAAATCCAGGAAAATCTTGATTACAATGAACTAGAGAGGTGGATAAGAACCCTAC TAAGAG

Sekvenca F gena domaćeg izolovanog soja virusa pod oznakom SRB003, pokazala je najviši procenat homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripadaju genotipu C (SD0835, HS9, 12Q061) i ona je iznosila od 96% do 99%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu A, kretala se u intervalu od 81% do 83%, a prema soju koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 80%, što je prikazano u Tabeli br. 16.

Tabela br. 16. Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB003

Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB003 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
LC000638.1	HS9	99%
JX969001.1	12Q061	96%
JQ063064.1	NM09	83%
AF178654.1	Kansas/15626/84	82%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	80%
EU277658.1	Q5592	80%
AF178655.1	Shipping Fever	80%
AB770485.1	BN-CE	81%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	80%
AB770484.1	BN-1	80%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB004, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 17.

Tabela br. 17. Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja SRB004 virusa PI3

Virus BPI3, izolovani soj SRB004
Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja virusa SRB004
CAATGAGATCGGCGCAGGAGTCACAAGACTTAGCACAACAATCCACCGGCCCGACTCCAAA TCAACAAAGACAGGCGAGGAAAATAATGGATCAGCTAACGAAAATCGACAGTTTGGGACAT CACACGAATGTGCCGCAGAAACAAAAGATAGAGTTGTTAATCAGGAAGCTGTACAGGGAGG AAATAGGAGAGGAAGCAGCICAGATAGTAGAACTGAGACTATGGTCATTAGAAGAATCTCC AGAGGCAGCCCAGATCCTGACAATGGAACCCAAATCCAGGAAAATCTTGATTACAATGAAA TTGGAGAGATGGATAAGGACTCTACTAAGAGGCAATTGGCGACAATCT

Sekvenca F gena domaćeg izolovanog soja virusa PI3 pod oznakom SRB004, pokazala je najviši procenat homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835) i ona je iznosila 92%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu A, kretala se u intervalu od 81% do 89%, a prema soju koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 82%, što je prikazano u Tabeli br. 18.

Tabela br. 18. Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB004

Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB004 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	92%
LC000638.1	HS9	91%
JX969001.1	12Q061	90%
AF178654.1	Kansas/15626/84	89%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	88%
DQ166824.1	Porcine paramyxovirus strain Texas	88%
AF178655.1	Shipping Feve	88%
JQ063064.1	NM09	86%
AB770484.1	BN-1	85%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	85%
AB770485.1	BN-CE	87%
EU277658.1	Q5592	82%
KF530249.1	Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/AUS/6/2007	81%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB005, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 19.

Tabela br. 19. Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja SRB005 virusa PI3

Virus BPI3 izolovani soj SRB005
Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja virusa SRB005
CTCAGCACCGATCCCCAAGAAAGCGcGGTCAGTGACAATGAGAAcGGcGCAGGGGTCACAAG GCTCAGCACAACAATCCACCGGCCCGACCCAAAATCAACAAAGACAGGGCGAGGAAAATAGT GGATCAACTAACGAAGATCGACAGCTTGGGACATCATACAAATGTACCGCAGAAACAAAAG ATAGAGTTGTTAATCAGGAAGCTATACAGGGAAGAAATAGGAGAGGAAGCAGCTCAGATAG TAGAACTGAGACTATGGTCATTGGAAGAATCACCAGAGGCAGCTCAGATCCTGACAATGGA ACCGAAATCCAGGAAAATCTTGATTACAATGAAACTAGAGAGGTGGATAAGAACCCTACTA AGAGGA

Sekvenca F gena domaćeg izolovanog soja virusa pod oznakom SRB005, pokazala je najviši procenat homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835, HS9 i 12Q061) i ona se kretala u intervalu od 96% do 99%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu A, kretala se u intervalu od 80% do 83%, a prema soju koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 81%, što je prikazano u Tabeli br. 20.

Tabela br. 20. Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB005

Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB005 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	96%
JQ063064.1	NM09	83%
AF178654.1	Kansas/15626/84	82%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	82%
DQ166824.1	Porcine paramyxovirus strain Texas	82%
EU277658.1	Q5592	81%
AF178655.1	Shipping Fever	81%
AB770485.1	BN-CE	80%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	80%
Y00114.1	Japan	80%
D84095.1	Japan	80%
AB770484.1	BN-1	80%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB006, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 21.

Tabela br. 21. Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja SRB006 virusa PI3

Virus BPI3 izolovani soj SRB006
Nukleotidna sekvenca F gena izolovanog soja virusa SRB006
CTCAGCACCGATCCCCAAGAAAGCGCGGTCAGTGACAATGAGAACGGCGCAGGGGTCACAA GGCTCAGCACACAACAATCCACCGGCCCGACCCAAAATCAACAAAGACAGGCGAGGAAAATA GTGGATCAACTAACGAAGATCGACAGCTTGGGACATCATACAAATGTACCGCAGAAACAAA AGATAGAGTTGTTAATCAGGAAGCTATACAGGGAAGAAATAGGAGAGGAAGCAGCTCAGAT AGTAGAACTGAGACTATGGTCATTGGAAGAATCACCAGAGGCAGCTCAGATCCTGACAATG GAACCGAAATCCAGGAAAATCTTGATTACAATGAACTAGAGAGGTGGATAAGAACCCTAC TAAGAGGC

Sekvenca F gena domaćeg izolovanog soja virusa pod oznakom SRB006, pokazala je najviši procenat homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835, HS9 i 12Q061) i ona se kretala u intervalu od 96% do 99%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu A, kretala se u intervalu od 80% do 83%, a prema soju koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 81%, što je prikazano u Tabeli br. 22.

Tabela br. 22. Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB006

Nukleotidna homologija sekvence F gena izolovanog soja SRB006 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	96%
JQ063064.1	NM09	83%
AF178654.1	Kansas/15626/84	82%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	82%
DQ166824.1		82%
EU277658.1	Q5592	81%
AF178655.1	Shipping Fever	81%
AB770485.1	BN-CE	80%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	80%
DQ166823.1	Porcine paramyxovirus strain Frost nucleocapsid	80%
Y00114.1	Japan	80%
D84095.1	BN-1	80%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg uzorka virusa PI3 goveda pod oznakom SRB062, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 23.

Tabela br. 23. Nukleotidna sekvenca F gena domaćeg soja SRB062 virusa PI3

Virus BPI3, soj SRB062
Nukleotidna sekvenca F gena soja virusa SRB 062
TTTTTTAAAAGAGCAAACATGGAGAACCGGCGCAGGGGTACAAGGCTCAGCACAACAATC CACCGGCCCGACCCAAAATCAACAAAGACAGGCGAGGAAAATAATGGATCAACTAACGAA GATCGACAGCTTGGGACATCATACAAATGTACCGCAGAAACAAAAGATAGAGTTGTTAATC AGGAAGCTATACAGGGAAGAAATAGGAGAGGAAGCAGCTCAGATAGTAGAACTGAGACTA TGGTCATTAGAAGAATCACCGAGGCAGCTCAGATCCTGAAAATGGAACCGAAATCCAGGA AAATCTTGATTACAATGAAACTAGAGAGGTGGATAAGAACCCTACTAAGAGGCAAATGGGA CAATCTAAAATG

Sekvenca F gena domaćeg uzorka virusa PI3 pod oznakom SRB062, pokazala je najviši procenat homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835, HS9 i 12Q061) i ona se kretala u intervalu od 94% do 97%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu A, kretala se u intervalu od 80% do 84%, a prema soju koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 80%, što je prikazano u Tabeli br. 24.

Tabela br. 24. Nukleotidna homologija F sekvence soja SRB062 virusa PI3

Nukleotidna homologija F sekvence soja SRB062 virusa PI3		
Registarski broj	Soj	Homologija
HQ530153.1	SD0835	97%
LC000638.1	HS9	96%
JX969001.1	12Q061	94%
JQ063064.1	NM09	84%
AF178654.1	Kansas/15626/84	84%
EU439429.2	81-19252_Texas-81	83%
DQ166824.1	Porcine paramyxovirus strain Texas	83%
AF178655.1	Shipping Fever	82%
AB770485.1	BN-CE	82%
Y00114.1	Japan 1	82%
D84095.1	Japan 2	82%
AB770484.1	BN-1	82%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	82%
DQ166823.1	Porcine paramyxovirus strain Frost nucleocapsid	82%
EU277658.1	Q5592	80%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) domaćeg uzorka virusa PI3 goveda pod oznakom SRB100, dobijena je sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 25.

Tabela br. 25. Nukleotidna sekvenca F gena soja SRB100 virusa PI3

Virus BPI3, soj SRB100
Nukleotidna sekvenca F gena soja virusa SRB100
AAGCGGCGGGTCAGTGACATGGAGAACGGCGCAGGGGTCACAAGGCTCAGCACAACAATCC ACCGGCCCGACCCAAAATCAACAAAGACAGGCGAGGAAAATAGTGGATCAACTAACGAAG ATCGACAGCTTGGGGACATCATACAAATGTACCGCAGAAACAAAAGATAGAGTTGTTAATC AGGAAGCTATACAGGGAAGAAATAGGAGAGGAAGCAGCTCAGATAGTAGAACTGAGACTA TGGTCATTGGAAGAATCACCAGAGGCAGCTCAGATCCTGAAAATGGAACCGAAATCCAGGA AAATCTTGATTACAATGAACTAGAGAGGTGGATAAGAACCCTACTAAGAGGCAAATGCGA CAATCTAATTGT

Sekvenca F gena domaćeg uzorka virusa PI3 pod oznakom SRB100, pokazala je najviši procenat nukleotidne homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835, HS9) i ona je iznosila 97%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu A, kretala se u intervalu od 80% do 84%, a prema soju koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 80%, što je prikazano u Tabeli br. 26.

Tabela br. 26. Nukleotidna homologija F sekvence soja SRB100 virusa PI3

Nukleotidna homologija F sekvence soja SRB100 virusa Pi3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	97%
LC000638.1	HS9	97%
JX969001.1	12Q061	94%
JQ063064.1	NM09	84%
AF178654.1	Kansas/15626/84	84%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	83%
DQ166824.1	Porcine paramyxovirus strain Texas	83%
AF178655.1	B Shipping Fever	83%
AB770485.1	BN-CE	82%
AB770484.1	BN-1	83%
EU439428.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 92-7783_ISU-92	83%
EU277658.1	Q5592	80%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvence F gena) referentnog SF4 soja virusa PI3 goveda, dobijena je sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 27.

Tabela br. 27. Nukleotidna sekvenca F gena referentnog SF4 soja virusa PI3

Virus BPI3, referentni soj SF 4
Nukleotidna sekvenca F gena referentnog soja SF-4
TACTcAGCACCGAcTCCCAAGAGAACACGGCAGACAGCAATGAAATCAACACAGGAGCCAC AAGACTTAGCACGACAATCTACCAACTTGAGTCCAAAACAACaGAAACAAGCAAGGAAAAT AGTGGACCAGCTAACAAAAATCGACAGTTTGGGGCATCACACGAACGTGCCACAGAGACAA AAGATAGAAATGTTAATCAGAAGACTGTACAGGGAGGATATAGGAGAGGAAGCAGCCCAG ATAGTAGAACTGAGACTATGGTCACTCGAGGAATCTCCAGAAGCAGCCCAGATCCTAACAA TGGAACCCAAATCCAGGAAGATATTGATTACAATGAAGTTGGAGAGATGGATAAGGACTCT ACTAAGAGGGCAAATGCGACAAT

Nukleotidna sekvenca F gena referentnog SF4 soja virusa PI3 goveda pokazala je najviši nivo nukleotidne homologije sa sekvencama sojeva koji pripadaju genotipu A (Shipping fever, 81-19252_Texas-81, Kansas/15626/84) i ona je iznosila 99%. Nukleotidna homologija sa sojem virusa PI3 koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 85%.

Tabela br. 28. Nukleotidna homologija F sekvence referentnog soja SF-4 virusa PI3

Nukleotidna homologija F sekvence referentnog soja SF-4 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
AF178655.1	Bovine parainfluenza virus 3 strain Shipping Fever	99%
EU439429.2	Swine parainfluenza virus 3 isolate 81-19252_Texas-81	99%
DQ166824.1	Porcine paramyxovirus strain Texas	99%
AF178654.1	Bovine parainfluenza virus 3 strain Kansas/15626/84	98%
KJ647288.1	Bovine parainfluenza virus 3 isolate TVMDL24	94%
AB770484.1	BN-1	93%
AB770485.1	BN-CE	92%
JQ063064.1	NM 09	92%
EU277658.1	Q5592	85%

Nukleotidne sekvence HN gena domaćih sojeva virusa PI3 goveda i nukleotidna homologija njihovih sekvenci sa sekvencama drugih registrovanih sojeva navedenog virusa

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB001, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 29.

Tabela br. 29. Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB001 virusa PI3

Virus BPI3 izolovani soj SRB001
Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja virusa SRB001
CAGCTGACATTCTGGAGATGTACCTCTGGCAATCCATCCTTGGCAAGTAACCCAAAGATAAG ACTAATACCAGGTCCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAGATGGTTGTATAAGGATCC CGTCCTTCGTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTTCCAACCTTATTGTTCAAGGTTGCC AGGATATAGGGAAGTCTTATCAGGTGTTACAAATCGGGATCATCACTATAAATTCAGACCTG GTACCTGACCTAAACCCTAGAGTTACACATACTTTTAATATTGATGATAATAGAAAGTCCTG TTCTTTAGCACTACTAAATACAGATGTATATCAGTTGTGCTCAACTCCGAAAGTTGACGAAA GATCAGACTATGCATCAACAGGGATTGAAGACATCGTACTTGATATTACTAACAATGGA TTAATCATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTTGACAAACCATATGCAGCACT GTACCCATCAGTAGGACCGGGGATTTATTATAAAGGTAAGGTTATTTTTCTCGGATATGGTG GATTAGAACATGCAGAGAATGGTGATGTAAAGGGGTGATTTAAAATTCTAGGG

Sekvenca HN gena domaćeg izolovanog virusa PI3 pod oznakom SRB001, pokazala je najviši procenat nukleotidne homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835, ASD0809, SD0805, SD0811, HS9 i 12Q061) i ona je iznosila 99%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu B (Q5592) iznosila je 82%, što je prikazano u Tabeli br. 30.

Tabela br. 30. Nukleotidna homologija HN sekvence izolovanog soja SRB001

Nukleotidna homologija HN sekvence izolovanog soja SRB001 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
HQ530155.1	SD0809	99%
HQ530154.1	SD0805	99%
HQ530156.1	SD0811	99%
LC000638.1	HS9	99%
JX969001.1	12Q061	99%
EU277658.1	Q5592	82%
GU732138.1	BJ/023/08	79%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB002, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 31.

Tabela br. 31. Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB002 virusa PI3

Virus BPI3 izolovani soj SRB002
Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja virusa SRB002
CACCTGCATTCTGGAGATGTACCTCTGGCAATCCATCCTTGGCAAGTAACCCAAAGATAAGA CTAATACCAGGTCCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAGATGGTTGTATAAGGATCCC GTCCTTCGTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTTCCAACCTTATTGTTCAAGGTTGCCA GGATAGAGGGAAGTCTTATCAGGTGTTACAAATCGGGATCATCACTATAAATTCAGACCTGG TACCTGACCTAAACCCTAGAGTTACACATACTTTTAATATTGATGATAATAGAAAGTCCTGTT CTTTAGCACTACTAAATACAGATGTATATCAATTGTGCTCAACTCCGAAAGTTGACAAAAGA TCAGACTATGCATCAACAGGGATTGAAGACATCGTACTTGATATTACTAACAATGGATT AATCATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTTGACAAACCATATGCAGCACTGT ACCCATCAGTAGGACCGGGGATTTATTATAAAGGTAAGGTTATTTTTCTCGGATATGGTGGA TTAGAACATGCAGAGAATGGTGATGAATTGGGCTTATAAAAACCTACGGAG

Sekvenca HN gena domaćeg uzorka virusa PI3 pod oznakom SRB002, pokazala je najviši procenat nukleotidne homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835, SD0809, SD0805) i ona je iznosila 99%. Nukleotidna homologija sa sekvencama ostalih sojeva genotipa C (SD0811, HS9 i 12Q061) iznosila je 98%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu B (Q5592) iznosila je 82%, što je prikazano u Tabeli br. 32.

Tabela br. 32. Nukleotidna homologija HN sekvence domaćeg soja SRB002

Nukleotidna homologija HN sekvence domaćeg izolovanog soja SRB002 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
HQ530155.1	SD0809	99%
HQ530154.1	SD0805	99%
HQ530156.1	SD0811	98%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	98%
EU277658.1	Q5592	82%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB003, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 33.

Tabela br. 33. Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB003 virusa PI3

Virus PI3 izolovani soj SRB003
Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja virusa SRB003
TCGGGCCATAGACTGGAGATGTACCTCTGGCAATCCATCCTTGGCAAGTAACCCAAAGATAA GACTAATACCAGGTCCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAGATGGTTGTATAAGGATC CCGTCCTTCGTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTTCCAACCTTATTGTTCAAGGTTGC CAGGATAGAGGGAAGTCTTATCAGGTGTTACAAATCGGGATCATCACTATAAATTCAGACCT GGTACCTGACCTAAACCCTAGAGTTACACATACTTTTAATATTGATGATAATAGAAAGTCCT GTTCTTTAGCACTACTAAATACAGATGTATATCAGTTGTGCTCAACTCCGAAAGTTGACGAA AGATCAGACTATGCATCAACAGGGATTGAAGACATCGTACTTGATATTACTAACAATGG ATTAATCATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTTGACAAACCATATGCAGCAC TGTACCCATCAGTAGGACCGGGATTTATTATAAAGGTAAGGTTATTTTTCTCGGATATGGT GGATTAGAACATGGCAGAGAATGGTGATGTAATAATGGTGTTTTTAAAAAAGAGCAGAT

Sekvenca HN gena domaćeg izolovanog soja virusa PI3 pod oznakom SRB003, pokazala je najviši procenat nukleotidne homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C izolovanim iz Kine (SD0835, ASD0809, SD0805) i ona je iznosila 99%. Nukleotidna homologija sa sekvencama ostalih sojeva genotipa C (SD0811, HS9 i 12Q061) iznosila je 98%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu B (Q5592) iznosila je 82%, što je prikazano u Tabeli br. 34.

Tabela br. 34. Nukleotidna homologija domaćeg izolovanog soja SRB003 virusa PI3

Nukleotidna homologija domaćeg izolovanog soja SRB003 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
HQ530155.1	SD0809	99%
HQ530154.1	SD0805	99%
HQ530156.1	SD0811	98%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	98%
EU277658.1	Q5592	82%
GU732138.1	BJ/023/08	79%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB004, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 35.

Tabela br. 35. Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB004 virusa PI3

Virus PI3 izolovani soj SRB004 virusa PI3
Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB004 virusa PI3
ACCTGGACAATTCTGGAGATGTACCTCTGGCAATCCATCCTTGGCAAGTAACCCAAAGATAA GACTAATACCAGGTCCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAAATGGTTGTATAAGGATC CCGTCCTTCGTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTTCCAACCTTATTGTTCAAGGTTGC CAGGATATAGGGAAGTCTTATCAGGTGTTACAAATCGGGATCATCACTATAAATTCAGACCT GGTACCTGACCTAAACCCTAGAGTTACACATACTTTTAATATTGATGATAATAGAAAGTCCT GTTCTTTAGCACTACTAAATACAGATGTATATCAGTTGTGCTCAACTCCGAAAGTTGACGAA AGATCAGACTATGCATCAACAGGGATTGAAGACATCGTACTTGATATTACTAACAATGG ATTAATCATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTTGACAAACCATATGCAGCAC TGTACCCATCAGTAGGACCGGGGATTTATTATAAAGGTAAGGTTATTTTTCTCGGATATGGT GGATTAGAACATGCAGAGAATGGTGATGAAAGGGCTGACTTAAACGGGTGTCGG

Sekvenca HN gena domaćeg izolovanog soja virusa PI3 pod oznakom SRB004, imala je najviši procenat nukleotidne homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835, ASD0809, SD0805, SD0811, HS9 i 12Q061) i ona je iznosila 99%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu B (Q5592) iznosila je 83%, što je prikazano u Tabeli br. 36.

Tabela br. 36. Nukleotidna homologija HN sekvence domaćeg izolovanog soja virusa SRB004

Nukleotidna homologija HN sekvence izolovanog soja SRB004 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
HQ530155.1	SD0809	99%
HQ530154.1	SD0805	99%
HQ530156.1	SD0811	99%
LC000638.1	HS9	99%
JX969001.1	12Q061	99%
EU277658.1	Q5592	83%
GU732138.1	BJ/023/08	79%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg izolovanog soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB005, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 37.

Tabela br. 37. Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB005 virusa PI3

Virus BPI3 izolovani soj SRB005
Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB005 virusa PI3
GGACATTCTGGAGATGTACCTCTGGCAATCCATCCTTGGCAAGTAACCCAAAGATAAGACTA ATACCAGGTCCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAAATGGTTGTATAAGGATCCCGTC CTTCGTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTTCCAACCTTATTGTTCAAGGTTGCCAGGA TATAGGGAAGTCTTATCAGGTGTTACAAATCGGGATCATCACTATAAATTCAGACCTGGTAC CTGACCTAAACCCTAGAGTTACACATACTTTTAATATTGATGATAATAGAAAGTCCTGTTCTT TAGCACTACTAAATACAGATGTATATCAGTTGTGCTCAACTCCGAAAGTTGACGAAAGATCA GACTATGCATCAACAGGGATTGAAGACATCGTACTTGATATTACTAACAATGGATTAAT CATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTTGACAAACCATATGCAGCACTGTACC CATCAGTAGGACCGGGGATTTATTATAAAGGTAAGGTTATTTTTCTCGGATATGGTGGATTA GAACATGCAGAGAATGGTGATGAAAGGGCTGATTATAGAGCGCGCGG

Sekvenca HN gena domaćeg izolovanog soja virusa PI3 pod oznakom SRB005, pokazala je najviši procenat homologije sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C izolovanim u Kini (SD0835, ASD0809, SD0805) i ona je iznosila 99%. Nukleotidna homologija sa ostalim sojevima genotipa C (SD0811, HS9 i 12Q061) iznosila je 98%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu B (Q5592) iznosila je 83%, što je prikazano u Tabeli br. 38.

Tabela br. 38. Nukleotidna homologija HN sekvence izolovanog soja virusa SRB005

Nukleotidna homologija HN sekvence izolovanog soja SRB005 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
HQ530155.1	SD0809	99%
HQ530154.1	SD0805	99%
HQ530156.1	SD0811	98%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	98%
EU277658.1	Q5592	82%
GU732138.1	BJ/023/08	79%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg izoovanog virusa PI3 goveda pod oznakom SRB006, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 39.

Tabela br. 39. Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja virusa SRB006

Virus BPI3 izolovani soj SRB006 virusa PI3
Nukleotidna sekvenca HN gena izolovanog soja SRB006 virusa PI3
ATCTGACATTCTGGAGATGTACCTCTGGCAATCCATCCTTGGCAAGTAACCCAAAGATAAGA CTAATACCAGGTCCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAAATGGTTGTATAAGGATCCC GTCCTTCGTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTTCCAACCTTATTGTTCAAGGTTGCCA GGATATAGGGAAGTCTTATCAGGTGTTACAAATCGGGATCATCACTATAAATTCAGACCTGG TACCTGACCTAAACCCTAGAGTTACACATACTTTTAATATTGATGATAATAGAAAGTCCTGTT CTTTAGCACTACTAAATACAGATGTATATCAGTTGTGCTCAACTCCGAAAGTTGACGAAAGA TCAGACTATGCATCAACAGGGATTGAAGACATCGTACTTGATATTACTAACAATGGATT AATCATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTTGACAAACCATATGCAGCACTGT ACCCATCAGTAGGACCGGGGATTTATTATAAAGGTAAGGTTATTTTTCTCGGATATGGTGGA TTAGAACATGCAGAGAATGGTGATGTAATCGGGCTGGTTTTTTAAGTAGGGG

Sekvenca HN gena domaćeg soja virusa PI3 pod oznakom SRB006, pokazala je najviši procenat homologije od 99% sa sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripada genotipu C izolovanim iz Kine (SD0835, ASD0809, SD0805, SD0811) i 98% sa sojevima genotipa C izolovanim iz Japana i Koreje (HS9 i 12Q061). Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu B (Q5592) iznosila je 83%, što je prikazano u Tabeli br. 40.

Tabela br. 40. Nukleotidna homologija HN sekvence domaćeg izolovanog soja virusa SRB006

Nukleotidna homologija HN sekvence izolovanog soja SRB006 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	99%
HQ530155.1	SD0809	99%
HQ530154.1	SD0805	99%
HQ530156.1	SD0811	99%
LC000638.1	HS9	98%
JX969001.1	12Q061	98%
EU277658.1	Q5592	83%
GU732138.1	BJ/023/08	79%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB062, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 41.

Tabela br. 41. Nukleotidna sekvenca HN gena uzorka soja virusa SRB062

Virus BPI3, soj SRB062
Nukleotidna sekvenca HN gena soja SRB062 virusa PI3
ATTCCTTGAAAATTCTGGGAGATGTACCTACTGGCAATCCATCCTTGTGCAAGTAACCCAAA GATAAGACTAATACCAGGTCCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAAATGGTTGTATAA GGATCCCTGGCCTTCGTAATCAACAATTCTAATATTATGCTTTACACATTCCAATCCTTCATT GCTTCAAGTGTATGCCATGAGGTTATAGGGTAAGTCTTATCAGGTGTTACTAATCGCGGATC ATCACTATAAATTCATACCTGGTACCTGACCTAAACCTAGAGTTACTCATACTTTTAATATT GATGATAATAGAAAGTCCTGTTCTTTAGCACTACGAAATACAGATGTATATCAATTGTGCTC AACTCCGAAAGTTGACAAATGATCATACTATGCATCAACAGGGATTGAAGACATCATACTTG ATATTACTACTAACAATGGATTAATCATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTT GACAAACCATATGCAGCACTGTACCCATCAGTAGGACCGGGATTTATTATAAAGGTAAGG TTATTTTTCTCGGATATGGTGGATTAGAACATGCAGAGAAT

Sekvenca HN gena domaćeg uzorka virusa PI3 pod oznakom SRB062, pokazala je najviši procenat homologije od 95% sa sekvencom soja SD0835. Nukleotidna homologija sa ostalim sojevima genotipa C izolovanim iz Kine, Japana i Koreje iznosila je 94%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojem virusa PI3 koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 83%, što je prikazano u Tabeli br. 42.

Tabela br. 42. Nukleotidna homologija HN sekvence uzorka virusa SRB062

Nukleotidna homologija HN sekvence uzorka soja SRB062 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
HQ530153.1	SD0835	95%
HQ530155.1	SD0809	94%
HQ530154.1	SD0805	94%
HQ530156.1	SD0811	94%
LC000638.1	HS9	94%
JX969001.1	12Q061	94%
EU277658.1	Q5592	83%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) domaćeg soja virusa PI3 goveda pod oznakom SRB100, dobijena je sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 43.

Tabela br. 43. Nukleotidna sekvenca HN gena soja SRB100 virusa PI3

Virus BPI3, soja SRB 100 virusa PI3
Nukleotidna sekvenca HN gena soja virusa SRB 100
ACCCCTGACAATTTCTCGGAGATGTACCTCATGGCAATCCATCCTTGGCAAGTAACCCAAAG ATAAGACTAATACCAGGTCTAGTCTGTTAGCAGCATCTACCACTGTAAATGGTTGTATAAG GATCCCGTCCTTCTTAATCAACAATCTAATATATGCTTACACTTACAACCTTATTGTTCAAGG TTGCCATGAGATATAAGGGAAGTCTTATCAGGTGTAACAAATCGCGGATCATCACTATAAAT TCATACCTGGTACCTGACCTAAACACTATAGTTTCTCATACTTTTAATATTGATGATAATAGA AAGTCCTGTTCTTTAGCACTACGAAATACATATGTATATCAATTGTGCTCAACTCCGAAAGA TGACAAAAGATCATACTATGCATCCACAGGGATTGAAGACATCATACTTGATATTACTA ATAATGGATTAATCATCACAACAAGATTTACCAATGATAATATAACATTTGACCAACCATAT GCACCACTGTACCCATCAATACGACCGGGGATTTATTATAAAGGTAATGTTA

Sekvenca HN gena domaćeg uzorka virusa PI3 pod oznakom SRB100, pokazala je najviši procenat nukleotidne homologije od 95% sa sekvencama sojeva izolovanim u Kini (SD0835, SD0805, SD0811, SD0809). Nukleotidna homologija sa ostalim sojevima genotipa C izolovanim iz Japana i Koreje, iznosila je 94%. Nukleotidna homologija navedene sekvence F gena istog domaćeg izolovanog soja sa sojem virusa PI3 koji pripada genotipu B (Q5592) iznosila je 79%, što je prikazano u Tabeli br. 44.

Tabela br. 44. Nukleotidna homologija HN sekvence soja SRB100 virusa PI3

Nukleotidna homologija HN sekvence soja SRB100 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
<u>HQ530153.1</u>	SD0835	95%
<u>HQ530155.1</u>	SD0809	95%
<u>HQ530154.1</u>	SD0805	95%
<u>HQ530156.1</u>	SD0811	95%
<u>JX969001.1</u>	12Q061	94%
<u>LC000638.1</u>	HS9	94%
<u>EU277658.1</u>	Q5592	79%

Sekvenciranjem proizvoda RT PCR reakcije (sekvenca HN gena) referentnog soja SF4 virusa PI3 goveda, uspešno je dobijena sekvenca sa rasporedom nukleotida prikazanim u Tabeli br. 45.

Tabela br. 45. Nukleotidna sekvenca HN gena referentnog soja SF4 virusa PI3

Virus PI3, referentni soj SF4
Nukleotidna sekvenca HN gena referentnog soja SF4 virusa PI3
AGCCTGAACGAGACTGACGAGTTATCTGGTAACCCATATCTAACAAGTTACACTAAGATAAG GTTAATACCAGGGCCAGGTTTATTAGCAACATCTACTACAGTAAATGGCTGTATTAGAATCC CATCGTTAGCAATCAATCATTTAATCTACGCTTACACCTCTAATCTTATCACCCAGGGCTGTC AAGGTATAGGGAAATCTTACCAAGTACTACAAATAGGGATAATTACTATAAAATTCGGACCTA GTACCTGATTTAAATCCCAGAGTCACACATACATTTAATATTGATGATAATAGGAAATCTTG CTCTCTGGCACTATTGAATACAGATGTTTATCAGTTATGCTCAACACCAAAGTTGATGAGA GATCCGATTATGCATCAACAGGTATTGAGGATATTGTACTTGACATTGTCTACTAATAATGGA TTAATTATAACAACAAGGTTTACAAATAATAATAACTTTTGATAAACCGTATGCAGCATT GTATCCATCAGTAGGACCAGGAATCTATTATAAGGGTAAAGTTATATTTCTCGGATATGGAG GTCTAGAGCATGAAGAAAACGGAGACGTAATATGTATCCTGGTTTTTTTTTAAAAAAAAA

Sekvenca HN gena referentnog SF4 soja virusa PI3, pokazala je najviši procenat nukleotidne homologije od 99% sa sekvencama sojeva 81-19252_Texas-81, DIO i Shipping Fever koji pripadaju genotipu A virusa PI3 goveda. Nukleotidna homologija sa sojem NM09 iznosila je 92%, dok je sa sojevima BN1 i BN-CE homologija iznosila 91%, što je prikazano u Tabeli br. 46.

Tabela br. 46. Nukleotidna homologija HN sekvence referentnog soja SF4

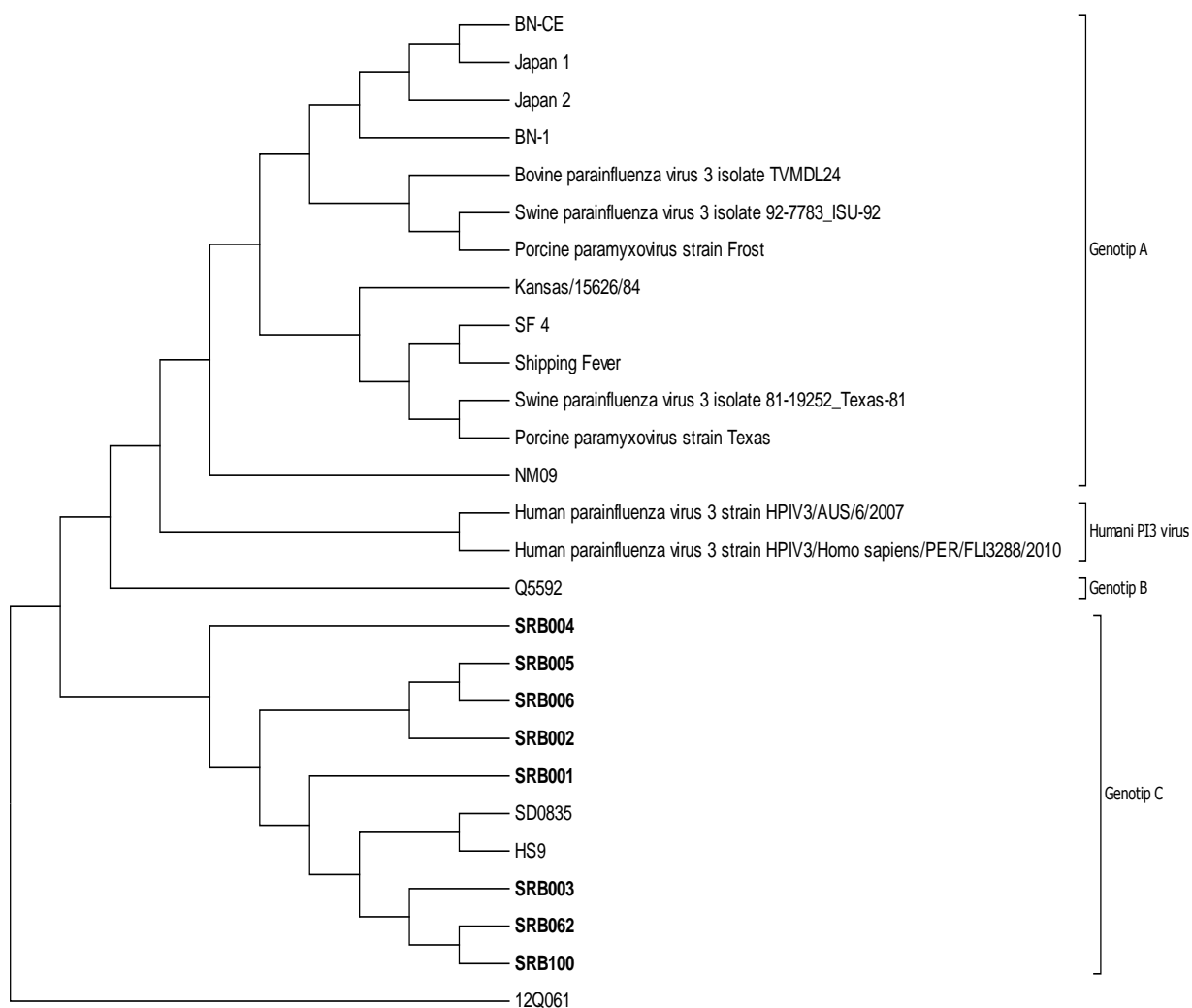
Nukleotidna homologija HN sekvence soja SF4 virusa PI3		
Registarski broj izolata	Naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
EU439429.2	81-19252_Texas-81	99%
DQ839608.1	DIO	99%
AF178655.1	Shipping Fever	99%
AF178654.1	Kansas/15626/84	97%
JQ063064.1	NM09	92%
U31671.1	cds	92%
EU439428.2	92-7783_ISU-92	91%
AB770484.1	BN-1	91%
Y00114.1	Japan	91%
AB770485	BN-CE	91%

FILOGENETSKA STABLA SA POZICIJAMA OSAM DOMAĆIH SOJEVA VIRUSA PI3 GOVEDA

Položaj domaćih sojeva virusa PI3 goveda na filogenetskom stablu na osnovu nukleotidnih sekvenci F gena

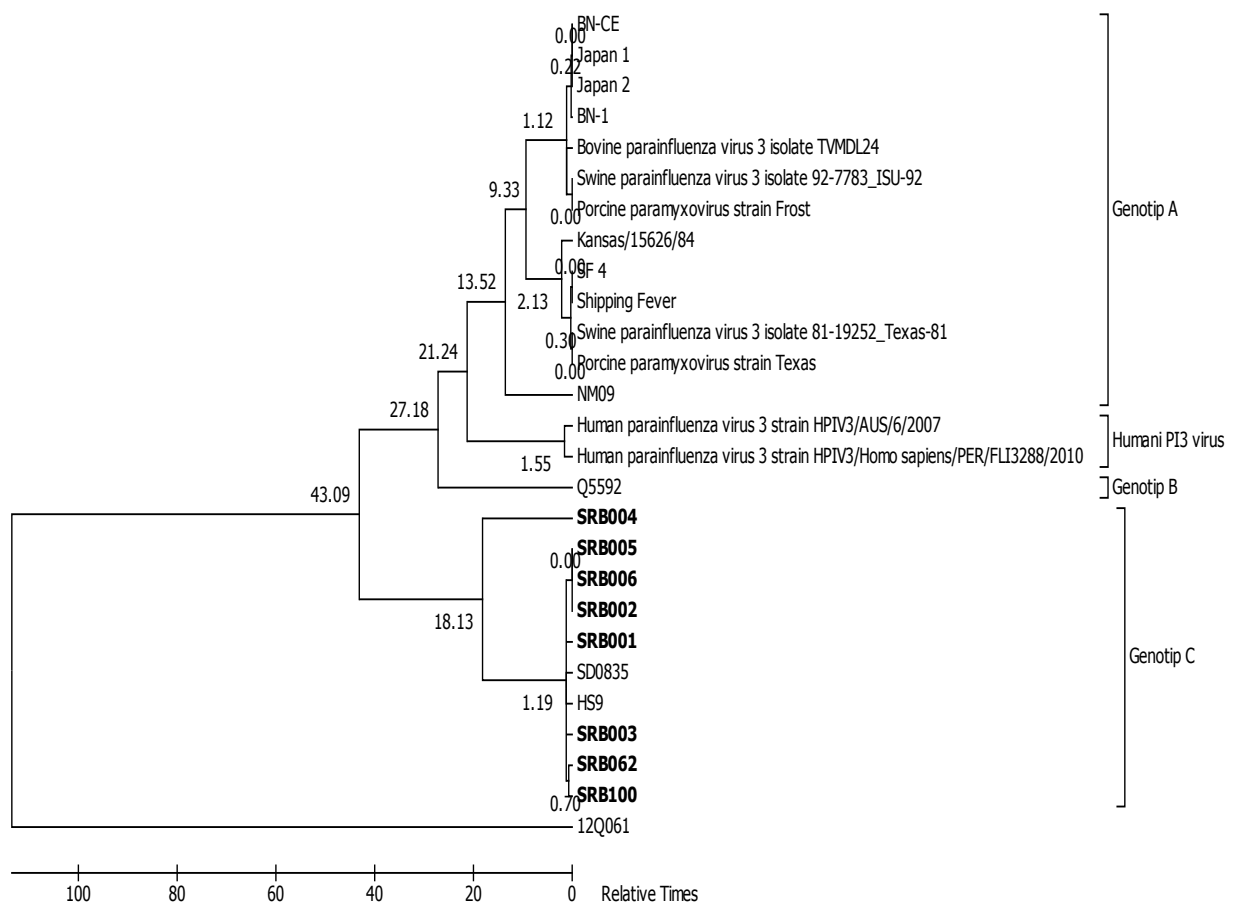
Upotrebom programa MEGA 6, uspešno je formirano filogenetsko stablo na osnovu F sekvenci domaćih sojeva virusa PI3, kao i sekvenci svih sojeva virusa PI3 čija je nukleotidna homologija prema sekvencama domaćih sojeva bila prikazana u BLAST programu za poređenje sekvenci. U izradi filogenetskog stabla korišćen je algoritam "Maximum parsimony method".

Uvidom u filogenetsko stablo virusa PI3, na osnovu sekvenci F gena, domaći sojevi virusa pozicionirani su u sojeve genotipa C u kojima se nalaze kineski izolovani soj virusa PI3 koji pripada genotipu C (SD0835), kao i soj genotipa C virusa PI3 koji je izolovan u Japanu (HS9). Domaći soj virusa PI3 pod oznakom SRB004 je najrazličitiji među domaćim sojevima, a zatim soj SRB001 koji se takođe nalazi na posebnoj grani filogenetskog stabla u odnosu na ostale domaće sojeve. Domaći soj virusa PI3 pod oznakom SRB003 nalazi se na sporednoj grani od sojeva SRB062 i SRB100, koji su međusobno dosta slični, dok se soj SRB002 nalazi na sporednoj grani od sojeva SRB005 i SRB006, koji su takođe međusobno slični (Slika br. 15).



Slika br. 15. Filogenetsko stablo sojeva virusa PI3 na osnovu sekvence F gena (Algoritam: "Maximum parsimony method", program MEGA 6)

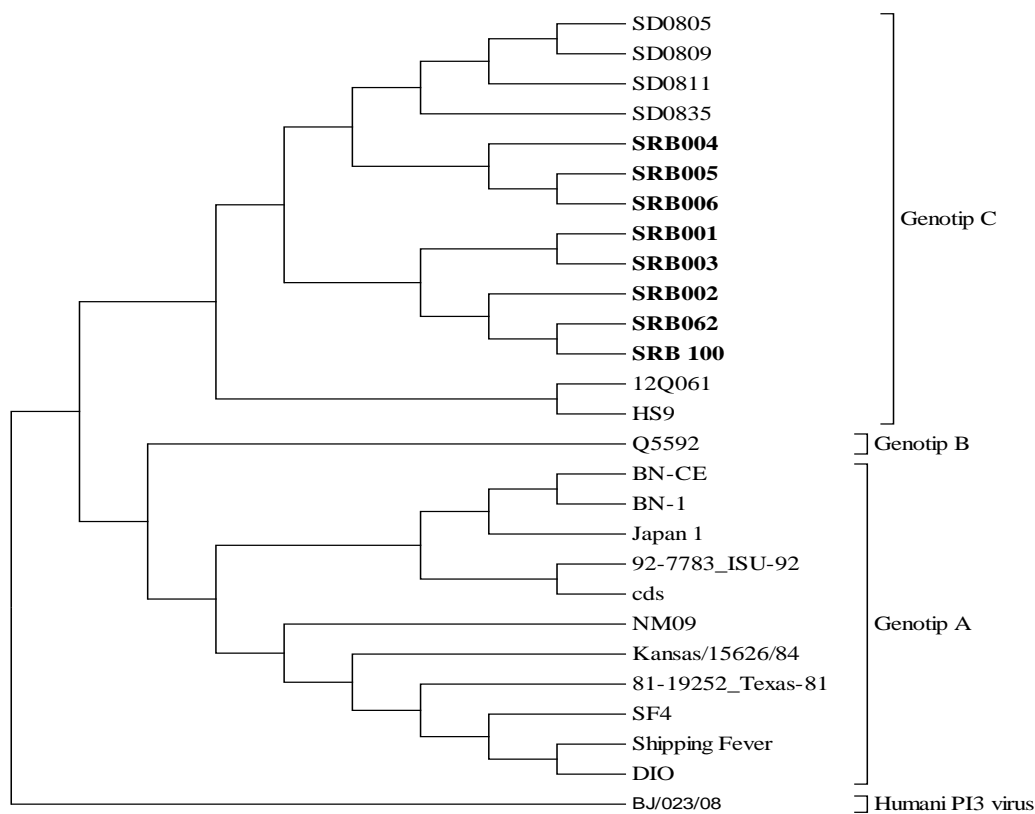
Na filogenetskom stablu koje prikazuje vreme grananja, odnosno nastanka sojeva virusa PI3 (Slika br. 16), domaći izolovani soj SRB004 je najstariji, dok su najmlađi domaći izolovani sojevi pod oznakama SRB005, SRB006 i SRB002.



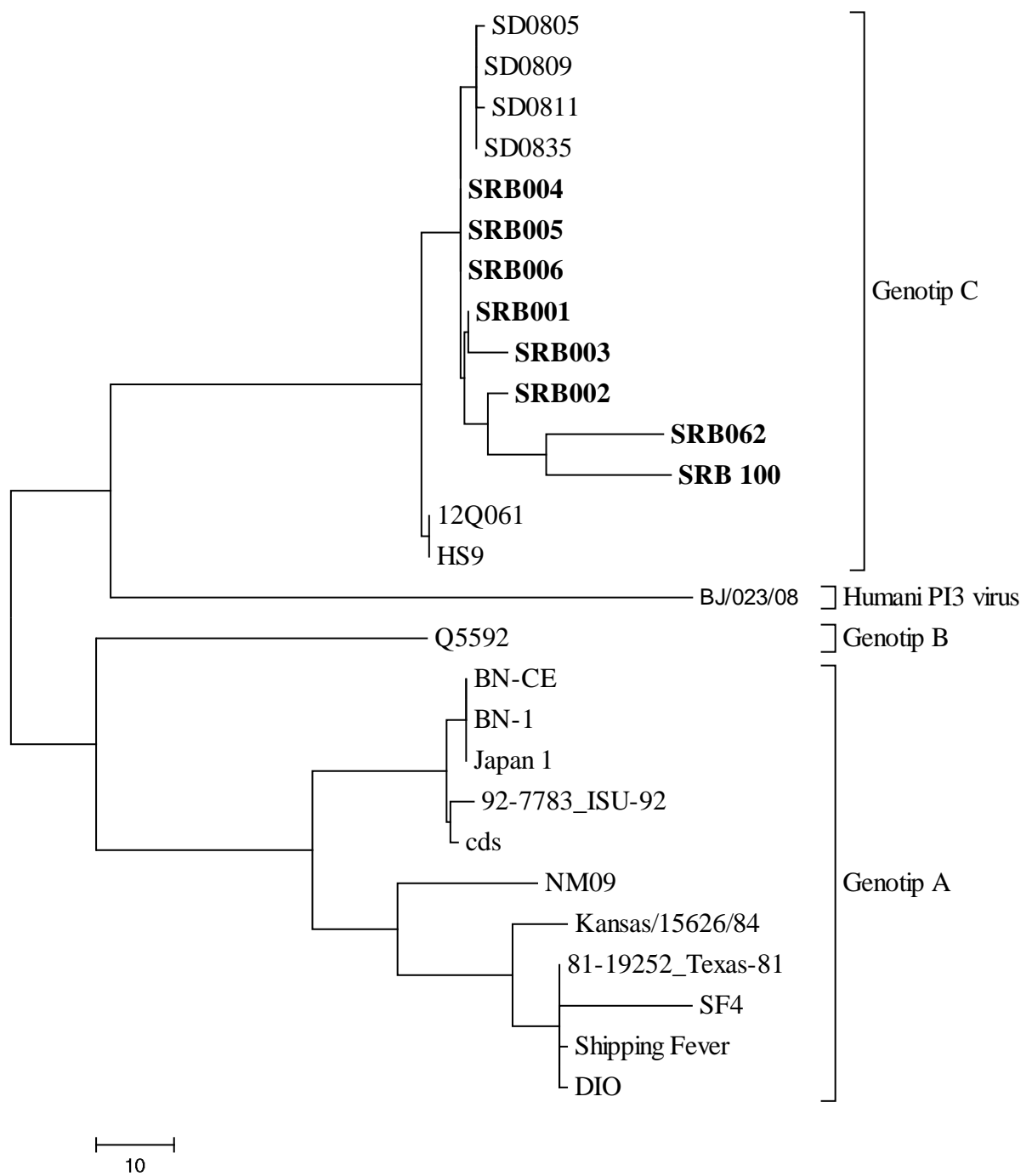
Slika br. 16. Filogenetsko stablo izolovanih sojeva virusa PI3 na osnovu sekvence F gena sa vremenom evolutivnog razdvajanja (Algoritam: “Maximum parsimony method”, program MEGA 6)

Položaj domaćih izolovanih sojeva virusa PI3 goveda na filogenetskom stablu na osnovu nukleotidnih sekvenci HN gena

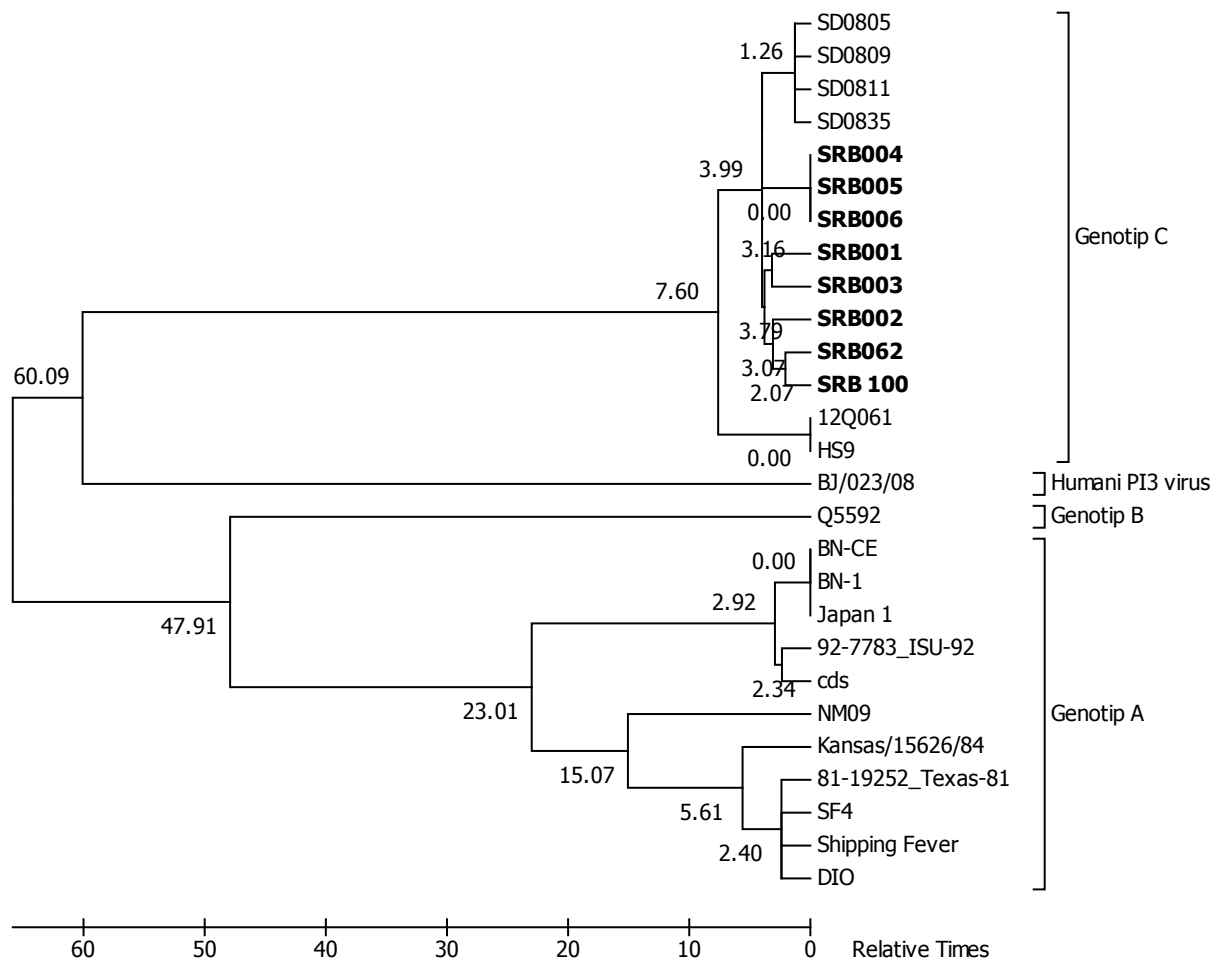
Na filogenetskom stablu koje je sastavljeno na osnovu HN gena virusa PI3 (Slika br. 17), svi domaći izolovani sojevi virusa svrstani su u genotip C i to između sojeva izolovanih u Kini i sojeva izolovanih u Koreji i Japanu.



Slika br. 17. Filogenetsko stablo izolovanih virusa PI3 goveda na osnovu sekvence HN gena (Algoritam: “Maximum parsimony method”, program MEGA 6)



Slika br.18. Filogenetsko stablo sojeva virusa PI3 goveda na osnovu sekvence HN gena sa vremenom evolutivnog razdvajanja sojeva



Slika br. 19. Filogenetsko stablo izolata virusa PI3 goveda na osnovu sekvence HN gena sa vremenskim distancama evolutivnog grananja

(Algoritam: "Maximum parsimony method", program MEGA 6)

6.DISKUSIJA

Od nazalnih briseva 119 goveda sa respiratornim simptomima, uzorkovanih na teritoriji Republike Srbije u intervalu 2013-2014. godine, virus PI3 izolovan je iz šest uzoraka suspektnog materijala, što predstavlja 5,04%. Inokulumi poreklom od 11 uzoraka ispitivanog materijala doveli su do pojave citopatogenog efekta u kulturi tkiva i identifikacijom virusa metodom serumneutraizacije i direktne imunofluorescencije, utvrđeno je da šest izolovanih sojeva pripada virusu PI3, dok kod uzoraka ispitivanog materijala poreklom od ostalih pet inokulisanih ćelijskih linija, nije ustanovljeno prisustvo navedenog virusa. Nizak procenat uspešnosti izolacije virusa PI3 često može nastati zbog mogućih grešaka u samom postupku izolacije. Niz parametara može dovesti do smanjenog broja pozitivnih rezultata u izolaciji virusa, kao što su vreme uzimanja brisa u odnosu na početak pojave respiratornih simptoma, prisustvo ili odsustvo medijuma u brisu, vreme koje je proteklo od uzimanja brisa do donošenja uzorka u laboratoriju, temperatura i procenat vlage u toku transporta, način skladištenja materijala u laboratoriji, obrade briseva za inokulaciju u kulture tkiva, izbora ćelijske linije za izolaciju, zatim prisustva već inaktivisanog virusa u brisu, vremena i uslova inkubacije, kao i broja urađenih ili propisanih pasaža, ukoliko nije došlo do pojave citopatogenog efekta posle prve pasaže suspektnog materijala. Virus PI3 može se izolovati iz nosnog brisa u intervalu od prvog do sedmog, a ređe do devetog dana od početka simptoma. Posle navedenog vremenskog interval, izolacija je retko uspešna, iako je infekcija virusom PI3 kao primarnim agensom bolesti bila prisutna (**Crandel i sar. 1974; Oem i sar. 2013**). Mnogi autori su potvrdili navedenu činjenicu tokom dugogodišnjeg rada na izolaciji virusa PI3 i posle veštačke infekcije životinja u eksperimentalnim uslovima. Treba napomenuti da se virus PI3 u manjem broju slučajeva može izolovati i iz testisa bika, vaginalnih briseva i mleka obolelih krava.

Samo u retkim slučajevima postoje egzaktni anamnestički podaci o tome koliko je dana prošlo od prve pojave simptoma poremećaja respiratornog trakta, odnosno prvih simptoma kašlja, otežanog disanja ili nazalne hipersalivacije, do momenta uzorkovanja nosnih briseva. Iako je tokom transporta briseva do laboratorije ispoštovan

princip hladnog lanca, uvidom u literaturu može se doći do podataka o izuzetnoj osetljivosti virusa PI3 goveda na uticaj procenta vlage i temperature kojima je virus izložen u nosnom brisu. Za nekoliko sati na temperaturi od 37°C pri 90% ili višem procentu vlage, titar virusa u brisu opada i do $5 \log_{10}$ u odnosu na isti uzorak koji je sve vreme bio na temperaturi frižidera i na suvom (**Elezhaey i sar 1979.**). Ova činjenica je od značaja imajući u vidu da se metodom izolacije virusa može izolovati virus iz ispitujućeg materijala samo ako je isti očuvao aktivnost. Ukoliko je došlo do inaktivacije virusa, izolacija će dati negativan rezultat i potvrda prisustva virusa u ispitujućem materijalu se mora uraditi metodama koje mogu detektovati i inaktivisani virus, odnosno njegov genom (primer: metoda RT PCR).

Niske vrednosti titra virusa i njegova slaba vitalnost, kao i vreme potrebno za adaptaciju na ćelijsku liniju, mogu biti uzrok tome što u velikom broju slučajeva izolacija virusa PI3 goveda uspeva tek u drugoj ili trećoj pasaži (**Oem i sar 2013**). Ako je potrebno izvršiti razređenje početnog materija zbog povremeno prisutne citotoksičnosti inokulata na ćelijskoj liniji, tada se verovatnoća izolacije virusa smanjuje. Za filtraciju inokulata za izolaciju na ćelijskoj liniji, najčešće su u upotrebi filteri veličine pora od 200 i 400 nm. Za izolaciju virusa PI3 mogu se upotrebiti samo filteri sa dijametrom pora od 400 nm. Filteri sa manjim promerom koriste se samo za pripremu uzoraka kada se očekuje izolacija Parvovirusa, Pikornavirusa ili Cirkovirusa, čiji je dijametar virusne čestice manji od 200 nm.

Uspešnost izolacije zavisi i od još nekih faktora kao što su prijemčivost ćelijske linije za virus, odnosno pravilan izbor ćelijske linije. Uvidom u literaturne podatke, većina autora je za izolaciju virusa PI3 goveda koristila ćelijsku liniju MDBK (Madin Darby Bovine kidney) (**Crandel i sar, 1974; Oem i sar, 2013; Wen i sar, 2012**), a jedan broj stručnjaka koristio je i ćelijsku liniju VERO, pileće embrione ili primarnu kulturu tkiva embriona teleta. U ovom radu, za izolaciju virusa PI3 korišćena je ćelijska linija MDBK. Prijemčivost ćelijske linije prema virusu PI3 treba uvek proveriti umnožavanjem referentnog soja virusa i/ ili izolovanog i identifikovanog soja virusa PI3 u navedenoj ćelijskoj liniji (pozitivna kontrola). U doktorskoj disertaciji korišćen je SF4 soj virusa PI3 goveda kao referentni soj tokom izolacije virusa i on je doveo do citopatogenog efekta u prvoj pasaži. Većina autora koristila je upravo soj SF4 virusa PI3

goveda, kao referentan u svojim istraživanjima. Domaći sojevi izolovanih virusa PI3 goveda, izazvali su pojavu citopatogenog efekta u inokulisanim ćelijskim linijama tek u trećoj pasaži, što uvidom u literaturne podatke nije redak slučaj (**Oem i sar 2013**).

Ispitujući domaće sojeve izolovanih virusa metodom virusneutralizacije sa specifičnim hiperimunim serum protiv virusa PI3 goveda, neutralizacija virusa bila je pozitivna kod šest izolovanih sojeva pomenutog virusa koji su doveli do pojave citopatogenog efekta, od ukupno 11 ispitivanih uzoraka prethodno inokulisanih u ćelijsku liniju MDBK i ispitivanih na prisustvo virusa PI3. Ispitivanjem ostalih pet uzoraka suspektog materijala metodom virusneutralizacije, nije utvrđeno prisustvo virusa PI3 goveda. Titar virusneutralizacije domaćih izolovanih sojeva virusa PI3 kretao se u intervalu od 1:8 ($3 \log_2$) do 1:16 ($4 \log_2$), dok je najviša vrednost titra virusneutralizacije od 1:64 odnosno ($6 \log_2$) ustanovljena kod referentnog soja virusa SF4, korišćenog za proizvodnju hiperimunog seruma. Ovakav nalaz u saglasnosti je sa drugim autorima (**Abinanti i sar. 1961; Neil i sar. 2015**), koji su dobijali za $3 \log_2$ viši stepen neutralizacije sa izolovanim virusom koji je korišćen kao antigen za proizvodnju hiperimunog seruma, u poređenju sa stepenom neutralizacije virusa ostalih ispitivanih izolovanih sojeva virusa koji propadaju drugoj genotipskoj grupi.

Rezultati testa virusneutralizacije potvrđeni su metodom direktne imunofluorescencije (DIF) kojom je dokazano prisustvo virusnih antigena PI3 kod šest od ukupno 11 ispitivanih uzoraka nosnih briseva goveda, posle njihove prethodne inokulacije u ćelijsku liniju MDBK i razvoja citopatogenih promena. Za metodu direktne imunofluorescencije korišćeni su izolovani virusi čiji je citopatogeni efekat obuhvatio maksimum 50% ćelija. Kako se za DIF koristi reagens čija je aktivna supstanca monoklonsko antitelo protiv virusa PI3 goveda vezanih za fluoresceinizotiocijanat, svaki virus sa nespecifičnim citopatogenim efektom koji je izazvan drugim virusom, dao je negativan nalaz. Na ovaj način se isključuju materijali u kojima je bio prisutan bilo koji drugi virus koji može dovesti do pojave citopatogenog efekta na ćelijskoj liniji MDBK. Ćelijska linija MDBK vrlo često je u upotrebi za izolaciju virusa upravo zbog širokog spektra prijemčivosti za različite viruse goveda, ali i viruse drugih životinjskih vrsta. Ova osobina MDBK ćelijske linije dovodi do pojave citopatogenog efekta izazvanog velikim brojem različitih virusa, pa je potvrda izolacije

specifičnog virusa drugom dijagnostičkom metodom neophodna. Citopatogeni efekat virusa PI3 goveda je relativno spor pa brži CPE nekih drugog virusa koji se mogu naći u istom ispitujućem materijalu, može maskirati prisustvo PI3 virusa i dovesti do lažno negativnog nalaza (primer je herpes virus goveda 1 - virus IBR IPV koji može biti prisutan u istom ispitujućem materijalu i dovesti do citopatogenog efekta na kulturi tkiva, pre razvoja i razmnožavanja virusa PI3 u ćelijama).

Metodom direktne imunofluorescencije je, u ćelijskim linijama MDBK pozitivnim na prisustvo virusa PI3, ustanovljena pojava jasno žutozelenih fluorescirajućih inkluzija i to prvo u citoplazmi, a kasnije i u jedrima inficiranih ćelija, sa pojavom sincicijuma koji izaziva navedeni virus. Svi izolovani sojevi virusa PI3 su doveli do pojave sincicijuma sa pretežno 2-3 jedra u ćelijama, dok je referentni soj stvarao veći broj sincicijuma sa 4 ili više jedara, u istom vremenskom intervalu inkubacije od momenta inokulacije.

Svih šest izolovanih sojeva virusa PI3 ispitivano je metodom RT PCR radi identifikacije njihovih genoma. Proizvod RT PCR reakcije bili su fragmenti DNK koji su ujedno predstavljali i polazni material za sekvenciranje dela genoma izolovanih sojeva virusa PI3, odnosno njihovu molekularnu karakterizaciju.

Naknadno je izvršeno ispitivanje i svih uzoraka nosnih briseva iz kojih, metodom izolacije virusa posle inokulacije na ćelijskoj liniji MDBK, nije ustanovljeno prisustvo virusa PI3, niti pojava citopatogenih promena, primenom metode reverzne transkripcije sa lančanom metodom polimeraze - RT PCR, u cilju direktne detekcije virusa u uzorcima suspektnog materijala. Ova analiza urađena je zbog činjenice da metoda RT PCR može dokazati i prisustvo inaktivisanog virusa u ispitujućem materijalu, bez njegove prethodne inokulacije u ćelijske linije radi izolacije virusa.

Kod dva ispitana uzorka nosnih briseva koji su bili negativni na prisustvo virusa PI3 goveda, posle njihove inokulacije u ćelijsku liniju MDBK, izvršena je detekcija pomenutog virusa primenom metode RT PCR, što ukazuje da se najverovatnije radilo o uzorcima u kojima je bio prisutan inaktivisani virus PI3 goveda, bez sposobnosti umnožavanja i izazivanja citopatogenih promena u inokulisanoj ćelijskoj liniji. Navedeni uzorci imali su oznake SRB100 i SRB062. Metoda RT PCR izvođena je uz

korišćenje prajmera za konzervisani deo F gena virusa PI3, pri čemu su dobijeni proizvodi RT PCR reakcije od 400 bp.

Izvršena je zatim i druga RT PCR reakcija sa izolovanom (ekstrahovanom) RNK virusa PI3 goveda naših izolovanih sojeva virusa i njihovih genoma, sa prajmerima za njihov HN gen, koji kodira sintezu hemaglutininsko-neuraminidaznog proteina spoljašnjeg virusnog omotača, s obzirom na to da je bilo potrebno izvršiti i sekvenciranje dela pomenutog virusnog gena. Ispitivanjem svih osam uzoraka suspektnog materijala navedenom metodom, ustanovljeno je prisustvo genoma virusa PI3, a dobijeni proizvod RT PCR reakcije bio je fragment DNK koji je sadržavao oko 647 bp.

Osam proizvoda RT PCR reakcije sa fragmentima za F gen (400 bp) i osam proizvoda reakcije sa prajmerima za HN gen (647 bp), prečišćeno je komercijalnim kitom Qiagen, prema uputstvu proizvođača, i na taj način proizvodi su pripremljeni za sekvenciranje. Sekvenciranje je urađeno metodom po Sangeru. Metoda direktnog sekvenciranja po Sangeru, smatra se zlatnim standardom za sekvenciranje uprkos činjenici da je u upotrebi već četvrta generacija sekvenciranja koje se bazira na potpuno različitim i novim tehnologijama (**Gužvić i sar. 2013**). Sekvenciranje koje je izvršeno uz korišćenje prajmera za F gen virusa PI3, obavljeno je na Institutu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, dok je sekvenciranje proizvoda PCR reakcije, dobijenih sa prajmerima za HN gen navedenog patogena, uslužno urađeno u kompaniji Makrogen iz Amsterdama (Holandija), primenom iste metode direktnog sekvenciranja po Sangeru. Poznato je da, pored mogućnosti mešanih infekcija sa dva ili više sojeva u samom laboratorijskom radu, može doći do unakrsnih kontaminacija koje dodatno komplikuju sekvenciranje, jer se u tom slučaju ne može precizno pozicionirati svaki nukleotid zbog preklopljenih pikova nukleotida različitih sojeva na elektroforegramu, što onemogućava dobijanje sekvenci sa očekivanim rasporedom nukleotida za prethodno navedene gene virusa PI3. Dobijene sekvence poređene su sa ekvivalentnim sekvencama iz Svetske baze gena, uz primenu BLAST softvera, ubacivanjem naših sekvenci u program za dobijanje nukleotidne homologije. BLAST program je softver koji omogućava poređenje rasporeda nukleotida ispitivane sekvence sa ostalim sličnim

sekvencama koje su registrovane u bazi gena i pokazuje procenat međusobne nukleotidne homologije.

Nukleotidna homologija sekvence F gena domaćih uzorka virusa PI3, pokazala je najviši procenat nukleotidne homologije sa sojevima koji su izolovani u Kini i koji pripadaju genotipu C. Nešto je niži nivo nukleotidne homologije domaćih sojeva sa sojevima genotipa C izolovanim iz Japana i Koreje, iako je i on iznosio preko 90%. Znatno je niži nivo nukleotidne homologije F sekvence domaćih virusa PI3 sa sojevima virusa koji pripadaju genotipu A i genotipu B.

Sekvenca F gena referentnog soja SF4 virusa PI3, značajno se razlikovala po svojoj nukleotidnoj homologiji od domaćih izolovanih sojeva navedenog patogena, što je dokaz njegove pripadnosti drugoj genotipskoj grupi, u odnosu na domaće sojeve izolovanog virusa PI3. Referentni soj SF4 je najviši stepen homologije od 99% imao sa sojevima Shipping fever, Texas-81 i Kansas 15626/8, koji pripadaju genotipu A. Njegova sličnost sa sekvencama izolovanih sojeva i BN-CE i NM09 genotipa A, iznosila je 92%, a sa sojem Q5592 koji pripada genotipu B, bila je oko 80%.

U rezultatima ispitivanja nukleotidne homologije sekvenci HN gena domaćih sojeva virusa PI3, zapaža se najviši stepen nukleotidne homologije sa odgovarajućim sekvencama sojeva virusa PI3 koji pripadaju genotipu C, koja je iznosila preko 95%, dok je nukleotidna homologija sa sojevima koji pripadaju genotipu A i B bila znatno niža i iznosila je najviše 83%.

Sekvenca HN gena referentnog virusa PI3 (soj SF4), znatno se razlikovala od sekvenci domaćih sojeva izolovanih virusa i imala je najviši stepen nukleotidne homologije od 99% sa sojevima Shipping fever, Texas 81 i DIO, koji pripadaju genotipu A. Nukleotidna homologija sa sojem Kansas 15626/84 koji pripada takođe genotipu A, iznosila je 97%, dok se u odnosu na ostale sojeve virusa PI3 genotipa B i C, nukleotidna homologija kretala u intervalu od 80 do 82%. Dobijeni rezultati potvrdili su pripadnost referentnog soja SF4 genotipu A, što je ustanovljeno i na osnovu rezultata upoređivanja nukleotidnih sekvenci njihovih F gena.

Posmatrajući nukleotidnu homologiju HN sekvence referentnog soja, dolazimo do zaključka da SF4 soj ne spada u istu genotipsku grupu u kojoj se nalaze domaći

sojevi izolovanih virusa PI3 goveda. Zbog visokog nivoa nukleotidne homologije sa nekim sojevima izolovanih virusa PI3 svinja, treba naglasiti da su sojevi Texas 81 i ISU92, primarno izolovani iz svinja u Sjedinjenim Američkim Državama, prijavljeni u bazi gena kao sojevi virusa PI3 izolovani iz populacije svinja. Naknadnim molekularnim karakterizacijama navedenih sojeva, ispitivanjem njihovih nukleotidnih sekvenci, kao i na osnovu rezultata izvođenja bioloških ogleda veštačke infekcije na teladima, dokazano je da je reč o virusu PI3 goveda (**Neill i sar. 2015**). Navedeni sojevi, iako izolovani iz svinja, nikad nisu uspevali da izazovu pojavu simptoma i kliničku sliku oboljenja kod svinja posle infekcije virusom PI3, dok su u biološkim ogledima kod teladi doveli do klinički manifestnog oboljenja. Molekularna karakterizacija takođe je dokazala pripadnost soja Texas 81 sojevima virusa PI3 goveda, jer je sa njima imao najviši stepen nukleotidne homologije. Zahvaljujući primeni molekularne nukleotidne karakterizacije, omogućeno je utvrđivanje pripadnosti sojeva virusa PI3 određenom genotipu, kao i njihova patogenost za određene životinjske vrste, što je potvrđeno i rezultatima biološkog ogleda sa izvođenjem veštačke infekcije prijemljivih jedinki navedenim patogenom.

Uvidom u tabele koje pokazuju nukleotidnu homologiju F i HN sekvence domaćih izolovanih sojeva virusa sa sekvencama prijavljenih i registrovanih sojeva iz baze gena, može se zaključiti da su svi domaći sojevi virusa najbliži sojevima koji pripadaju genotipu C, i to sojevima virusa PI3 goveda iz Kine. Nešto niži nivo homologije ustanovljen je kod naših sojeva virusa sa sojevima iz Koreje, koji takođe pripadaju genotipu C pomenutog virusa. Jasno je vidljiva signifikatna razlika u nivou nukleotidne homologije sekvenci naših izolovanih sojeva sa sekvencama sojeva koji pripadaju genotipu A virusa PI3 goveda koji su izolovani u Japanu, Kini i Sjedinjenim Američkim Državama. Najniži stepen nukleotidne homologije domaći sojevi virusa PI3 ispoljili su u poređenju sa sojem genotipa B iz Australije, pod oznakom Q5592 čiji je genom u celosti sekvenciran.

Postavljanje naših izolovanih sojeva na filogenetsko stablo izolovanih virusa PI3 goveda, izvršeno je korišćenjem programa MEGA 6.0. i upotrebom algoritama "Maximum Parsimony Method". Veliki broj autora koristio je isti algoritam (**Almeida Vaucher i sar. 2011**), ali su upotrebljavali program MEGA 4.0. verziju, koja je u tom

momentu bila dostupna. Program MEGA 6.0. predstavlja isti program kao i MEGA 4.0, ali moderniju (apdejtovanu) verziju iz 2015. godine, koja nam je bila dostupna. Algoritmom za filogenetsko stablo obuhvaćeno je 27 sojeva virusa PI3 i to onih koji su u BLAST softveru NCBI baze gena dobijeni kao sekvence koje su najbližije sekvencama domaćih izolovanih sojeva virusa. Posmatrajući raspored domaćih sojeva na filogenetskom stablu napravljenom prema sekvencama F gena, potvrđeni su rezultati nukleotidne homologije koji su dobijeni u BLAST programu banke gena (NCBI). Svi domaći izolovani sojevi virusa svrstani su na grani na kojoj se nalaze sojevi koji pripadaju genotipu C. Uvidom u filogenesko stablo, na osnovu sekvence F gena koja pokazuje relativnu vremensku distancu nastajanja određenih sojeva, može se zaključiti da je izolovani soj SRB004 najstariji od svih naših domaćih sojeva virusa PI3 goveda. Položaj izolovanog soja SRB004 virusa na filogenetskom stablu ne predstavlja iznenađenje, s obzirom na to da je on pokazao najviši stepen nukleotidne divergencije prema ostalim izolovanim sojevima genotipa C, od svih domaćih sojeva virusa PI3. Nešto kasnije su se izdvojili sojevi SRB003, SRB062 i SRB100, dok su poslednji izdvojeni domaći sojevi virusa PI3 goveda pod oznakama SRB001, SRB002, SRB005 i SRB006, koji su se na filogenetskom stablu izdvojili u slično vreme kada i japanski soj BN-CE i američki soj SF4.

Uvidom u filogenetsko stablo sojeva virusa PI3 goveda, napravljenog na osnovu sekvence HN gena, može se zaključiti da svi domaći izolovani sojevi virusa PI3 goveda pripadaju genotipu C. Domaći sojevi virusa smešteni su između kineskih referentnih sojeva genotipa C (SD0805, SD0809, SD0811 i SD0835) sa jedne strane, i japanskog soja (HS9) i korejskog soja (12Q061) sa druge strane, sa kojima čine posebnu granu filogenetskog stabla koja formira genotipsku grupu C.

Visoka nukleotidna homologija sa sojevima virusa PI3 iz zemalja velike udaljenosti, već duži niz godina nije iznenađenje. Autori iz Argentine uradili su sekvenciranje domaćih sojeva virusa PI3 goveda i došli do zaključka da neki od njih pripadaju vrlo retkom genotipu B, koji je do tog momenta bio prisutan samo na teritoriji Australije. Autori iz Kine godinama su imali rezultate o prisustvu samo sojeva iz genotipa C na svojoj teritoriji. **Večerov i sar. 2003.** su, prilikom rada na molekularnoj karakterizaciji sojeva virusa PI3 iz Rusije, ustanovili da je najveća podudarnost ruskih

sojeva sa američkim sojevima Kansas i SF4, dok je manji broj sojeva sličan japanskim sojevima. Svi ruski sojevi virusa PI3 pripadaju genotipu A i na teritoriji Rusije nisu prisutni sojevi iz Kine i Koreje koji pripadaju genotipu C. Naknadnim sekvenciranjem novih i starih izolovanih sojeva ustanovili su da već godinama na teritoriji Rusije imaju prisutne sojeve virusa PI3 kod goveda, koji pripada genotipu A i koji najviši stepen homologije ispoljavaju u odnosu na američke sojeve. **Niell i sar. 2015.** izvršili su molekularnu karakterizaciju više od 20 sojeva virusa PI3 izolovanih sa teritorije Sjedinjenih Američkih Država. Do tog momenta u SAD bili su registrovani jedino sojevi koji pripadaju genotipu A. Navedeno istraživanje dokazalo je dugogodišnje prisustvo (oslanjajući se na vreme izolacije virusa) sojeva sve tri genotipske grupe A, B i C na teritoriji SAD. Neki ispitani sojevi u SAD imali su homologiju od 99% sa kineskim sojevima virusa PI3 koji pripadaju genotipu C. Autori iz Saudijske Arabije su izvršili sekvenciranje domaćih sojeva humanog virusa PI3 kod ljudi i ustanovili da su isti po svom genomu mnogo sličniji sojevima izolovanim na Dalekom istoku, nego sojevima izolovanim iz zemalja u okruženju (**Almajhdi i sar. 2012**). Dobijeni rezultati ispitivanja nukleotidne homologije potvrdili su da je ona najizraženija između domaćih sojeva i sojeva virusa PI3 iz dalekih zemalja.

U ovoj disertaciji korišćeni su prajmeri iz konzerviranog dela F i HN gena genoma virusa PI3 goveda, koji je i danas u najširoj upotrebi kod najvećeg broja autora. **Horwood i sar. (2008)** koristili su prajmere za sekvencu M gena koji kodira sintezu M (matriksnog) proteina i kao rezultat dobili samo 50% uspešnosti u dokazivajnu prisustva genoma virusa PI3, prethodno dokazanih drugim virusološkim metodama. Ustanovili su da prajmeri koje su koristili nisu kodirali konzervirani deo M gena i nisu bili pogodni za PCR reakciju, a samim tim ni za sekvenciranje. U svom radu o validaciji PCR metode **Charlton et al. (2002)** ukazuju da je za specifičnost PCR reakcije najvažniji izbor prajmera koji mora biti iz konzerviranog dela genoma, tj. gena virusa. **Zhu i sar. (2011.)** su, definisanjem nukleotidne sekvence gena koji kodira sintezu M proteina virusa, izvršili genotipizaciju četiri soja virusa PI3 izolovanih na teritoriji Kine i ustanovili sličnost nukleotidnih sekvenci ovih izolovanih sojeva virusa sa sekvencama sojeva navedenog virusa izolovanih na teritoriji Australije.

Najmanja nukleotidna divergencija u rasporedu jedinog nukleotida koja se otkrije u nukleotidnoj homologiji između dva soja izolovanog virusa PI3, može da bude

od velikog značaja za nastanak novog soja virusa jer može dovesti do sinteze drugih vrsta aminokiselina, što ima za posledicu i promene u strukturi virusnih proteina, odnosno njihovih antigena. Procesom atenuisanja izolovanog soja virusa PI3 radi pripremanja vaccine, autori iz Japana dobili su novu antigensku varijantu navedenog virusa koji je u svom genomu imao samo četiri nepodudarna nukleotida sa izolovanim sojem virusa od koga je potekao. Nukleotidne razlike između vakcinalnog i izolovanog soja virusa ogledale su se samo u razlikama vezanim za raspored jednog nukleotida u okviru jednog gena. Međutim, razlika u jednom nukleotidu dovela je do sinteze različite aminokiseline, a samim tim i do pojave drugačijih osobina sintetisanog proteina, što se ogledalo u gubitku sposobnosti hemaglutinacije i virulencije kod atenuisanog soja virusa, ali i u očuvanju njegovih imunogenih svojstava značajnih za pripremanje vaccine (**Shioda i sar. 1988**). Rezultati navedenog istraživanja ukazuju na značaj razlika u nukleotidnoj homologiji manjoj i od 1%, jer iste mogu da utiču na promene nekih bioloških karakteristika soja virusa, kao na primer sposobnosti hemaglutinacije i virulencije. Iz tih razloga, ne treba zanemariti ni najmanje razlike u nukleotidnoj homologiji koje domaći sojevi izolovanih virusa PI3 mogu pokazivati u ispitivanoj sekvenci prema sebi najbližijim sojevima izolovanih virusa.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih molekularnom karakterizacijom i identifikacijom domaćih izolovanih sojeva virusa PI3 goveda, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Metodom izolacije i virus neutralizacije na ćelijskoj liniji MDBK iz 119 ispitanih uzoraka nosnih briseva goveda sa teritorije Republike Srbije izolovano je 6 sojeva virusa parainfluence.
2. Metodom direktne imunofluorescencije je potvrđena identifikacija izolovanih sojeva virusa.
3. Ispitivanjem svih uzoraka nosnih briseva goveda metodom lančane reakcije polimeraze – RT PCR u kojima prethodno nije utvrđeno prisustvo virusa PI3 metodama izolacije virusa na kulturi tkiva i direktne imunofluorescencije, kod dva uzorka je ustanovljen genom virusa PI3.
4. Metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru dobijeno je osam sekvenci delova F i HN gena domaćih sojeva virusa PI3 goveda.
5. Sve dobijene sekvence virusnog genoma su obrađene u „BLAST“ programu baze gena (NCBI) i dobijena je njihova nukleotidna homologija sa sekvencama registrovanih sojeva virusa PI3 goveda iz banke gena koja je iznosila 80-99% za F gen, a 79-99% za HN gen..
6. Na osnovu pozicije sekvenci F i HN gena na filogenetskim stablima, ustanovljeno je da sojevi virusa PI3 sa teritorije Republike Srbije, pripadaju genotipu C.

8.SKRAĆENICE

ATP	adenozin tri fosfat
BHV1	goveđi herpes virus 1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BP	bazni parovi
BPI3	parainfluenca 3 goveda
BRCV	goveđi respiratorni korona virus
BRSV	goveđi respiratorni sincicijalni virus
BVDV	virus goveđe virusnea dijareje
CNS	centralni nervni sistem
CPE	citopatogeni efekat
CSFV	virus klasične kuge svinja
DIF	direktna imunofluorescencija
DNA, DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
ELISA	imunoenzimski test
F	fuzioni (protein, gen)
FITC	fluoresceinizotiocijanat
HA	hemaglutinacija
HI	heminhibicija
HN	hemaglutinin neuraminidaza
HPI3	humani parainfluenca virus 3

IBR	infektivni bovini rinotraheitis
IBR-IPV	infektivni rinotraheitis i vulvovaginitis goveda
M	matriks (protein, gen)
MDBK	Madin Radby Bovine Kidney, ćelijska linija
MEM	minimalni esencijalni medijum
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDV	virus Newcastle bolesti
PBS	fosfatni slani pufer
PCR	lančana reakcija polimeraze
PI3	parainfluenca 3
RNK	ribonukleinska kiselina
RT PCR	lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom
SBEK	linija embrionalnih bubrežnih ćelija goveda
SF4	“Sheeping fewer 4”, soj virusa PI3 goveda
SNT	serumneutralizacioni test
SV	Sendai virus miševa
TCID _{50%}	infektivna doza virusa za kulturu tkiva
TFA	tehnika fluorescentnih antitela
VNT	virusneutralizacioni test

9. SPISAK LITERATURE

1. *Alawe A.B.*; Propagation of bovine parainfluenza 3 virus in chicken embryos, Journal of Vet. Sci, Vol 5 No 2 (2012)
2. *Abinanti F., Chanock R.M., Cook M., Wong D.*; Relationship of human and bovine strains of myxovirus parainfluenza virus 3; Exp. Biol. Medic. 106: 466, (1961)
3. *Almajhdi F.N., Alshmann M., Amer M.*; Molecular characterisation and phylogenetic analysis of human parainfluenza virus 3 isolated from Saudi Arabia; J Med. Virol. 84; 1304-1311; (2012)
4. *Almeida Vaucher R., Dezen D., Simonetti A., Spilki F., Roeche P.*; Phylogenetic characterisation of bovine parainfluenza 3 from contaminated cultures and field isolates from Brasil, Brazilian jurlan of microbiology, 42; 1440-1444; (2011)
5. *Almeida Vaucher R., Simonetti A., Roehe P.*; RT PCR for detection of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3), ACTA SCIENTIAE VETERINARIE, 36 (#) 215-230, (2008)
6. *Breker Classen M., Yoo D., Babiuk L.*; 1996. Comparison of the F and HN Gene Sequences of Different strains of Bovine Parainfluenza Virus Type 3: Relationship to Phenotype and Pathogenicity; Can. J. Vet. Res. 1996, 228-236, (1996).
7. *Bhattacharyya D., Hammond A.T., Glik B.S.*; High quality Immunofluorescence of cultured cells; Methods of molecular Biol. (2010.)
8. *Coelingh K., Winter C., Murphy R., Rice J., Kimall P., Olmsted R., Collins L.*; Conserved epitopes on the Hemmaglutinin neuraminidase proteins of human and bovine parainfluenza 3 viruses: Nucleotide sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies, Journal of virology; 1986, p. 90-96; (1986)
9. *Charlton S., Giroux R., Hondred D., Lipton C., Woeden K.*; PCR validation and performance characteristics – AEIC Biotech Consensus PAper, (2013)

10. *Crandel R.A., Mansfield M.E., Melloch A.*; Further observations on the Characteristics of bovine Parainfluenza 3 variant, *Can. J. Med.* vol. 39, Jan. (1975.)
11. *Dong X.M., Zhu Y.M., Cai H., Luv C., Gao Y., Yu Z., Xue Z.*; Studies of the pathogenesis of Chinese strain of bovine parainfluenza virus type 3 infection in Bulb mice, *Veterinary Microbiology*, Volume 158, Issues 1-2, July. P. 199-204. (2012.)
12. *Eberkle KC, Neill JD, Watson SK, Gill JL, Sacco RE*; Novel Atlantic bottlenose dolphin parainfluenza virus TtPIV-1 clusters with bovine PIV-3 genotype B strains. *Virus Genes*. 2015 Jul 15. [Epub ahead of print] (2015.)
13. *Elazhaey M.A., Derbyshire J.B.*; Aerosol Stability of Bovine parainfluenza Type 3 virus; *Can. J. comp. Med.* Volume 43, July, (1979.)
14. *Fulton R., Confer A.*; Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: Gold standards for diagnosis do day exist?; *Can Vet Journal* vol 53, p. 754-761 (2012.)
15. *Frederick A Murphy., E. Paul., J.Gibbs, Marian C.Horzinek, Michael J. Studdert .*;2000, *Veterinary Virology* IV edition (2000.)
16. *Gafer J.A., Huseinn H.A., Reda I.M.*; Isolation and characterisation of PI3 virus from sheep and goats; , *International Journal of Virology*, 5, (1) 28-35, (2009.)
17. *Gale C.*; Role of Parainfluenza virus 3 in cattle , *Journal of airy sciencIa*, Vol 53, No 5; (2000.)
18. *Ghram A., Reddy P., Morrill J., Minocha H.*; Bovine herpesvirus 1 and parainfluenza 3 virus interactions: Clinical and Immunological response in calves; *Canadian Journal Vet Res.*; 53: 62-67; (1989.)
19. *Guzvic M.*; The history of DNA sequencing, *Journal of Med Biochem*, 32, 301-312. (2013.)
20. *Greenberg .D, Walker R., Lee M., Reisinger .K, Ward J., Yogev R., Blatter M., Yeh S., Karron R., Sangli C., Eubank L., Cordova K.*; august,. A bovine

- parainfluenza virus type 3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy (2005.)
21. *Horwood P.F., Mahony J.*; Multiplex real time RT PCR detection of the three viruses associated with the bovine respiratory disease complex, *Journal of virological methods*, 171; (2011.)
 22. *Horwood P.F., Gravel D., Mahony J.*; Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes; *Journal of General virology*, 89, 1643-1648; (2008.)
 23. *Ibu O., Salihu E., Abechui M., Okewu M.*; Activity of bovine parainfluenza virus type 3 in cattle north eastern nigeria; *Sokoto Journal of veterinary sciences*, volume 6; (2005.)
 24. *Intisar K.S., Khalafalla A.I., Rahman E.A., Amin A.S.* ; 2010, Respiratory infection of camels associated with parainfluenza virus 3 in Sudan; *Journal of virological methods*; (2010.)
 25. *Jolly R, Ditchfield J*; Bronchopneumonia Of calves caused by parainfluenza virus type 3; *Can. Vet. Jour.* Vol 6 No 11; (1965.)
 26. *Klippmark E., Rydbeck R., Shibuta H., Norrby E.* ; 1990, Antigenic variation of human and bovine parainfluenza virus 3 ; *Journal of General Virology* 71; (1990.)
 27. *Komatsu M., Takeuchi K. , Gotoh B.* ; Bovine parainfluenza type 3 accessory proteins that suppress beta interferon production ; *Microbes and infection*, Volume 9, Issue 8, July, Pages 954-962; (2007.)
 28. *Kawakami N., Kaji T., Kume T., Omuro M. , Hiramun H., Matumoto M.*; 1966, Infection of cattle with parainfluenza virus type 3 with special reference to udder infection, *Jaoan Journal of Microbiology*, Vol 10, (3) ; (1966.)
 29. *Konishi M., Ohkura T. , Shimizu M. , Masanori A., Kemeyama K., Takeuchi K.*; Complete Genome sequence of the first Isolate of Genotype C BOvine

- Parainfluenza Type 3 in Japan; 2014 Genome Announcements , Volume 2 Issue 6; (2014.)
30. *Lazić S., Petrović T.*; Virusne infekcije teladi u neonatalnom periodu ;
<http://www.vetks.org.rs/documents/teme09/Virusne%20infekcije%20teladi.pdf>
 31. *Lyon M., Leroux C. , Greenland T., Chastang J., Patet J., Mornex F.*; Presence of a unique parainfluenza virus 3strain identified by PCR in visna-maedi virus infected sheep; *Veterinary Microbiology* 51, p. 95-104; (1997.)
 32. *Lilly L. E.* ; *Journal of dairy science* vol 53 No5; (1977.)
 33. *Marshall RL* ; Isolation of bovine parainfluenza virus type 3 in chick embryos; *Journal of virology* vol 88; (1964.)
 34. *Maidana S., Lomonaco P., Craig G., Diodati J., Rodrigues S, Pareeno, Zabal, Crudelli, Mauroy*; Isolation and characterisation of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes *Bubalus bubalis* in Argentina; *BMC Veterinary research* 8:83; (2012.)
 35. *Mohan K.H., Pai S. , Rao R., Sripathi H., Prabhu H.*; Techniques of immunofluorescence and their significance, *Indian Journal Dermatology* Vol 74, Issue 4; (2008.)
 36. *Nyaga P., Kaminjolo J., Gathuma J., Omuse F. , Gicjho J.* ; Prevalence of antibodies to Parainfluenza 3 virus in various wildlife species and indigenous cattle sharing the same habitats in Kenya, *journal of wildlife diseases* vol 17, No4, ; (1981.)
 37. *Neill D., Ridpath J.F., Valayudhan T.*; Identification and genome characterisation of genotype B and C bovine parainfluenza type3 viruses isolated in the United States.; *BMC veterinary Research* , 11:112 ; (2015.)
 38. *Nolens H.H., Wellehan J., Saliki J.T. , Caseltine S.L., Jensen E., Van Born W., Venn Watson S.*; Characterisation of parainfluenza virus isolated from bottlenose dolphin, Elsevier, oct. (2007.)

39. *Oem K., Lee J., Lee K., Kim S., Heon L.H., Lee M.N., Hyun B.H.*; Molecular characterisation of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate; *Veterinary Microbiology* 162 p. 224-227. ; (2013.)
40. *Ohkura T., Kokuho T., Konishi M., Kameyama K., Takeuchi K.*; Complete Genome sequences fo bovine parainfluenza virus type 3 strain BN1 and vaccine strain BN-CE; *Journal of genome announcements*, volume 1 issue 1; (2013.)
41. OIE, *Terrestrial animal health code* , International standard setting; Edition (2015.)
42. *Obenrader KC* ; The Sanger method, Undergraduate course at Davison College, <file:///H:/REFERENCE%20SEQ/Sanger%20Method%202.htm> (2012.)
43. *Oshawa K., Yamada A. , Takeuchi K., Watanabe Y. , Myata H., Sato H.*; Genetic Characterisation of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs; *J. Vet. Med. Sci.* 60:919-922,; (1998.)
44. *Paul Robinson, Jenifer Sturgis, G. Kulmar*, Chapter:10 Immunofluorescence IHC staining methods, fifth edition (2000.)
45. *Probert M., Stott E., Thomas L.*; Interactuions between calf alveolar macrophags and paatrinfluenza 3 virus; *Infect. Immunity*, 15, (2); 576; (1977.)
46. Pfizer Animal health, July 2010. Technical buletin Aiids in the prevention of disease caused by bovine parainfluenza 3 virus. (2010.)
47. *Qiao D., Janke B., Elankumaran S.*; Complete Genome Sequence and Oathogenicity of Two Swinre Parainfluenza virus 3 isolates from Pigs in Unated States; *Journal of virology*, Jan. p. 686-694 (2010.)
48. *Ren .S, Zhu Y., Zhou Y., Luv C., Yan H., Ma L.,Shi H., Xue F.*; Identification of teh three antigen epitopes on the nucleocapsid protein of the genotype C of bovine parainfluenza virus type 3; *Veterinary Microbiology* Volume 178, Issues 1-2, 9. July 2015, p. 61-69; (2015.)

49. *Rossi C.R., Kiesel G.K.*; Microtiter tests for detecting antibody in bovine serum to parainfluenza 3 virus IBR and BVD, *Applied microbiology* July, p. 32-36; (1971.)
50. *Shi H., Zhu Y., Dong X., Cai H., Ma L., Wang S., Yan H., Xue F.*; Pathogenesis of a genotype C strain of bovine parainfluenza type 3 infection in albino guinea pigs. *Virus research* ,Aug. 26; 188; p. 1-7; (2014.)
51. *Shioda T., Vakao S., Suzu H., Shibuta H.*; Differences in bovine parainfluenza virus 3 variants studied by sequencing of the genes of viral envelope proteins; (1998.)
52. *Shibuta H., Kanda T., Adachi A., Yogo Y.*; Characterisation of bovine parainfluenza virus type 3 ; *Microbiol. Immunol.* Vol 23 (7) ; (1979.)
53. *Schmidt A., McAuliffe J., Huang A., Surman S., Bally, J., Elkin S. W.*; Bovine parainfluenza virus type 3 Fusion and haemagglutinin-neuraminidase glycoproteins Make an important contribution on the restricted replication of BPI3 in primates; (2000.)
54. *Storz J, Lin X, Purdy C, Chouljenko V, Kousoulas K, Enright F, Gilmore V*; Coronavirus and Pasterella infections in bovine shipping fever, pneumonia and Evans criteria for causation; *Journal of Clinical microbiology.*; (2000.)
55. *Suzu S., Sakai Y., Shioda T., Shibuta H.*; Nucleotide sequence of the bovine parainfluenza virus 3 genome, the genes of F and HN glycoproteins, *Nucleic Acids Research*, volume 15 number 7; (1987.)
56. *Sakai Y., Suzu S., Shioda T., Shibuta H.*; Nucleotide sequence of the bovine parainfluenza virus type 3 genome: its 3' and the genes of NP, P, C and M protein; *Nucleic Acids Research*, volume 15 number 7, ; (1987)
57. *Saunders J.R., Berman D.*; Epizootics studies of shipping fever, Exposure of calves to pasterellae and parainfluenza 3 virus, ; *Can. J Comp. Med. Vet Sci .* Vol 28, March ; (1964.)

58. *Thorsen J., Sanderson R., Bittle J.*; Bovine Para influenza 3 vaccine studies ; Can J of CompMed., Vol 33 (1969.)
59. *Tsai K., Thompson R.G.*; Bovine parainfluenza type 3 virus infection: Ultrastructural aspects of viral pathogenesis in the bovine respiratory tract; Infection and immunity , p. 783-803; (1975.)
60. Virology Division Backweston Campus, Ceuilbridge, Kildare ; Nasal swabs; Agriculture and fisheries and food. Ireland ; (2008.)
61. *Vainionpää R., Hyypia T.*; Biology of parainfluenza viruses , Clinical Microbiology Reviews, p. 265-275; (1994.)
62. *Večerov A.E., Aianot P.K., Timina A.M., Lisistin V.V.*; Detection and differentiation of the bovine parainfluenza 3 virus strains studied by amplification and sequencing of the HN gene. Vopr. Virusol. Sept-Oct; 48, (5) 46-49; (2003.)
63. *Wen Y, Shi X, Wang F, Zhang W, Li G, Song S, Chen S*; Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype A strain in China Virus Genes Dec 45(3) 542-547; (2012.)
64. *Wan der Marten M.J.*; immunofluorescent studies of bovine parainfluenza 3 virus , experimentally infected calves; Canadian Journal of comparative Medicine, vol 33, Aprile (1969.)
65. *Zhu Y.M., Shi H.F., Gao Y., Xin J., Liu N., Xiang W., Ren X., Feng J., Zhao L., Xue F.*; Isolation and genetic characterisation of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China; Veterinary Microbiology 149, 446-451; (2011)

BIOGRAFIJA AUTORA (CURRICULUM VITAE)

Ljubiša Veljović

Ljubiša Veljović rođen je 22. juna 1964. godine u Loznici, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu završio je u Loznici i stekao zvanje laboratorijskog tehničara za mikrobiologiju. Upisao je Fakultet veterinarske medicine na Univerzitetu u Beogradu gde je i diplomirao 1992. godine sa prosečnom ocenom 8,48. Magistrirao je na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, na Katedri za zarazne bolesti i bolesti pčela 2005. godine.

Ljubiša Veljović se zaposlio u Naučnom Institutu za veterinarstvo Srbije u Beogradu 1994. Godine, gde je radio na Odeljenju za virusologiju. Od 1997. godine radio je u Veterinarskom zavodu Zemun, u Virusološkoj laboratoriji za kontrolu kvaliteta, a od 2007. do 2011. godine na poziciji direktora Sektora kontrole kvaliteta, Veterinarskog zavoda Zemun. Od 2011. do danas, Ljubiša Veljović radi na Naučnom Institutu za veterinarstvo Srbije u Beogradu, na Odeljenju za virusologiju. Član je Nacionalne referentne laboratorije Republike Srbije za slinavku i šap, klasičnu i afričku kugu svinja, enzootsku leukozu goveda, besnilo, bolest plavog jezika, influencu kopitara i infektivnu anemiju kopitara.

U svom redovnom poslu na Odeljenju za virusologiju NIVS-a Beograd, Ljubiša Veljović obavlja poslove dijagnostike zaraznih bolesti životinja virusne etiologije, koristeći klasične virusološke i molekularne metode dijagnostike. Kao član Nacionalne referentne laboratorije za naročito opasne zarazne bolesti, više puta je učestvovao i po potrebi držao prezentacije na skupovima u organizaciji Evropskih referentnih laboratorija i to: Brisel, Belgija; London, Velika Britanija (NRL za bolest plavog jezika); Nansi, Francuska (NRL za besnilo); Lion, Francuska (NRL za infektivnu anemiju kopitara); Madrid, Španija (NRL za klasičnu i afričku kugu svinja).

Ljubiša Veljović je objavio preko 40 naučnih radova iz oblasti dijagnostike bolesti virusne etiologije, mikrobiologije, epizootiologije i kontrole kvaliteta virusnih i bakterijskih vakcina.

Podaci o kontaktu autora:

Ime i prezime	LJUBIŠA VELJOVIĆ
Datum i mesto rođenja	22.06.1964, Loznica
Adresa stanovanja	Albanske spomenice 19/68, Beograd
Kućni telefon	381 11 20 83 481
Mobilni telefon	381 63 81 66 757
e-mail	ljub.veljovic@gmail.com

Prilog 1.

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani Ljubiša Veljović _____

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom Molekularna karakterizacija sojeva virusa parainfluence 3 goveda izolovanih na teritoriji Republike Srbije ,

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da su rezultati korektno navedeni
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica

u Beogradu 03.2016.

potpis doktoranta



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ljubiša Veljović

Broj upisa _____

studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: Molekularna karakterizacija sojeva virusa parainfluence 3 goveda izolovanih na teritoriji Republike Srbije

Mentor: Prof Dr Nenad Milić

Potpisani, Ljubiša Veljović, izjavljujem :

da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu .03.2016.

Potpis doktoranta



Prilog 3.

IZJAVA O KORIŠĆENJU

ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod nasloviom :

Molekularna karakterizacija sojeva virusa parainfluence 3 goveda izolovanih na teritoriji Republike Srbije koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju diktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni Repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo bez prerade
6. Autorstvo deliti pod istim uslovima

Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci , kratak opis licenci dat je na poledini lista)

U Beogradu , 03.2016.

Potpis doktoranta

