

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Milica S. Nešić

Varijabilnost genoma humanog virusa
Parvovirus B19 (Parvoviridae,
Erythrovirus)

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Milica S. Nešić

Genome variability of *Human Parvovirus*
B19 (Parvoviridae, *Erythrovirus*)

Doctoral Thesis

Belgrade, 2013

Mentori

Dr Gorana Stamenković, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Dušanka Savić Pavićević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije

Dr Aleksandra M. Knežević, docent, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za Mikrobiologiju i Imunologiju

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena na Odeljenju za genetička istraživanja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije.

Najveću zahvalnost dugujem dr Gorani Stamenković, višem naučnom saradniku IBISS, mom mentoru, na ukazanom poverenju i na nesebičnoj pomoći i podršci u toku izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Dušanki Savić Pavićević, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta i mom mentoru, na stručnoj pomoći, korisnim savetima, podršci i razumevanju, kao i dr Aleksandri M. Knežević, docentu na katedri Instituta za Mikrobiologiju i Imunologiju Medicinskog fakulteta, članu komisije, na stručnim savetima i pomoći u toku rada i pisanja doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Maji Stanojević (docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu), Valentini Nikolić i Marini Šiljić, (istraživači saradnici Instituta za mikrobiologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu) na pomoći u eksperimentalnom radu kao i na stručnim savetima u postavljanju idejnih rešenja. Savete i podršku nesebično i prijateljski su mi pružile i dr Snežana Jovanović Ćupić (Institut za nuklearne nauke „Vinča“) i dr Ivana Morić (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo).

Želim da se zahvalim i svim kolegama iz Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije na prijateljskoj atmosferi i svakodnevnoj podršci, kao i kolektivu Odeljenja za genetička istraživanja IBISS na saradnji i savetima.

Mojoj porodici, koja mi je pružila bezgranično razumevanje, podršku i ljubav, nikada neću moći dovoljno da se zahvalim. Zato Vladi, Ljubici i Urošu, bez kojih ni jedan uspeh nije vredan, ostajem zauvek dužna.

Varijabilnost genoma humanog virusa *Parvovirus B19* (Parvoviridae, *Erythrovirus*)

Rezime:

Uvod: Infekcija parvoB19 virusom koja se prenosi respiratornim i vertikalnim putem, ali i preko zaražene krvi i krvnih derivata, može predstavljati ozbiljan zdravstveni problem za rizične grupe pacijenata. Ovaj, po dimenzijama mali DNK virus bez omotača je vrlo otporan na standardne tehnike inaktivacije virusa u proizvodnji derivata krvi, a pouzdanu dijagnostiku otežava varijabilnost genomske sekvence virusa. Određivanje karakteristika nukleotidnih sekvenci izolata B19 virusa od značaja je za razvoj dijagnostičkih metoda i daje uvid u puteve nastanka i održavanja genomske varijabilnosti B19 virusa. Cilj ovog rada bio je da se odredi učestalost B19 virusa kod dobrovoljnih davalaca krvi i kod pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju i da se na osnovu molekularno genetskih karakteristika dobijenih genomskih sekvenci, a u poređenju sa genomskim sekvencama dostupnim u bazama podataka, odredi evolutivna dinamika varijabilnosti parvoB19 virusa i filogenetski i filogeografski odnosi ispitivanih B19 izolata.

Metode: Uzorci plazme dobrovoljnih davalaca i plazme i krvi pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju analizirani su na prisustvo B19 DNK primenom lančane reakcije polimeraze (PCR), kako metodama iz literature tako i razvijenom internom metodom. Za uzorke sa detektovanim B19 genomom, direktnim nukleotidnim sekvenciranjem određena je genomska sekvenca. Bioinformatičkom analizom u odnosu na genomske sekvence B19 virusa dostupne u bazama podataka određen je genotip izolovanih virusnih genoma, evolutivni pritisci na osnovu odnosa nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS) za nukleotidne sekvence koje kodiraju virusne proteine, kao i genetičke distance i filogenetski odnosi B19 izolata dobijenih u Srbiji u odnosu na izolate iz drugih geografskih regija.

Rezultati: Za 5 izolata iz Srbije, utvrđena je sekvenca B19 genoma u regiji kompletne cDNK. Iz baze podataka izdvojeni su i analizirani izolati sa poznatom sekvencom u regiji kompletne ili skoro kompletne cDNK, kojih je do 2012. godine bilo ukupno 146, od toga 117 genotipa 1. Analizom odnosa dN/dS za virusne

proteine na osnovu većeg broja nukleotidnih sekvenci u odnosu na dosadašnje literaturne podatke procenjen je uticaj pozitivne i negativne selekcije na varijabilnost virusnog genoma. Određene su genetičke distance i filogenetski odnosi u okviru populacije izolata iz Srbije, i u odnosu na druge izolate čije su genomske sekvence dostupne u nukleotidnim bazama podataka.

Zaključak: Na osnovu rezultata ove studije potvrđeno je prisustvo B19 genotipa 1 u humanoj populaciji Srbije i određena genomska sekvenca izolata. Utvrđeno je da su rekombinacije kod B19 virusa redak događaj, što ukazuje na to da su manje važan mehanizam u evoluciji B19 virusa. Analizom dobijenih genomskih sekvenci i sekvenci iz baza podataka potvrđeno je dominantno delovanje negativne selekcije ($p=0.05$) na varijabilnost kodirajućih sekvenci i to izraženije za glavne virusne proteine (VP1, VP2 i NS1), i slabije izraženo za male virusne proteine (7.5 kDa, 11 kDa, protein X). Zamena F554L (NS1 gen: C2276T) u sekvenci NS1 proteina fiksirana je u populaciji izolata iz Srbije a na kodonu 554 utvrđeno je delovanje pozitivne selekcije ($p=0.095$). Na osnovu filogenetske analize cDNK dobijenih izolata i 117 izolata iz različitih delova sveta klasterizacija B19 virusa u okviru genotipa 1 je nezavisna od geografskog porekla izolata. Do sada je u grupi DNK humanih virusa, samo za hepatitis B virus (HBV), genotip D, filogeografska analiza kopletnih genoma pokazala jasnu klasterizaciju na osnovu geografskog porekla. Visok nivo genetičke distance između dva izolata B19 iz Srbije uzeta od istog pacijenta u razmaku od godinu dana, ukazuje na postojanje koinfekcije sa najmanje dve kvazivrste B19 virusa od kojih jedna kvazivrsta seleksionisana kao dominantna u toku pokazane perzistentne infekcije.

Ključne reči: parvovirus B19, genomska varijabilnost, virusni genotipovi, nukleotidna distanca, filogenetski i filogeografski odnosi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna virusologija

UDK broj: 578.522 : [578.827 : 611/612] (043.3).

Genome variability of *Human Parvovirus B19* (Parvoviridae, *Erythrovirus*)

Abstract:

Background: Parvovirus B19 infection, being transmitted via the respiratory route, vertically from mother to fetus as well as through blood-derived products administered parenterally, can represent a serious health problem for risk patients groups. This small non-enveloped DNA virus is extremely resistant to standard viral inactivation techniques, while a reliable diagnosis is challenged by the virus genome sequence variability. Characterization of B19 isolates nucleotide sequences is valuable for development of diagnostic methods, and it gives an insight into the genesis and maintenance of the B19 virus genome variability.

Aim of this thesis was to determine the frequency of B19 viremia in voluntary blood donors and in patients with the B19 infection symptoms, investigate the level and evolutionary dynamics of the B19 genome variability as well as to examine phylogenetic and phylogeographic relations of the B19 genomes obtained in Serbia with the isolates from the other parts of the world on the bases of the almost complete B19 cDNA sequences.

Methods: Plasma samples of the voluntary blood donors, and plasma and blood samples of the B19 infection suspected patients were analysed for the B19 DNA presence by the polymerase chain reaction (PCR), using the methods described in the literature as well as internally developed method. For the B19 genome positive samples genome sequences were determined by direct sequencing. Bioinformatic analysis was performed by using the generated data as well as the database information in order to determine a genotype of the isolated genomes, evolutionary pressures (based on dN/dS ratio) for virus protein coding sequences, and genetic distances and phylogenetic relations of the B19 isolates from Serbia compared to the other geographic regions.

Results: For 5 isolates from Serbia, the B19 genome sequence was determined for the complete cDNA. Database isolates with the known, complete or almost complete cDNA, available until the end of 2012 (146 isolates in total, out of which 117 were genotype 1) were chosen and used for the analysis. Positive and negative selection

influence for the virus protein coding sequences was determined by the dN/dS ratio analysis by using larger data set than described in the literature so far. Genetic distances and phylogenetic relations were determined within Serbian population, as well as in comparison to the other populations with the known B19 genome sequence available in the nucleotide database.

Conclusions: Based on the results of this study, B19 genotype 1 presence was confirmed in the population of Serbia, and the genome sequence of viral isolates was determined. It was shown that the recombination events for the B19 virus were rare and therefore less significant mechanism in the B19 virus evolution. Analysis of the isolates from Serbia and database sequences confirmed the dominant effect of the negative selection ($p=0.05$) on coding sequences, with the effect more pronounced for major virus proteins (VP1, VP2 and NS1), and less pronounced for the small virus proteins (7.5 kDa, 11 kDa, protein X), respectively. F554L substitution (NS1 gene: C2276T) in the NS1 protein sequence is fixated in Serbian B19 population, and for the codon 554, the positive selection ($p=0.095$) is confirmed. Based on the phylogenetic analysis of cDNA of the obtained isolates and 117 isolates from different parts of the world, clusterization within the B19 genotype 1 is geographically independent. Up to now, in the group of the human DNA viruses, the pronounced geographical clusterization is demonstrated for the genotype D3 of the hepatitis B virus (HBV), by the phylogeographic analysis of the complete genome sequences. High value of the genetic distance demonstrated in comparison of two samples taken from the same patient one year apart suggests co-infection with at least two quasispecies of the B19 virus, one of which was selected as dominant during the demonstrated persistent infection.

Keywords: *Parvovirus B19*, Genome variability, Virus genotypes, Nucleotide distance, Phylogenetic and Phylogeographic relations

Scientific field: Biology

Special topic: Molecular virology

UDC number: 578.522 : [578.827 : 611/612] (043.3).

Skraćenice:

- 3D:** trodimenzionalno
- acc.no:** pristupni broj (eng. *Accession Number*)
- AIC:** Akaike informacioni kriterijum (eng. *Akaike information criteria*)
- ak:** aminokiselina
- ARF:** alternativni okvir čitanja (eng. *Alternative Reading Frame*)
- ATP:** adenozin trifosfat
- B19BRP:** B19 biološki referentni preparat (eng. *B19 virus DNA for NAT testing Biological Reference Preparation*)
- B19IS:** B19 internacionalni standard Svetske zdravstvene organizacije (eng. *WHO International Standard for parvovirus B19 DNA NAT assays*)
- BIC:** Bayesian informacioni kriterijum (eng. *Bayesian information criteria*)
- BLAST:** osnovni bioinformatički alat za poravnanje sekvenci (eng. *The Basic Local Alignment Search Tool*)
- DDBJ:** DNK baza podataka Japana (eng. *DNA DataBank of Japan*)
- DNK:** dezoksiribonukleinska kiselina
- DT:** metod teorije odlučivanja (eng. *Decision Theory method*)
- EDQM:** Evropski direktorat za kvalitet lekova (eng. *European Directorate for Quality of Medicines*)
- EDTA:** etilendiamintetrasirćetna kiselina (eng. *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)
- EMBL:** Evropska laboratorija za molekularnu biologiju (eng. *European Molecular Biology Laboratory*).
- FDA:** Agencija za kvalitet hrane i lekova SAD (eng. *Food and Drug Administration*)
- GARD:** genetički algoritam za detekciju rekombinacije (eng. *Genetic Algorithm for Recombination Detection*)
- HAV:** hepatitis A virus
- HBoV:** humani bocavirus
- HBsAg:** hepatitis B površinski antigen (eng. *Hepatitis B surface Antigen*)

HBV: hepatitis B virus

HCV: hepatitis C virus

HIV: humani virus imunodeficijencije (eng. Human Immunodeficiency Virus)

IgG: imunoglobulin klase G

IgM: imunoglobulin klase M

iRNK: informaciona ribonukleinska kiselina

IU: internacionalne jedinice (eng. *International Units*)

kDa: kilo Dalton

lnL: prirodni logaritam verovatnoće, *Maximum likelihood* vrednost (eng. *log likelihood*)

ML: maksimalna verovatnoća (eng. *Maximum Likelihood*)

NCBI: Nacionalni centar za biotehnoške informacije Velike Britanije (eng. *National Center for Biotechnology Information*)

NIBSC: Nacionalni institut za biološke standarde i kontrolu (eng. *The National Institute for Biological Standards and Control*)

NIH: Nacionalni institut za zdravlje SAD (eng. *National Institute of Health*)

NLM: Nacionalna medicinska biblioteka SAD (eng. *National Library of Medicine*)

NMR: Nuklearna magnetna rezonanca

NS1: nestrukturani protein 1

nt: Nukleotid

NTP: nukleozid trifosfat

ORF: otvoreni okvir čitanja (eng. *Open Reading Frame*)

PAA: poliakrilamid

PARV4: parvovirus 4

PARV5: parvovirus 5

PCR: lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PDB: baza podataka sa proteinskim sekvencama (eng. *Protein Data Bank*)

PLA: fosfolipaza A2 (eng. *Phospholipase A2*)

PRCA: aplazija crvene krvne loze (eng. *Pure Red Cell Aplasia*)

- PTS:** vid eksterne procene kvaliteta metode (eng. *Proficiency Testing Scheme*) koji organizuje EDQM
- RefSeq:** baza podataka sa referentnim sekvencama (eng. *Reference Sequence Database*)
- RNK:** ribonukleinska kiselina
- SLAC:** bioinformatički alat za identifikaciju mesta pod uticajem pozitivne i negativne selekcije (eng. *Single Likelihood Ancestor Counting*)
- ssRNK:** jednolančana ribonukleinska kiselina (eng. *single stranded RNA*)
- TNF:** Tumorski faktor nekroze (eng. *Tumor Necrosis Factor*)
- TPA:** baza podataka koji su izvedeni iz primarnih podataka GenBank baze (eng. *Third Party Annotation*)
- TS:** Terminalne sekvence
- VP1:** virusni protein 1
- VP1u:** region jedinstven za virusni protein 1 (eng. *VP1 unique*)
- VP2:** virusni protein 2
- WHO:** Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*)

Termini preuzeti iz engleskog jezika:

- end-point PCR:*** amplifikacija lančanom reakcijom polimeraze sa procenom količine sintetisanih amplikona nakon prekida reakcije
- mismatch:*** pogrešno sparivanje ili nekomplementarnost nukleotida
- neighbor-joining:*** metod odnosno algoritam za konstruisanje filogenetskih stabala na osnovu međusobne udaljenosti svakog para sekvenci, spajanjem "najbližih suseda"
- outgroup:*** izolat koji je srodan ispitivanim izolatima ali u zasebnom filogenetskom klasteru pa se kao takav koristi kao referentni u određivanju korena filogenetskog stabla.

Sadržaj

	strana
1 Uvod	1
1.1 Taksonomija	1
1.1.1. Familija Parvoviridae	1
1.1.2. Podfamilija Parvovirinae	2
1.1.3. Rod <i>Erythrovirus</i>	3
1.2 Struktura B19 virusa	3
1.2.1. Građa viriona	3
1.2.2. Organizacija genoma B19 virusa	5
1.2.3. Karakteristike i funkcije proteina B19	7
1.2.3.1. Strukturni proteini	7
1.2.3.2. Nestrukturni proteini	8
1.3 Životni ciklus parvoB19 virusa	10
1.4 Kliničke i epidemiološke karakteristike B19 virusne infekcije	12
1.4.1. Klinički tok infekcije, simptomi oboljenja i dijagnoza	12
1.4.1.1. Tok infekcije	12
1.4.1.2. Simptomi oboljenja	13
1.4.1.3. Dijagnoza i terapija	16
1.4.2. Putevi prenosa, prevalenca i učestalost infekcije	17
1.5 Varijabilnost virusne sekvence	18
2 Ciljevi	22
3 Materijal i metode	23
3.1 Materijal	23
3.1.1 Uzorci krvi i plazme pacijenata	23
3.1.2 Standardi	25
3.1.3 Baze podataka	26
3.2. Metode	34
3.2.1 Izolacija virusne DNK iz uzoraka plazme i krvi	34
3.2.1.1 Izolacija virusne DNK iz uzoraka plazme	34

3.2.1.2	Izolacija virusne DNK iz uzoraka krvi	34
3.2.2	Detekcija i semikvantifikacija parvovirusne DNK	34
3.2.3	Određivanje nukleotidne sekvence delova genoma ispitivanih izolata B19 virusa	35
3.2.4	Bioinformatička obrada podataka	38
3.2.4.1	Finch TV	38
3.2.4.2	MEGA	38
3.2.4.3	Bioedit	38
3.2.4.4	Datamonkey	39
3.2.4.5	Testiranje modela za analizu genskih sekvenci B19	39
3.2.4.6	Program za analizu rekombinacionih događaja – RDP4	40
4	Rezultati	41
4.1	Identifikovanje uzoraka pozitivnih na B19 DNK	41
4.1.1.	Metode za detekciju i kvantifikaciju B19 DNK u uzorcima krvi i plazme	41
4.1.2.	Uzorci plazme dobrovoljnih davalaca krvi	48
4.1.3.	Uzorci pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju	48
4.2	Određivanje nukleotidne sekvence genoma B19 virusnih izolata	50
4.2.1	Reakcije PCR-a tokom pripreme za sekvenciranje B19 genoma	50
4.2.2	Genomske sekvence virusnih izolata B19 pozitivnih uzoraka	52
4.3	Analiza genoma B19 pozitivnih izolata	53
4.3.1.	Provera potencijalne rekombinacije u okviru sekvenci od interesa	53
4.3.1.1.	Analiza genoma B19 izolata RDP4 programom	53
4.3.1.2.	Analiza genoma B19 izolata HyPhy programom pomoću Datamonkey servera	55
4.3.2.	Analiza odnosa stepena nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS)	56
4.4	Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma	59
4.4.1	Izbor genomskih segmenata za analizu	59

4.4.2.	Testiranje modela za filogenetsku analizu	59
4.4.2.1.	Jmodeltest	59
4.4.2.2.	MEGA testiranje modela za filogenetsku analizu	62
4.4.3.	Određivanje nukleotidnih distanci	66
4.4.3.1.	Određivanje nukleotidne distance (<i>pairwise distance</i>) svih uzoraka	66
4.4.3.2.	Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka	67
4.4.3.3.	Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka iz Srbije	70
4.4.4.	Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidnih sekvenci	70
4.4.4.1.	Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidne sekvence reprezentativnih izolata sva tri genotipa	70
4.4.4.2.	Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidne sekvence cDNK od 665 do 4851 nt (skoro cele sekvence, 4186 nukleotida)	74
4.4.4.3.	Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidne sekvence od 2118 do 3110 nt (drugi segment)	77
4.4.5.	Retke i jedinstvene nukleotidne supstitucije u genomima B19 RS izolata	79
5.	Diskusija	82
5.1	Identifikovanje uzoraka pozitivnih na B19 DNK	82
5.1.1.	Metoda za detekciju i kvantifikaciju B19 DNK u uzorcima krvi i plazme	83
5.1.2.	Uzorci plazme dobrovoljnih davalaca krvi	87
5.1.3.	Uzorci pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju	87
5.2.	Određivanje nukleotidne sekvence genoma B19 virusnih izolata	89
5.3.	Analiza genoma B19 pozitivnih izolata	89
5.3.1.	Analiza potencijalne rekombinacije	89
5.3.2.	Analiza odnosa stepena nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS)	91
5.3.2.1.	Strukturni proteini	91
5.3.2.2.	Nestrukturni protein NS1	92

5.3.2.3.	Mali virusni proteini – 11 kDa, 7.5 kDa i protein X	93
5.4.	Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma	94
5.4.1.	Izbor segmenata za analizu	94
5.4.2.	Određivanje nukleotidnih distanci	95
5.4.2.1.	Određivanje nukleotidne distance (<i>pairwise distance</i>) svih uzoraka	95
5.4.2.2.	Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka	96
5.4.2.3.	Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka iz Srbije	97
5.4.3.	Filogenetski odnosi B19 genomskih nukleotidnih sekvenci	98
5.4.3.1.	Filogenetski odnosi reprezentativnih izolata sva tri genotipa	98
5.4.3.2.	Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma na osnovu cDNK od 665 do 4851 nt (skoro cele sekvence, 4186 nukleotida)	98
5.4.3.3.	Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma na osnovu dela sekvence od 2118 do 3110 nt (drugi segment)	99
5.4.4.	Retke i jedinstvene nukleotidne supstitucije u genomima B19 RS izolata	101
6.	Zaključci	103
7.	Literatura	105
8.	Prilozi	119
Prilog 1.	Pregled hromatograma u zapisu Finch.tv programa	
Prilog 2.	Nukleotidne sekvence B19 pozitivnih izolata	
Prilog 3.	Oznake za izolate genotipa 1 u GenBank bazi podataka korišćene u određenim analizama	
Prilog 4.	Filogenetska stabla u većem formatu	
Prilog 5.	Deo procedure prijave i razvoja interne metode za kvantifikaciju B19 genoma kao potencijalnog patenta u Centru za transfer tehnologija, Univerziteta u Beogradu	

1 Uvod

Parvovirus B19 su sasvim slučajno otkrili Cossart i saradnici 1974. godine, kada je jedan od uzoraka dobrovoljnog davaoca krvi (označen brojem 19 u panelu B) pokazao neuobičajene rezultate u testu na hepatitis B antigen (Cossart i sar., 1975). Elektronska mikroskopija je u tom uzorku pokazala prisustvo čestica veličine 23nm koje su ličile na do tada opisane životinjske parvoviruse. Osnovne karakteristike virusa ukazivale su na pripadnost porodici Parvoviridae, a tek nakon 1980. godine su neki od karakterističnih simptoma povezani sa prisustvom B19 virusa kod pacijenata - porast telesne temperature, prolazna aplastična kriza kod pacijenata sa anemijom srpastih ćelija, kao i karakterističan osip *Erythema infectiosum* (Shneerson i sar., 1980; Pattinson i sar., 1981, Anderson i sar., 1984). Međunarodni komitet za taksonomiju virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) je ovom virusu 1985. godine i zvanično dodelio ime B19, svrstavajući ga u familiju Parvoviridae (Siegl i sar., 1985).

1.1 Taksonomija

1.1.1. Familija Parvoviridae

Na osnovu morfoloških i funkcionalnih karakteristika u taksonomiji virusa definisana je familija Parvoviridae, u koju spadaju neki od najmanjih do skora poznatih DNK virusa. Ime familije potiče od latinske reči *parvum*, što znači mali. Genom virusa iz familije Parvoviridae je linearni molekul jednolančane DNK (Heegaard i Brown, 2002; Tattersall, 2006), uglavnom dužine 4 do 6 kb koji na oba kraja sadrži palindromske sekvence koje formiranjem strukture ukosnica omogućavaju replikaciju virusne DNK. Pripadnici familije Parvoviridae imaju proteinski kapsid bez lipidnog omotača a nije poznato da su virusni proteini glikozilovani (Tattersall, 2006). Parvoviridae su virusi koji napadaju životinjske ćelije pa se na osnovu domaćina i dele u dve podfamilije – Parvovirinae, virusi čiji su domaćini kičmenjaci, i Densovirinae, čiji su domaćini insekti i zglavkari (Tattersall i sar., 2005).

1.1.2. Podfamilija Parvovirinae

Organizacija genoma svih pripadnika podfamilije Parvovirinae je slična (Tattersall, 2006). Između palindromskih sekvenci najčešće se nalaze dva otvorena okvira čitanja (eng. *Open Reading Frame* - ORF), za nestrukturani protein i za proteine kapsida. Neki virusi iz ove subfamilije imaju i dodatne manje okvire čitanja (Astell i sar., 1983; Srivastava i sar., 1983; Ozawa i sar., 1987). Zavisno od virusa postoje jedan, dva ili tri promotora za transkripciju iRNK, neki virusi su autonomni a nekima je neophodna koinfekcija sa drugim virusima kako bi kompletirali životni ciklus. Na osnovu različitih karakteristika i filogenetske analize pripadnici podfamilije Parvovirinae podeljeni su u pet rodova: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* i *Bocavirus* (ICTV – *The Universal Virus Database, version 4*; Tattersall i sar., 2005; Tattersall, 2006, Tabela 1.1). U okviru ove teze od interesa je rod *Erythrovirus*, koji će biti detaljnije opisan.

Tabela 1.1 Taksonomija u okviru familije Parvoviridae.

Familija: Parvoviridae	
Podfamilija: Densovirinae (4 roda)	
Rod: <i>Brevidensovirus</i>	(2 vrste)
Rod: <i>Densovirus</i>	(2 vrste)
Rod: <i>Iteravirus</i>	(1 vrsta)
Rod: <i>Pefudensovirus</i>	(1 vrsta)
Podfamilija: Parvovirinae(5 rodova)	
Rod: <i>Amdovirus</i>	(1 vrsta)
Rod: <i>Bocavirus</i>	(2 vrste)
Rod: <i>Dependovirus</i>	(12 vrsta)
Rod: <i>Parvovirus</i>	(12 vrsta)
Rod: <i>Erythrovirus</i>	(4 vrste)
Vrsta: <i>Pig-tailed macaque parvovirus</i>	
Vrsta: <i>Rhesus macaque parvovirus</i>	
Vrsta: <i>Simian parvovirus</i>	
Vrsta: <i>Human parvovirus B19</i>	

Preuzeto sa sajta *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

1.1.3. Rod *Erythrovirus*

Humani parvovirus B19 je prvi otkriveni i ujedno i tipičan predstavnik roda *Erythrovirus*.

Iako humani parvovirus B19 ima neke osnovne karakteristike familije Parvoviridae (jednolančanu DNK male dužine sa terminalnim ponovcima) ima i neke karakteristike koje se razlikuju od do tada poznatih pripadnika ove familije. Genom B19 virusa ima identične terminalne ponovke koji su znatno duži u odnosu na terminalne ponovke drugih parvovirusa (Deiss i sar., 1990), samo jedan promotor i dva alternativna mesta za terminaciju transkripcije (Doerig i sar., 1987; Ozawa i sar., 1987). Filogenetska analiza je pokazala udaljenost u odnosu na do tada poznate rodove *Parvovirus* i *Dependovirus* pa je definisan novi rod, *Erythrovirus*, koji je dobio naziv zbog izrazitog tropizma B19 virusa za ćelije eritroidne loze (Tattersall, 2006). U početku je B19 bio jedini virus u ovom rodu, ali su kasnije u njega svrstani i virusi koji inficiraju druge primata, kao što su *Simian parvovirus* (O'Sullivan i sar., 1994), *Rhesus macaque parvovirus* i *Pig-tailed macaque parvovirus* (Green i sar., 2000).

Dugo je B19 smatran jedinim humanim patogenom familije Parvoviridae, ali su kasnije otkriveni i drugi: humani bocavirus HBoV, (Allander i sar., 2005), parvovirus 4 PARV4, (Jones i sar., 2005) i slična varijanta parvovirus 5 PARV5 (Fryer i sar., 2006). O ovim virusima do sada postoji jako malo podataka.

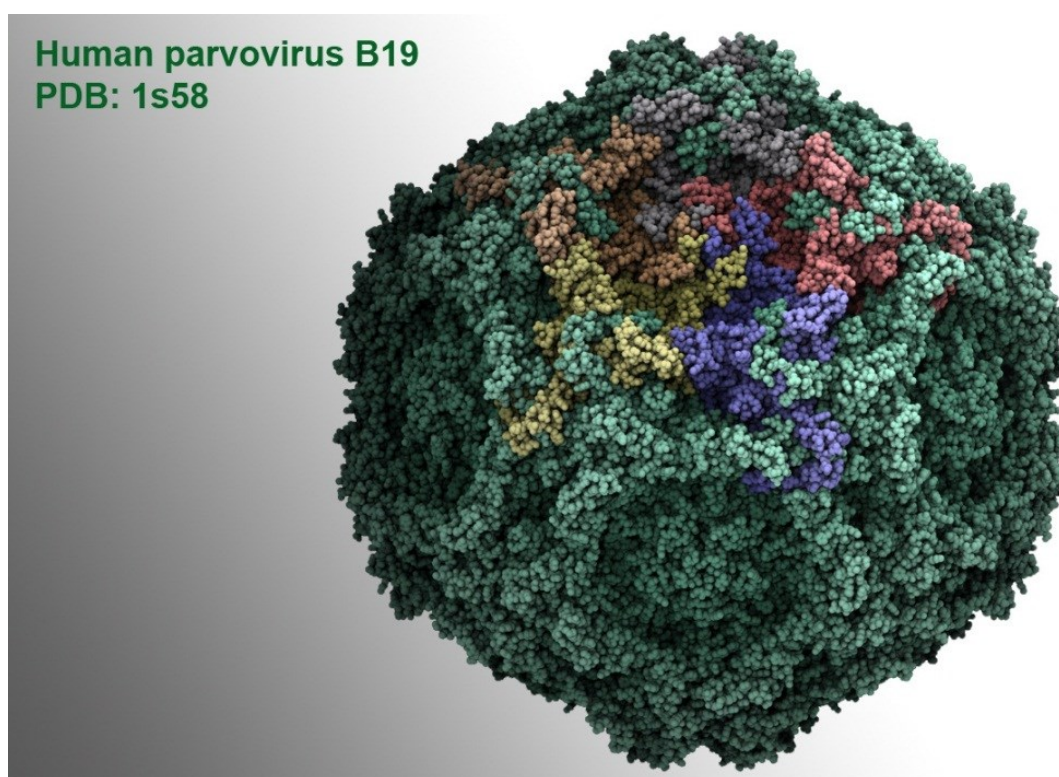
1.2 Struktura B19 virusa

1.2.1. Građa viriona

Virion B19 je jednostavne strukture i čine ga kapsid u čiji sastav ulaze samo dva proteina i molekul jednolančane DNK (pozitivan ili negativan lanac). Virusne čestice su bez omotača, prečnika 22-24nm i oblika ikosaedra (Slika 1.1).

Molekulska težina B19 viriona je oko 5.6×10^3 kDa, od čega je oko 80% proteina i oko 20% DNK. Virion se sastoji od 60 molekula VP1 (virusni protein 1) ili VP2

(virusni protein 2) proteina (Heegaard i Brown 2002). VP2 je glavni protein kapsida, težine oko 58 kDa i čini oko 96% proteina kapsida (Ozawa i Young, 1987). VP1 je „produžena varijanta“ proteina VP2, pošto sadrži dodatnih 227 aminokiselina (ak) na N-terminusu - tzv. VP1u region (VP1 jedinstveni region, eng. *VP1 unique*). Postoje podaci da se VP1u region proteina nalazi na spoljašnjosti zrele virusne čestice (Rosenfeld i sar., 1992; Kawase i sar., 1995), ali su noviji podaci pokazali da se VP1u region „izlaže“ na površini viriona tek nakon vezivanja viriona za receptore na ćeliji (Ros i sar., 2006). Za razliku od drugih parvovirusa na površini kapsida na elektronskim mikrofotografijama nisu uočeni karakteristični šiljci na uglovima ikosaedra.



Slika 1.1 Struktura humanog parvovirusa B19

Protein Data Bank (PDB) kod 1s58 (Kaufmann i sar., 2004, preuzeto sa sajta <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=b19>)

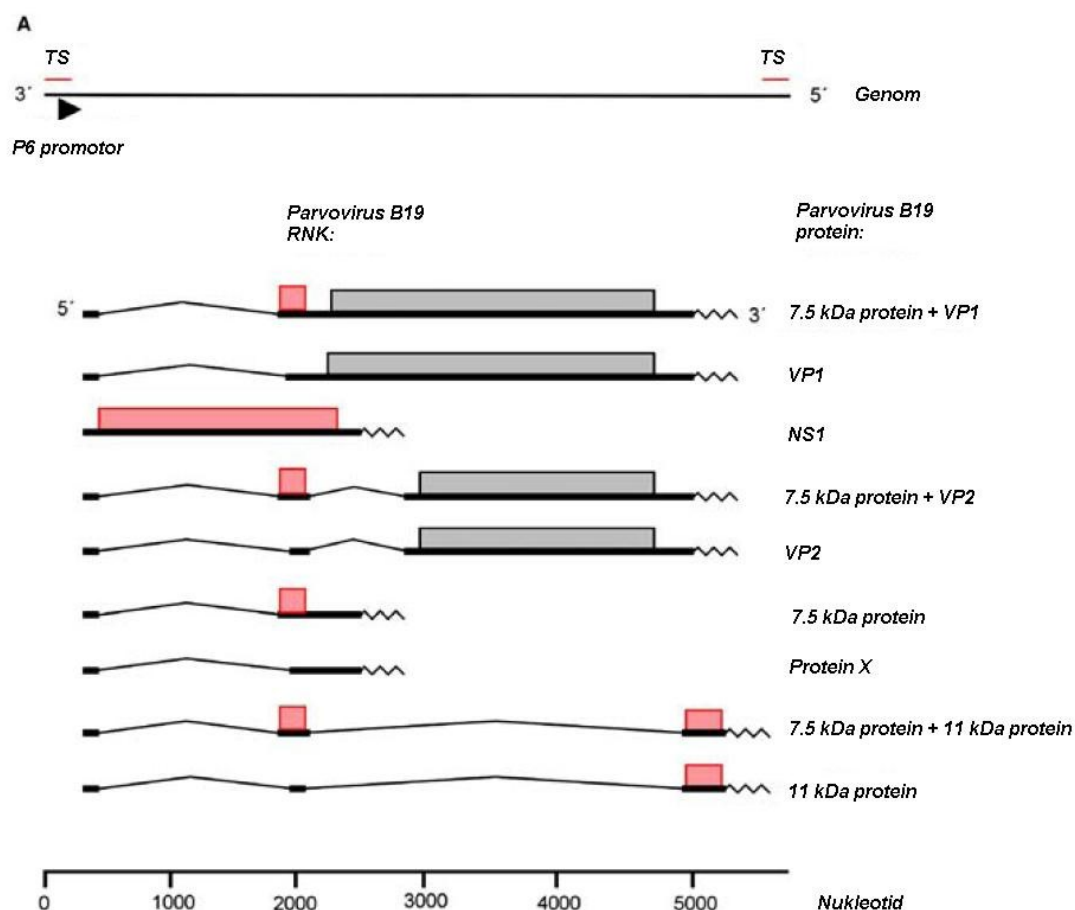
Male dimenzije, jednostavna struktura i nedostatak omotača čine B19 izuzetno otpornim na uobičajene metode za inaktivaciju virusa – stabilan je na 56°C do 60 minuta, u pH opsegu od 3 do 9, nije osetljiv na tretman lipidnim rastvaračima i prolazi kroz filtere uobičajenih dimenzija pora. Virus se može inaktivirati formalinom, β-propiolaktonom i gama zračenjem (Heegaard i Brown 2002).

1.2.2 Organizacija genoma B19 virusa

Genom B19 virusa je jednolančana DNK dužine 5596 nukleotida (nt). Kodirajući deo čini 4830 nt, a genom je sa svake strane ograničen sa po 383 nt koja ulaze u sastav terminalnih sekvenci (TS). Terminalne sekvence imaju palindromsku strukturu i mogu formirati strukturu ukosnice koja ima ulogu prajmera za sintezu komplementarnog lanca što omogućava replikaciju genoma.

Sve pozicije nukleotida u genomu B19 u daljem tekstu biće navedene u odnosu na referentnu sekvencu, AY386330/NC_000883, Zhi i sar., 2004.

U genomu B19 virusa otvoreni okviri čitanja nalaze se samo na minus (-) lancu DNK, tako da se na 3'-kraju genoma, sa leve strane, nalazi ORF za nestrukturani protein 1 (NS1), a sa desne strane, na 5'-kraju genoma, ORF za proteine kapsida, VP1 i VP2 (Cotmore i sar., 1986; Ozawa i sar., 1987; Ozawa i sar., 1988). Pored ova dva glavna okvira čitanja, uočena su i tri manja ORF-a: jedan za 7,5kDa protein, jedan za 11 kDa protein, dok za treći manji ORF nije još uvek dokazano da dovodi do sinteze proteina. Na Slici 1.2 ovaj segment označen je znakom pitanja, a u literaturi se citira i kao "protein X" (Servant i sar., 2002., Zhi i sar., 2006, Dong i sar., 2013).

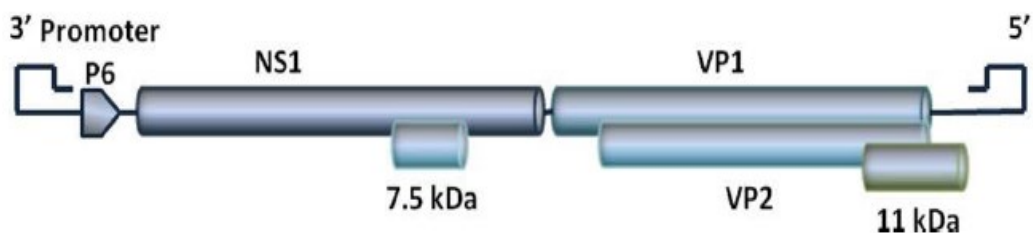


Slika 1.2 Transkripciona mapa B19 virusa

Linija u gornjem delu slike predstavlja genom B19 virusa sa naznačenim terminalnim sekvencama (TS) i regionom promotora – P6. Linije ispod predstavljaju različite primarne transkripte na kojima su introni označeni tankom linijom, egzoni debljom linijom a signali za poliadenilaciju cik-cak linijom. Proteini virusa označeni su pravougaonim formama sive (strukturni proteini) i roze boje (nestrukturni proteini). Pozicija nukleotida na ovoj slici označena je u odnosu na izolat M13178 (modifikovano prema von Landenberg i sar., 2007).

Transkripcija genoma B19 počinje od P6 promotora, koji se nalazi na samom 3'-kraju genoma. Prilikom transkripcije dolazi do sinteze najmanje devet preklapajućih iRNK, koje alternativnim splajsovanjem daju iRNK za do sada identifikovane proteine poznatih funkcija: NS1, VP1, VP2, kao i za male proteine sa do sada nerazjašnjenim funkcijama – proteine od 11k Da i od 7,5k Da (Slika 1.3).

Pored navedenih, pretpostavlja se da se sa alternativnog okvira čitanja (ARF, eng. *alternative reading frame*), od 2874 do 3119 nt, sintetiše iRNK za protein X (Servant i sar., 2002, Dong i sar., 2013).



Slika 1.3 Shematski prikaz lokacije promotora i otvorenih okvira čitanja za poznate proteine B19 virusa (Norja, 2012)

Svi transkripti imaju kratku vodeću (eng. *leader*) sekvencu na 5'-kraju, dužine oko 60 nukleotida, i svi, osim transkripta za NS1 protein, imaju velike introne (Ozawa i sar., 1987). Koriste se dva nezavisna mesta za poliadenilaciju, jedno u sredini genoma za transkripte za NS1 protein i za 7.5k Da protein, a drugo na 5'-kraju genoma, za strukturne proteine i 11 kDa protein. Signal za poliadenilaciju u sredini genoma je neuobičajen i nije „apsolutan“, odnosno dozvoljava delimičan nastavak transkripcije i regiona iz drugog okvira čitanja, što omogućava prepisivanje gena za strukturne proteine.

Smatra se da odnos ekspresije nestrukturnih i strukturnih gena zavisi od faktora koji deluju upravo na poliadenilaciju na ovom mestu, od čega zavisi i izraženi tropizam B19 virusa (Liu i sar., 1992; Yoto i sar., 2006). U ćelijama u kojima je moguće razmnožavanje B19 virusa dominantni su transkripti strukturnih gena, dok su u B19 nepermisivnim ćelijama dominantni transkripti nestrukturnih gena, odnosno signal za poliadenilaciju u sredini genoma ostaje aktivan (Leruez i sar., 1994).

1.2.3 Karakteristike i funkcije proteina B19

1.2.3.1. Strukturni proteini

Dva strukturna proteina B19 virusa, VP1 i VP2, su kodirana istim okvirom čitanja i to tako da se gen za kraći protein VP2 u potpunosti nalazi u okviru gena za duži VP1 protein, a transkripti za VP1 ili VP2 se dobijaju alternativnim splajsingom (Ozawa i sar., 1988).

Strukturni VP2 protein čini 96% proteina kapsida, kodiraju ga nukleotidi od 3305 do 4969 nt, lanac mu je dužine 554 ak i ima molekulsku masu od 58kDa. (Heegaard i Brown, 2002). VP2 protein ima ulogu u vezivanju virusa za receptore na površini ćelija (Brown i sar., 1993). Smatra se da se na C-terminusu VP2 proteina nalazi signal koji omogućava transport VP2 proteina u nukleus zaražene ćelije, radi sklapanja virusnih čestica (Kaufmann i sar., 2004).

VP1 protein kodira region od 2624 do 4969 nt tako da ovaj protein ima dodatnih 227 ak na N-terminusu, kodiranih VP1u regionom dužine 681 nt koji je jedinstven za VP1 gen (Heegaard i Brown, 2002). VP1 protein ima lanac dužine 781 ak, molekulsku masu od 84kDa i čini 4% proteina kapsida (Heegaard i Brown, 2002). Smatra se da VP1u region sadrži motiv sličan fosfolipazi A2 (eng. *Phospholipase A2* - PLA2,) koji omogućavaju oslobađanje virusa iz endozoma nakon ulaska virusa u ćeliju (Zadori i sar., 2001; Suikkanen i sar., 2003). Oslobađanje virusa iz endozoma je jedna od ključnih faktora za infektivnost virusa, a ovaj zaključak potvrđuju i studije koje pokazuju da virusne čestice bez VP1 proteina nisu infektivne (Zhi i sar., 2006).

Oba strukturna proteina imaju epitope za koja se vezuju neutrališuća antitela (Kajigaya i sar.,1991; Sato i sar., 1991). Imunski odgovor uglavnom izaziva VP1u region, ali i C-terminalni delovi VP2 proteina (Kaufmann i sar., 2004). Iako postoji značajna varijabilnost B19 virusa na nivou nukleotidne sekvence, većina tih supstitucija je tihe (eng. *silent*) zamene, tako da aminokiselinska sekvenca različitih B19 izolata pokazuje 96-97% homologije, dok je serološka unakrsna reaktivnost skoro potpuna (Heegaard i Brown, 2002).

1.2.3.2. Nestrukturni proteini

Nestrukturni protein NS1 je glavni nestrukturni protein B19 virusa, kodira ga genomska sekvenca od 616 do 2631 nt, ima lanac dužine 671 ak i molekulsku težinu od 77 kDa (Heegaard i Brown, 2002). Smatra se, pre svega na osnovu strukture, da NS1 protein ima ulogu u vezivanju za DNK, da deluje kao ATP-aza, helikaza i da ima ulogu transaktivatora transkripcije i to direktnim vezivanjem za P6 promotor, ali i posredno preko ćelijskih transkripcionih faktora (Heegaard i Brown, 2002; Raab i sar., 2002)

U strukturi NS1 proteina uočeni su i opisani motivi u vezi sa smicanjem jednolančane DNK (eng. *single-strand nicking activities*), motivi koji mogu imati ATP-aznu i helikaznu aktivnost, kao i NTP-vezujući domeni. Ovi domeni su konzervirani kod svih parvovirusa i smatra se da imaju važnu ulogu u replikaciji i životnom ciklusu virusa (Heegaard i Brown, 2002). Samo jedna mutacija u NTP-vezujućem domenu NS1 proteina može dovesti do izostanka citotoksičnog efekta. NS1 protein dovodi do smrti ćelija najverovatnije indukcijom apoptoze mehanizmom koji uključuje aktiviranje kaspaze 3 (Moffat i sar., 1998). U inficiranim ćelijama NS1 protein lokalizuje u nukleusu, ima citotoksičan efekat i blokira proliferaciju ćelije (Ozawa i sar., 1988; Srivastava i sar., 1990).

Pored NS1 proteina u inficiranim ćelijama moguća je sinteza još tri nestrukturna virusna proteina, 7,5 kDa proteina, 11 kDa proteina i proteina X, sa manjih alternativnih okvira čitanja.

Funkcije 7,5 kDa proteina (koji kodira genomska sekvenca od 2084-2308 nt) još uvek nisu razjašnjene (Heegaard i Brown, 2002; Zhi i sar., 2006).

Protein X, za koji se pretpostavlja da se sintetiše sa ORF-a koji se nalazi od 2874-3119 nt, bi na osnovu svoje pretpostavljene strukture mogao značajno da utiče na promotor P6 pojačavajući njegovu funkciju (Dong i sar., 2013).

U genomu B19 virusa, u regionu od 4890-5174 nt, nalazi se ORF koji kodira 11 kDa protein. Analiza aminokiselinske sekvence pokazala je u sekvenci 11 kDa proteina prisustvo tri regiona bogata prolinom sa SH3-vezujućim motivima. Ovakvi motivi su često prisutni u signalnim molekulima u ćeliji. Blokiranje ekspresije 11 kDa proteina dovodi do smanjene infektivnosti virusa kao i do izmenjene lokalizacije virusnih proteina u ćeliji – proteini kapsida u odsustvu 11 kDa proteina formiraju klastere u jedru i ne transportuju se u citoplazmu (Zhi i sar., 2006). Noviji radovi pokazuju da 11 kDa protein indukuje apoptozu inficiranih ćelija, i da je apoptotski efekat ovog proteina izraženiji od efekta NS1 proteina (Chen i sar., 2010)

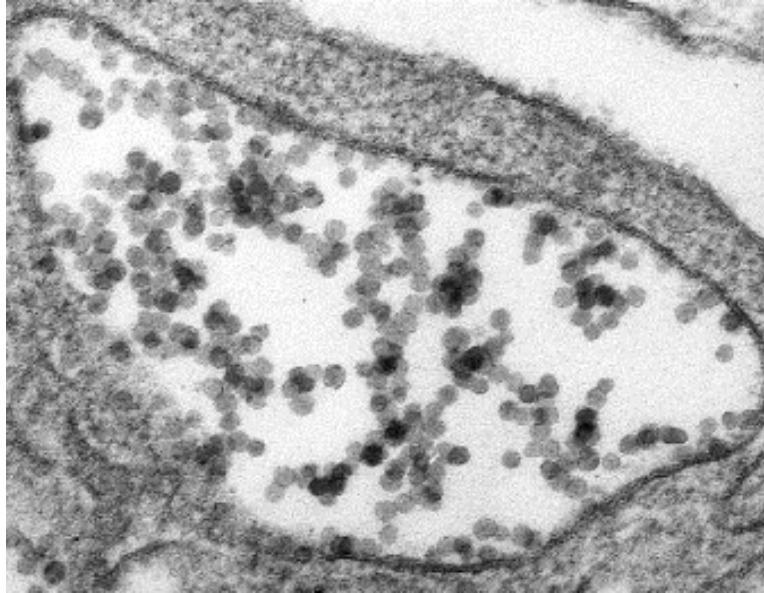
Za sada, potvrđeno je da je za uspešnu proizvodnju i sklapanje virusnih čestica neophodno prisustvo VP1, VP2, NS1 i 11 kDa proteina (Zhi i sar., 2006).

1.3 Životni ciklus parvoB19 virusa

Parvovirus B19, kao virus bez omotača, u ćeliju ulazi procesom endocitoze, nakon vezivanja za receptore. Kapsid B19 virusa, kao što je već objašnjeno, sastoji se od VP2 proteina (95%) i od VP1 proteina (5%) i sadrži domene za vezivanje receptora i koreceptora, a jedan od ključnih domena je PLA2 (fosfolipaza A2) domen na VP1u regionu VP1 proteina (Servant-Delmas i sar., 2010).

B19 virus ima izraženi tropizam za ćelije eritroidne loze. Glavni receptor za koji se B19 virus vezuje je P antigen odnosno globozid (Brown i sar., 1993), a kao koreceptori su identifikovani $\alpha 5\beta 1$ integrin i Ku80 DNK vezujući protein (Servant-Delmas i sar., 2010).

Nakon vezivanja za receptor i koreceptore parvovirus ulazi u citoplazmu endocitozom. Endozomi se lokalizuju u blizini jedra, a nizak pH u unutrašnjosti endozoma dovodi do konformacionih promena i do izlaganja VP1u regiona na površini kapsida. Virusne čestice mogu se videti u endozomima inficiranih ćelija korišćenjem elektronske mikroskopije (Slika 1.4). U okviru VP1u regiona postaje aktivan PLA2 domen (od 135 do 195 ak), koji ima ulogu u razgradnji endozomalne membrane i u oslobađanju virusne čestice u blizini jedra. Signali za nuklearnu lokalizaciju identifikovani su u C-terminalnom regionu VP2 proteina, ali još uvek nije dokazano da li i na koji način oni omogućavaju translokaciju virusnog genoma u jedro (Servant-Delmas i sar., 2010).



Slika 1.4 Elektronska mikrofografija virusnih čestica u endocitotskoj vezikuli ćelije eritroidne loze u uzorku koštane srži pacijenta sa akutnom infekcijom B19 virusom (von Landenberg i sar., 2007).

Genom B19 virusa je (+) ili (-) lanac DNK. Oba lanca, i (+) i (-) služe kao matrica za replikaciju, dok (-) lanac služi kao matrica za transkripciju. Transkripcijom nastaje najmanje 9 transkripata sa kojih se vrši sinteza virusnih proteina. Nestrukturani protein NS1 je jak aktivator transkripcije koji interaguje i sa brojnim ćelijskim transkripcionim faktorima i učestvuje u replikaciji virusne DNK (Servant-Delmas i sar., 2010).

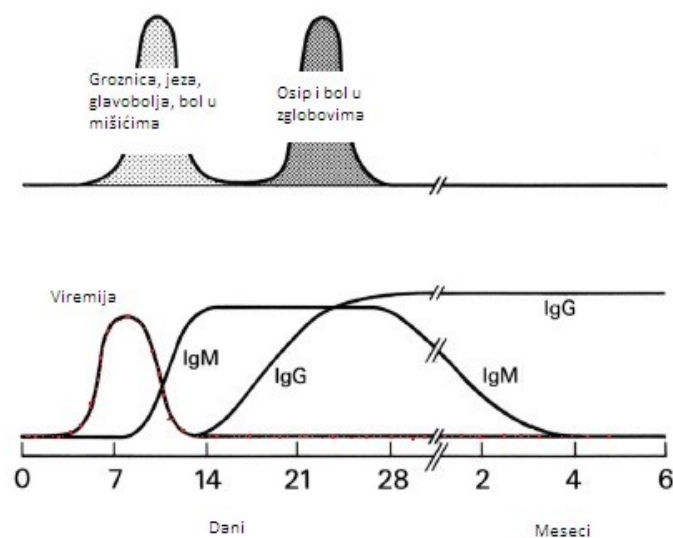
Nakon replikacije DNK, transkripcije i translacije virusnih proteina dolazi do sklapanja viriona, lize ćelije domaćina i oslobađanja virusnih čestica u okolinu (Heegaard i Brown 2002).

1.4 Kliničke i epidemiološke karakteristike B19 virusne infekcije

1.4.1. Klinički tok infekcije, simptomi oboljenja i dijagnoza

1.4.1.1. Tok infekcije

Studijom koja je sprovedena kod asimptomatskih dobrovoljaca (Anderson i sar., 1985) pokazan je uobičajen tok B19 infekcije. Odgovor je bifazni – prvo, nedelju dana nakon infekcije, detektuje se viremija u krvi zajedno sa blagim simptomoma koji uključuju porast telesne temperature, bol u mišićima, svrab i ekskreciju virusa iz respiratornog trakta.



Slika 1.5 Simptomi, nivo viremije i antitela u uobičajenom toku B19 infekcije.

Modifikovano prema Heegaard i Brown (2002).

Druga faza, 17-18 dana nakon infekcije podrazumeva osip, svrab ili bol u zglobovima i posredovana je antigen-antitelo imunskim kompleksima. IgM antitela počinju da se sintetišu 10 do 12 dana nakon infekcije, u vreme najveće koncentracije virusa u krvi. IgM antitela su prisutna u serumu pacijenata oko 3 meseca, nekada i duže. IgG antitela mogu se detektovati oko 2 nedelje nakon infekcije, dostižu maksimum posle nekoliko nedelja i trajno ostaju u krvi pacijenata, pružajući imunitet od ponovne infekcije (Heegaard i Brown 2002).

1.4.1.2. Simptomi oboljenja

Infekcija imunokompetentnog domaćina može biti asimptomatska, može dovesti do osipa, anemije, bola u zglobovima i brojnih drugih simptoma a posebne probleme infekcija stvara u trudnoći, kada može dovesti do ozbiljnih komplikacija. Kod imunokompromitovanih pacijenata B19 infekcija može dovesti do hronične aplazije crvene krvne loze (eng. *Pure Red Cell Aplasia* - PRCA), a kod hematoloških pacijenata koji imaju povećan obrt ćelija krvne loze do prolazne aplastične krize.

Asimptomatska infekcija

Iako se B19 virus dovodi u vezu sa različitim i brojnim simptomima veliki broj infekcija prođe bez simptoma, ili sa nekarakterističnim simptomima nalik prehladi (Heegaard i Brown 2002). Jedna studija je pokazala da se 25% inficiranih osoba ne seća simptoma koji bi bili specifični za infekciju (Woolf i sar., 1989). Infekcija je najčešće blaga i prolazi bez intervencije i lečenja. Ulogu u ispoljavanju simptoma verovatno imaju i varijacije u genima samih pacijenata (Kerr, 2005), a za sada nije pokazano da genotip B19 virusa ima uticaja na težinu infekcije ili na imunski odgovor (Ekman i sar., 2007).

Anemija

B19 virus inficira pre svega eritroidne progenitorske ćelije, odnosno prekursore ćelija crvene krvne loze u koštanoj srži. Njihova liza dovodi do prolazne anemije, pri čemu se broj retikulocita (nezrelih crvenih krvnih zrnaca), ali i limfocita, neutrofila i trombocita drastično smanjuje otprilike 10 dana nakon infekcije (Heegaard i Brown 2002). Kod imunokompetentnih pacijenata broj retikulocita i koncentracija hemoglobina u krvi vraćaju se na normalan nivo 7-10 dana posle infekcije. Kod hematoloških pacijenata kod kojih je životni vek eritrocita skraćen, broj retikulocita i koncentracija hemoglobina u krvi se teže vraćaju na normalne vrednosti pa infekcija B19 virusom može dovesti do aplastične krize (Pattison i sar., 1981). Kod imunokompromitovanih pacijenata, koji imaju teškoća sa suzbijanjem viremije, anemija može postati hronična (Kurtzman i sar., 1989).

Erythema infectiosum

Zbog karakterističnog izgleda osipa, nalik na „ošamaren obraz“, ova bolest je u engleskom jeziku dobila naziv „*slapped cheek*“. Kao posebno oboljenje bolest je

1896. godine izdvojio lekar T. Escherich, ona je 1899. dobila naziv *erythema infectiosum*, a 1905. godine klasifikovana je kao „peta bolest“ na listi od šest uobičajenih dečijih osipa (Altman K, 1982). *Erythema infectiosum* je tek 1983. godine dovedena u vezu sa B19 infekcijom (Anderson i sar., 1984). Osip je najčešći simptom infekcije, obično se javlja 18 dana nakon infekcije sa pojavom B19 IgG antitela (Heegaard i Brown, 2002). Osip počinje na obrazima, ali se širi i na trup i na udove i sličan je osipu koji izazivaju drugi virusi (Slika 1.6).



Slika 1.6 Dete staro 16 meseci sa dijagnozom *Erythema infectiosum*
(Autor Andrew Kerr, izvor Wikipedia)

Artritis i bol u zgbovima (eng. *arthritis, arthralgia*)

Kod dece sa osipom bol u zgbovima se javja u manje od 10% slučajeva, dok je kod odraslih bol u zgbovima najučestaliji simptom kod 60% žena i 30% muškaraca (Heegaard i Brown, 2002). Bol u zgbovima javlja se u isto vreme kad i porast koncentracije B19 antitela i smatra se da je izazvan upravo imunim odgovorom na infekciju. Bol je simetričan (na obe strane tela) i uglavnom zahvata šake, zglob

ručja i kolena, a u nekim slučajevima bol postaje hroničan i razvija se reumatoidni artritis (White i sar., 1985), odnosno hronični zapaljenjski proces u vezivnom tkivu zglobova.

B19 infekcija u trudnoći

Oko 40% žena u reproduktivnim godinama još uvek nije preležalo B19 infekciju. Ukoliko do akutne infekcije dođe u trudnoći ona se može preneti na fetus. Infekcija fetusa, takođe, može biti asimptomatska, ali može dovesti i do fetalne (kongenitalne) anemije, pobačaja, fetalnog hidropsa (lat. *Hydrops fetalis*) i smrti ploda sa ili bez prethodnog razvoja hidropsa (Brown i sar., 1984; Enders i sar., 2006). Hidrops se može uočiti ultrazvučnim pregledom i podrazumeva nagomilavanje tkivne tečnosti u organima i pod kožom fetusa usled izrazite anemije. Najozbiljnije komplikacije, hidrops i smrt ploda dešavaju se kod približno 11% osoba inficiranih B19 virusom u prve 22 nedelje trudnoće (Miller i sar., 1998; Enders i sar., 2004), ali se mogu dogoditi i ako do infekcije dođe u poznijoj trudnoći (Norbeck i sar., 2002). Do prolaska simptoma najčešće dolazi spontano i terapija nije indikovana. Ipak, u slučaju infekcije ploda praćene ozbiljnom anemijom ili hidropsom primenjuje se intrauterina transfuzija eritrocita, čime se postiže značajno smanjenje smrtnosti ploda (Heegaard i Brown, 2002; Broliden i sar., 2006).

Ostale manifestacije B19 infekcije

Infekcija B19 virusom može dovesti i do trombocitopenije (verovatno usled citopatološkog efekta NS1 proteina na formiranje kolonija megakariocita), miokarditisa i neuroloških simptoma, ali mehanizmi ovih promena još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Heegaard i Brown, 2002).

Perzistentna infekcija

Infekcija B19 virusom kod najvećeg broja pacijenata spontano prolazi bez posledica i sa doživotnim imunitetom na B19, dok je kod imunokompromitovanih pacijenata zadržavanje virusa u organizmu izvesnije. Međutim, kod nekih imunokompetentnih pacijenata i posle dužeg perioda moguće je detektovati virusnu DNK u krvi, a postoje podaci i o perzistiranju virusa u tkivima i organima,

najčešće sa nižim viremijama nego u toku akutne infekcije (Liefeldt i sar., 2005, Kleinman i sar., 2007). Mehanizmi i značaj ovakvog hroničnog prisustva virusa još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Servant-Delmas i sar., 2010).

Autoimuna oboljenja i B19

Autoimune reakcije koje se dovode u vezu sa B19 infekcijom manifestuju se na nivou zglobova (artritis, juvenilni idiopatski artritis, reumatoidni artritis), vezivnih tkiva i krvnih sudova (sistemski lupus, vaskulitis) i krvnih ćelija (autoimuna neutropenija, autoimuna trombocitopenija, autoimuna hemolitička anemija). Perzistencija B19 virusa u organizmu verovatno dovodi do razvoja autoimunog odgovora (Lunardi i sar., 2008), a pokazana je korelacija između perzistentne B19 infekcije i prisustva antifosfolipidnih antitela (von Landenberg i sar., 2007). Mehanizmi za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u autoimunim reakcijama su vezani za molekularnu mimikriju (Reitblat i sar., 2000) i razvoj antifosfolipidnih antitela, što se povezuje sa PLA2 domenom VP1 proteina (von Landenberg i sar., 2007). U druge moguće uzroke autoimunih reakcija ubraja se i povećana ekspresija tumorskog faktora nekroze (TNF, eng. *tumor necrosis factor*) i interleukina 6 (IL-6), koje izaziva NS1 protein (Lunardi i sar., 2008).

1.4.1.3. Dijagnoza i terapija

Dijagnozu je teško postaviti isključivo na osnovu simptoma, pošto oni nisu specifični samo za B19 infekciju. Nakon sumnje na B19 infekciju najčešće se pristupa imunološkim analizama iz krvi, pa se na osnovu dobijenih rezultata može doneti sud o prisustvu i fazi infekcije. Detekcija antitela na proteine kapsida koristi se za dijagnozu akutne (IgM, IgM/IgG) ili prethodne infekcije (samo IgG), dok prisustvo antitela na NS1 protein može ukazivati na izmenjen tok infekcije i postojanje perzistentne infekcije, odnosno na prisustvo virusa i u nepermisivnim ćelijama (von Poblitzki i sar., 1995). U slučaju da je bitna preciznija rana procena viremije (i pre porasta antitela u krvi), pre svega kod rizičnih grupa pacijenata, PCR metodama se određuje prisustvo i broj virusne genomske DNK. Virusne čestice mogu se primetiti i elektronskom mikroskopijom, a prisustvo gigantskih pronormoblasta u citopatološkom nalazu takođe može ukazati na B19 infekciju.

Terapija kod uobičajenih infekcija najčešće nije indikovana. Kod pacijenata koji su u povećanom riziku zbog osnovnih imunoloških ili hematoloških oboljenja

pozitivni rezultati postižu se intravenskom terapijom imunoglobulinima ili transfuzijom eritrocita, a intrauterina transfuzija eritrocita daje dobre rezultate u terapiji ozbiljnih komplikacija kod fetusa (Heegaard i Brown, 2002).

1.4.2. Putevi prenosa, prevalenca i učestalost infekcije

B19 je čest patogen, prisutan u celom svetu. Najčešći put prenosa je respiratorni, putem aerosola ili preko zaraženih površina. Pored toga, B19 infekcija se može preneti i putem krvi (i preko zaraženih krvnih derivata), ali i vertikalnim putem sa majke na fetus (Heegaard i Brown, 2002).

B19 virus otporan je na većinu uobičajenih postupaka za inaktivaciju virusa pa postoji značajan rizik od infekcije putem zaraženih derivata krvi (Brown i Young, 1995, Schmidt i sar., 2001). Veća bezbednost krvnih derivata pre svega za rizične populacije obezbeđena je kontrolisanjem *pool*-ova plazme na prisustvo B19 virusa i ograničavanjem količine virusne DNK u polaznom materijalu (Baylis, 2008.). Termin „*pool*“ usvojen je iz engleskog jezika i označava materijal dobijen spajanjem više individualnih jedinica plazme, koji se koristi kao polazni materijal u daljoj proizvodnji i/ili testiranju. Transfuzija plazme koja je sadržala manje od 10^4 IU/ml uglavnom nije dovođila do serokonverzije (Blumel i sar., 2002), pa je ta granica od januara 2004. godine u Evropskoj farmakopeji definisana kao najveća dozvoljena količina B19 DNK u plazmi koja se koristi u proizvodnji anti-D imunoglobulina (Ph.Eur. 2013, monografija 1646).

Prenos virusa sa majke na fetus je olakšan prisustvom B19 receptora u placenti, a infekcija ploda može dovesti do ozbiljnih komplikacija (Brown i sar., 1984; Jordan i DeLoia, 1999).

Prevalenca IgG antitela na B19 virus varira u opsegu od 2-15% kod dece do 5 godina, 15-60% kod dece od 6 do 19 godina, 30-60% kod odraslih i više od 85% u gerijatrijskoj populaciji (Heegaard i Brown, 2002). Učestalost viremije u krvi u različitim ispitivanim humanim populacijama je relativno niska (1:17346, Koppelman i sar., 2004, 1:20000-1:50000, Brown i sar., 2001, 1:15000 Latinen i sar., 2002), a može biti značajno viša u vreme epidemije (1: 260, Brown i sar., 2001, 1:167-1:1420 Schmidt i sar., 2001). Prema dostupnim podacima, do epidemija dolazi jednom u svake 3-4 godine, najčešće u periodu kasne zime ili ranog proleća (Servant-Delmas i sar., 2010).

1.5 Varijabilnost virusne sekvence

Visok genetički diverzitet i visoka stopa mutacija su karakteristika svih pripadnika familije Parvoviridae. Na osnovu ograničenog broja dostupnih nukleotidnih sekvenci u početku se mislilo da je genetička varijabilnost B19 virusa niska, ali je već na osnovu analize sekvence 35 izolata primećeno da je genetička distanca pojedinih izolata znatno viša – do 14.2% na osnovu skoro celih sekvenci, odnosno do 23.2% u regionu 11 kDa proteina i čak do 25.7% u regionu promotora P6 (Servant i sar., 2002).

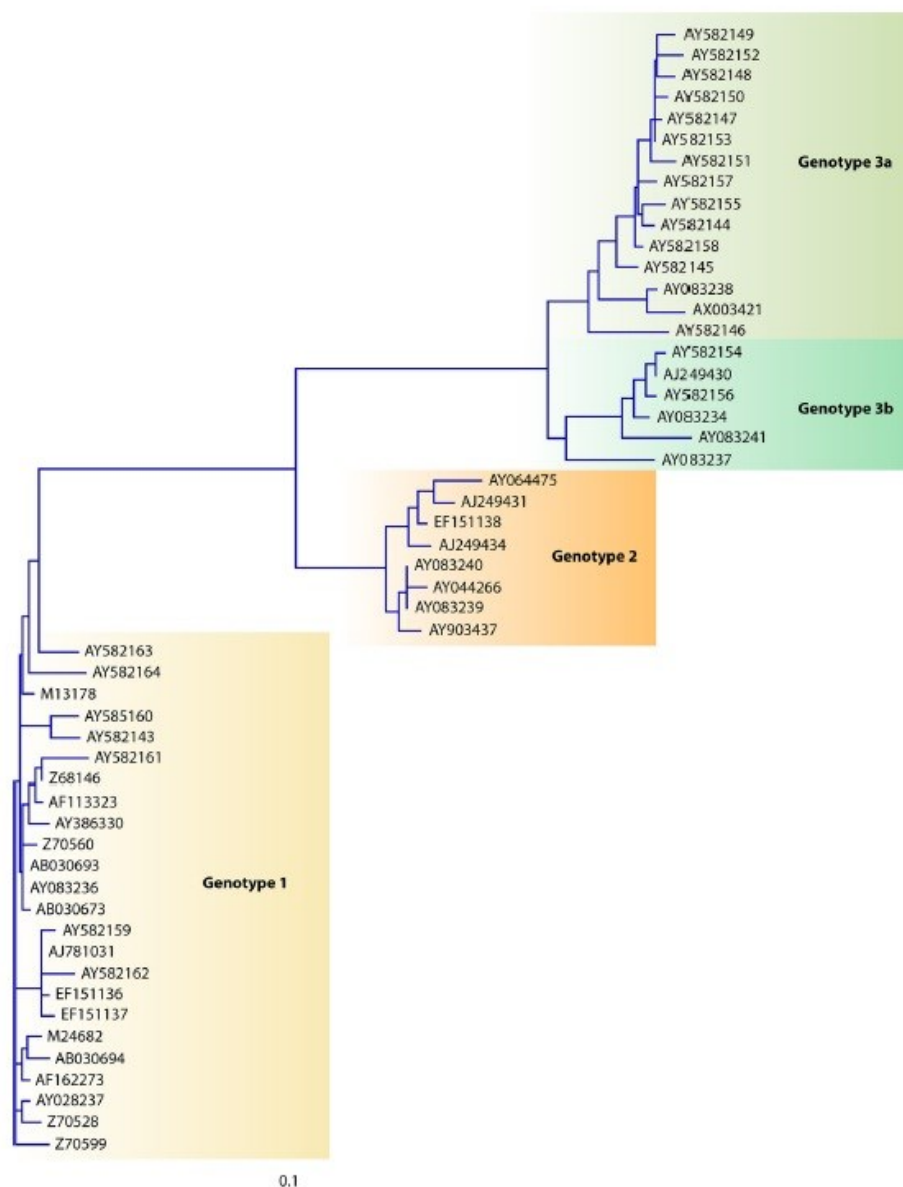
Genetički varijabilne B19 sekvence mogu se filogenetskom analizom na osnovu celih ili parcijalnih sekvenci grupisati u tri genotipa obeležena arapskim brojevima 1, 2 i 3, pri čemu se u okviru genotipa 3, koji je i genetički najraznovrsniji, mogu uočiti podtipovi 3a i 3b (Servant i sar., 2002, Parsyan i sar., 2007).

Sa epidemiološke tačke gledišta, važno je napomenuti da prevalenca pojedinih genotipova varira i zavisi od geografskog poreka uzorka, populacije i tipa uzorka. U uzorcima biopsije genotip 1 je zastupljen u 28-81% slučajeva, genotip 2 od 8-71%, a genotip 3 od 0-50% (Servant-Delmas i sar., 2010). U uzorcima plazma *pool*-ova iz Finske, svi B19 pozitivni uzorci bili su genotipa 1 (Hokynar i sar., 2004), dok je kod davalaca krvi iz Gane detektovan samo genotip 3 (Candotti i sar., 2004).

Studije pokazuju da su genotipovi 1 i 2 bili podjednako zastupljeni pre oko 50 godina, dok je kasnije, u toku 1960-tih godina genotip 2 iščezao i nije dokazan kod pacijenata rođenih posle 1973. godine (Norja i sar., 2006). Filogenetska analiza sekvenci virusa iz 11 zemalja u Evropi, Aziji i zapadnoj Africi pokazala je da je u ovom trenutku dominantan genotip 1, a da se može očekivati širenje genotipa 3b (Hubschen i sar., 2009).

Prema dosadašnjim podacima svi genotipovi imaju slične funkcionalne, strukturne i imunološke karakteristike i čine jedan serotip (Ekman i sar., 2007).

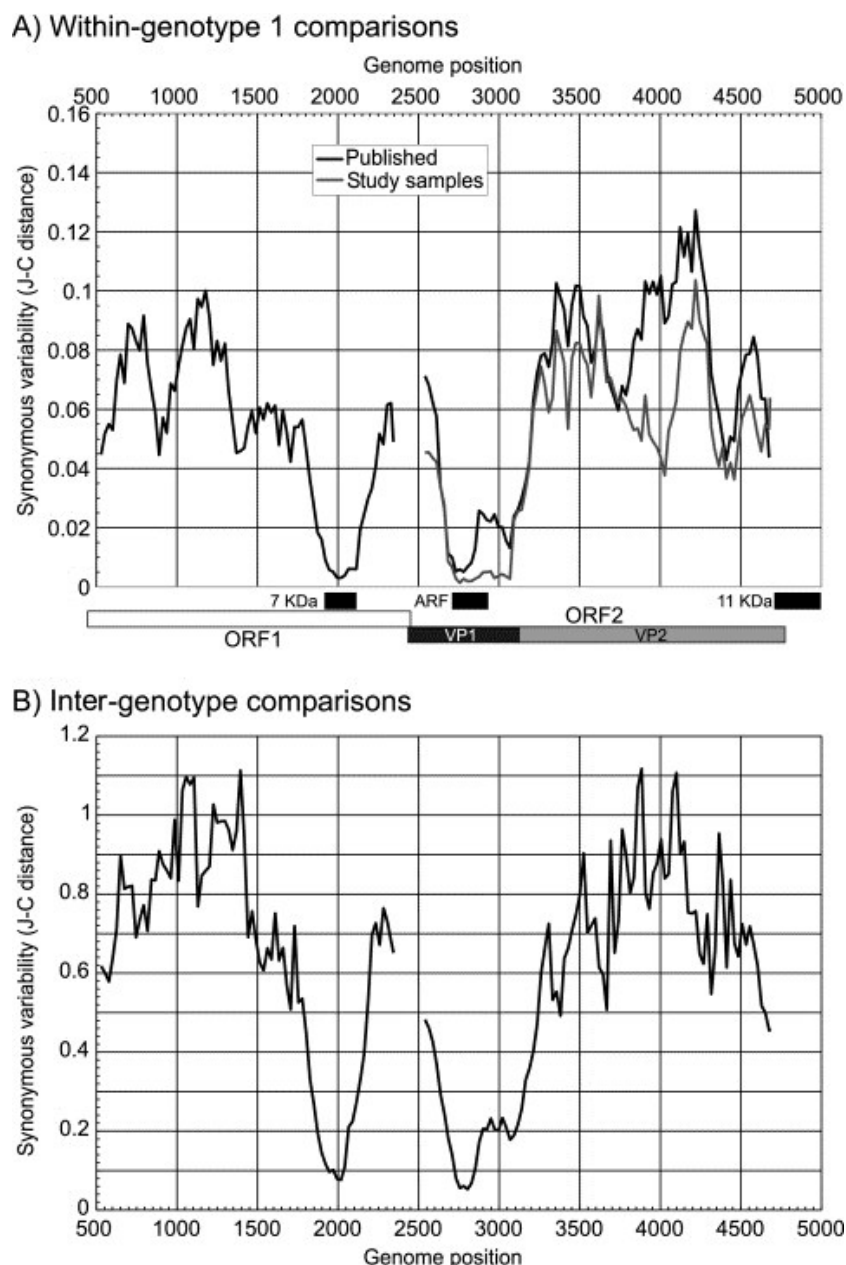
Filogenetski odnosi između izolata genotipa 1 (prototip pvbua, acc.no. M13178), genotipa 2 (prototip Lali, acc.no. AY044266 i A6, acc.no. AY064475), genotipa 3a (prototip V9, acc.no. AX003421) i 3b (prototip D91.1, acc.no. AY083234) prikazani su na Slici 1.7.



Slika 1.7 Filogenetski odnosi između humanih eritrovirusa na osnovu dela genoma koji pripada NS1-i VP1u genima (858 nt) Analiza sekvence urađena je upotrebom neighbor-joining algoritma na osnovu metode Kimura 2 parameter distance estimation (Servant-Delmas i sar., 2010).

Genetička varijabilnost može se primetiti u svim delovima genoma, sa najvećim vrednostima u regionu promotora P6 (> 20%, Gallinella i sar., 2003, Ekman i sar., 2007). Norja i sar. (2008), pokazali su, analizom u okviru genotipa 1 i između različitih B19 genotipova, da postoje tri konzervisana regiona u genomu u kojima je varijabilnost drastično smanjena (Slika 1.8). Ovi regioni nalaze se u okviru ORF1 (na mestu preklapanja sa manjim okvirom čitanja za 7.5 kDa protein), u okviru ORF2 (na mestu preklapanja delova genoma koji kodiraju VP1/VP2 i 11 kDa protein, i na mestu preklapanja VP1u regiona sa manjim alternativnim okvirom

okvira čitanja (ARF), koji verovatno kodira protein X, Slika 1.8). Navedeni autori su analizom genetičke varijabilnosti na osnovu dela genoma koji kodira deo VP1/VP2 i ne obuhvata ove visoko konzervisane regione pokazali da je stopa mutacija 4×10^{-4} nukleotidnih zamena/mestu/godini, dok je stepen sinonimnih zamena još veći i iznosi 18×10^{-4} nukleotidnih zamena/mestu/godini. Stopa mutacija od $1-2 \times 10^{-4}$ nukleotidnih zamena po mestu godišnje je u rangju ssRNK virusa (Parsyan i sar., 2007).



Slika 1.8 Varijabilnost ORF1 i ORF2 kodirajućih sekvenci merena u okviru istog genotipa (A) i različitih genotipova (B). Norja i sar., 2008.

Visoka učestalost nukleotidnih supstitucija daje B19 virusu mogućnost brzih adaptivnih promena koje su uglavnom karakteristika RNK virusa. Na osnovu dobijenih podataka Norja i sar. (2008) predviđaju da je zajednička predačka varijanta za viruse genotipa 1 postojala između 1959. i 1965. godine, što se uklapa u epidemiološke podatke prema kojima je u toku 1960-tih godina genotip 2 zamenjen genotipom 1. Zamene jednog genotipa drugim primećene su i kod drugih virusa. Za hepatitis C virus (HCV) Stamenković i saradnici (2000) su pokazali da dolazi do postepene zamene najučestalijeg HCV genotipa 1b genotipom 3.

Visok stepen evolutivnih promena i značajna varijabilnost genoma predstavljaju problem za pouzdanu dijagnostiku ovog virusa koji je, s obzirom na svoje karakteristike, potencijalni kontaminant kako krvi odnosno plazme tako i lekova proizvedenih iz krvi, krvne plazme i drugih derivata krvi (Baylis, 2008, Schmidt i sar., 2001). Izvestan broj naučnih radova za temu ima upravo genetičku varijabilnost parvoB19 virusa (Servant i sar., 2002; Gallinella i sar., 2003; Ekman i sar., 2007; Parsyan i sar., 2007; Norja i sar., 2008; Hubschen i sar., 2009; Dina i sar., 2011; Molenaar-de Backer i sar., 2012). Radovi u kojima se analizira mehanizam nastanka i održavanja te genetičke varijabilnosti još uvek su malobrojni.

Broj skoro celih sekvenci u bazama podataka raste, ali je taj porast za period od 10 godina relativno skroman – 2002. godine je u bazama podataka bilo dostupno oko 35 skoro celih sekvenci (Servant i sar., 2002) a 2012. godine smo za potrebe ovog rada iz baze izdvojili 146 celih i skoro celih sekvenci. Za neke regije sveta podaci o sekvenci parvoB19 virusa su vrlo ograničeni – većina analiziranih izolata je iz Evrope i sa dalekog istoka (Japan, Vijetnam). Samim tim, i podaci o varijabilnosti B19 virusa na nivou celih genoma još uvek su zasnovani na analizi relativno malog broja sekvenci.

2 Ciljevi

- Proceniti učestalost B19 virusa u uzorcima plazme dobrovoljnih davalaca krvi (zdrave populacije) i populacije pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju u Republici Srbiji;
- Kod slučajeva sa detektovanom B19 infekcijom odrediti molekularno genetske karakteristike virusnog izolata;
- Odrediti evolutivnu dinamiku varijabilnosti parvo B19 virusa za glavne (NS1, VP1, VP2) i male virusne proteine (11 kDa, 7.5 kDa, protein X);
- Odrediti evolutivne odnose na osnovu nukleotidnih distanci B19 izolata iz Srbije međusobno i u odnosu na genomske sekvence odgovarajućeg genotipa, koje su dostupne u nukleotidnim bazama podataka;
- Definisati filogenetske odnose izolata iz Srbije u odnosu na izolate iz Evrope i celog sveta;
- Odrediti karakteristike virusnih nukleotidnih sekvenci izolovanih iz B19 pozitivnih uzoraka iz Srbije, u odnosu na referentnu sekvencu odgovarajućeg genotipa.

3 Materijal i metode

3.1 Materijal

U radu su korišćeni uzorci plazme i krvi pacijenata sa simptomima infekcije, uzorci plazme dobrovoljnih davalaca krvi, referentni standardi i podaci iz nukleotidnih baza podataka.

3.1.1 Uzorci krvi i plazme pacijenata

U radu su korišćeni uzorci dobrovoljnih davalaca krvi iz Centra za transfuziju Kliničko bolničkog centra Zemun, Beograd, uzeti u periodu februar-april 2010. godine (77 uzoraka, testiranih pojedinačno) i u periodu septembar-novembar 2011. godine (450 uzoraka, testiranih po 25 zajedno kao *mini-pool*). Uzorci krvi dobrovoljnih davalaca bez simptoma B19 infekcije, odnosno zdravih osoba na osnovu uobičajene transfuziološke ankete, uzeti su sa EDTA vakutajner sistemom za uzorkovanje krvi, obeleženi i zamrznuti čuvani na temperaturi ispod -20°C pre testiranja.

Pored toga, sakupljeno je 13 uzoraka krvi ili plazme (sa EDTA) od pacijenata kod kojih je postojala sumnja na parvoB19 infekciju (Tabela 3.1). Svi uzorci su uzeti u periodu od 2009. do 2012. godine nakon informisanja pacijenata o testiranju koje se planira i dobijanja pismene saglasnosti pacijenta. Za sve uzorke osim za RS-B1/M1 kao uzorak uzeta je plazma koja je zamrzavana odmah nakon sakupljanja i čuvana u zamrznutom stanju pre testiranja.

Uzorak RS-B1/M1 je uzorak krvi iz pupčane vrpce fetusa starog 22 nedelje nakon postavljanja dijagnoze *Hydrops fetalis* i pozitivnih rezultata za IgG/IgM iz krvi majke, uzet neposredno pre intrauterine transfuzije kojoj je fetus podvrgnut. Uzorak je zamrznut kao puna krv i čuvan u zamrznutom stanju pre testiranja.

Uzorci RS-B2 i RS-M2 su uzorci plazme majke i novorođenog deteta godinu dana nakon uzimanja uzorka RS-B1/M1.

Uzorci RS3-RS12 su uzeti od pacijenata sa simptomima koji mogu ukazivati na infekciju B19 virusom (osip, povišena telesna temperatura, bol u zglobovima) ili koji su bili pozitivni na B19 IgM i/ili IgG. Uzorci RS-10A, RS-10B i RS-10C su uzorci plazme istog pacijenta, sa migratornim artritismom i perikarditisom, u različitim vremenskim trenucima u periodu od 45 dana od pojave prvih simptoma.

Tabela 3.1 Uzorci pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju

	Uzorak	Vreme uzimanja	Simptomi	IgM/IgG ^a	
1	RS-B1/M1	jul 2009	<i>Hydrops fetalis</i>	+/+	
2	RS-B2 ^b	avg 2010	Bez simptoma	-/+	
3	RS-M2 ^b	avg 2010	Bez simptoma	-/+	
4	RS-3	sep 2010	Simptomi koji ukazuju na mogućnost B19 infekcije ^c	+/+	
5	RS-4	jan 2011		+/-	
6	RS-5	jan 2011		+/-	
7	RS-6	jan 2011		+/+	
8	RS-7	jan 2011		ND/ND	
9	RS-8	maj 2011		+/ND	
10	RS-9	maj 2011		ND/ND	
11	RS-10A	jan 2012		Migratorni artritis, perikarditis	ND/ND
12	RS-10B	jan 2012			ND/ND
13	RS-10C	feb 2012			ND/ND

ND – analiza nije rađena

a) Referentna vrednost (cut off) je 17 IU/ml i 5 IU/ml za IgM odnosno IgG; b) uzorak testiran radi praćenja nakon prethodne infekcije; c) Konstatovani neki ili svi od navedenih simptoma: povišena telesna temperatura, osip, bol u mišićima i/ili zglobovima, jeza, glavobolja.

3.1.2 Standardi

Kao standard za detekciju i semikvantifikaciju korišćen je internacionalni referentni standard Svetske zdravstvene organizacije (eng. *WHO International Standard for parvovirus B19 DNA NAT assays*, 99/800), u daljem tekstu B19IS, koji predstavlja razblaženje jedne donacije humane plazme koja je bila pozitivna na B19 DNK, u humanoj plazmi negativnoj na HCV RNK, HAV RNK, HIV RNK, HBV DNK, parvovirus B19 DNK, HBsAg, anti-HCV, i anti-HIV antitela, ali pozitivnoj na anti-B19 antitela. Ovaj materijal je kalibrisan u toku međunarodne kolaborativne studije i prihvaćen kao međunarodni standard za parvoB19 DNK na zasedanju ekspertskeg komiteta za biološku standardizaciju Svetske zdravstvene organizacije (*WHO Expert Committee on Biological Standardization*, ECBS) u oktobru 2000. godine. Tom prilikom je i definisano da materijal sadrži 5×10^5 IU po bočici (Saldanha i sar., 2002), i da se količina B19 DNK izražava u internacionalnim jedinicama (IU, eng. *International Units*). Faktor konverzije broja kopija u IU je 3.34 odnosno 0.52 log (Koppelman i sar. 2004). Standard se nabavlja kao liofilizovan materijal koji se pre upotrebe rekonstituiše sa 0.5 mL sterilne vode bez nukleaza, tako da rekonstituisan materijal ima aktivnost od 10^6 IU/mL. B19IS se čuva na -20°C ili na -70°C (Tabela 3.2). U radu je korišćen nerazblažen standard, kao i odgovarajuća razblaženja pripremljena sa pogodnim diluentom (*Basematrix diluent*, SeraCare Life Sciences, SAD.)

Kao standard korišćen je i referentni standard EDQM (eng. *European Directorate for Quality of Medicines*, evropskog direktorata za kvalitet lekova). Ovaj standard označen je kao B19BRP (eng. *B19 virus DNA for NAT testing Biological Reference Preparation*) i predstavlja liofilizovani preparat koji sadrži B19 virusnu DNK pogodnu za testiranje plazma *pool*-ova tehnikama amplifikacije nukleinskih kiselina (NAT, eng. *Nucleic Acid Amplification Techniques*), Tabela 3.2. U kolaborativnoj studiji ovom materijalu je dodeljena aktivnost $10^{5.80}$ IU/ml odnosno 630.957 IU/ml (Nübling i sar., 2003).

Za određivanje različitih B19 genotipova korišćen je referentni panel parvovirus B19 genotipova (*WHO Reference Reagent 1st WHO International Reference Panel for Parvovirus B19 Genotypes for NAT based assays* NIBSC code: 09/110) koji je uspostavio Nacionalni institut za biološke standarde i kontrolu (eng. *The National Institute for Biological Standards and Control*, NIBSC) u sadarnji sa WHO. Panel

genotipova se sastoji od 4 uzorka, označenih sa M1 do M4 (eng. *member 1-member 4*). Uzorci M1, M2 i M3 predstavljaju uzorke čiji je genotip određen kao genotip 1, genotip 2 i genotip 3a redom, dok je uzorak M4 B19 negativan uzorak plazme. U međunarodnoj kolaborativnoj studiji određene su aktivnosti navedenih uzoraka i u tabeli 3.2 navedene su njihove srednje vrednosti (Baylis i sar., 2009). Panel B19 genotipova predstavlja plazmu u tečnom stanju, koja se čuva na temperaturi ispod -70°C (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Standardi

Standard	Opis
<i>The WHO International Standard for parvovirus B19 DNA NAT assays</i> , NIBSC code: 99/800	Internacionalni referentni standard Svetske zdravstvene organizacije B19IS , 10 ⁶ IU/mL ^a
<i>B19 virus DNA for NAT testing BRP batch 1</i> , EDQM catalogue code Y0000285	Referentni standard EDQM B19BRP , 10 ^{5.80} IU/ml (5.80 log ₁₀ or 630.957 IU/ml) ^b
<i>WHO Reference Reagent 1st WHO International Reference Panel for Parvovirus B19 Genotypes for NAT based assays</i> NIBSC code: 09/110	Referentni panel parvovirus B19 genotipova: M1 , genotip 1, 10 ^{5.98} IU/ml (5.61 - 6.32 log ₁₀ IU/ml) M2 , genotip 2, 10 ^{5.94} IU/ml (5.43 - 6.52 log ₁₀ IU/ml) M3 , genotip 3a, 10 ^{5.97} IU/ml (5.21 - 6.54 log ₁₀ IU/ml) ^c M4 , B19 negativna plazma

a) Kada je pripremljen kao što je navedeno u NIBSC uputstvu; b) Kada je pripremljen kao što je navedeno u EDQM uputstvu; c) Minimalne i maksimalne vrednosti za svaki uzorak iz panela navedene su u zagradama, a prema podacima iz NIBSC uputstva.

3.1.3 Baze podataka

U radu su korišćene sekvence navedene u NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka. NCBI predstavlja skup nukleotidnih i proteinskih sekvenci iz nekoliko izvora, uključujući GenBank, RefSeq (eng.

Reference Sequence Database), TPA (eng. *Third Party Annotation*) i PDB (eng. *Protein Data Bank*). GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pripada NIH-u (eng. *National Institute of Health*) u okviru NLM (eng. *National Library of Medicine*) i predstavlja bazu podataka sa DNK sekvencama koja je deo međunarodne saradnje (eng. *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*) u okviru koje se svakodnevno razmenjuju podaci sa bazom podataka DDBJ (eng. *DNA DataBank of Japan*) u Japanu i evropskom bazom EMBL (eng. *European Molecular Biology Laboratory*).

Pretragom nukleotidne baze podataka u okviru baze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) za analizu je do kraja 2012. godine izdvojeno 146 celih ili skoro celih sekvenci genoma ili cDNK parvo B19 virusa. U Tabeli 3.3 i tabeli 3.4 navedeni su pristupni brojevi (eng. *accession numbers, Acc.no.*) i literatura za 146 sekvenci za koje je u bazama podataka naveden genotip, a dostupne su cele ili skoro cele sekvence genoma ili cDNK. U tabeli 3.5. navedeno je i geografsko poreklo, tkivo i vreme uzorkovanja.

Tabela 3.3 Oznake i reference za izolate genotipa 1 u GenBank bazi podataka (cele ili skoro cele sekvence)

Genotip 1 (117 izolata uključujući i 2 <i>outgroup</i>^a izolata)					
Br.	Acc.no. /broj nukleotida	Referenca	Br.	Acc.no. /broj nukleotida	Literatura
1.	NC_000883 5596 nt	Zhi i sar., 2004	10.	AB126267 4466 nt	Abe i sar., 2007
2.	AB030673 (N8) 4628 nt	Takasawa i sar., 2004	11.	AB126268 4466 nt	Abe i sar., 2007
3.	AB030693 (N8) 4663 nt	Takasawa i sar., 2004	12.	AB126269 4466 nt	Abe i sar., 2007
4.	AB030694 (N8) 4663 nt	Takasawa i sar., 2004	13.	AB126270 4474 nt	Abe i sar., 2007
5.	AB126262 4466 nt	Abe i sar., 2007	14.	AB126271 4474 nt	Abe i sar., 2007
6.	AB126263 4466 nt	Abe i sar., 2007	15.	AF113323 4538 nt	Hemauer i sar., 1999
7.	AB126264 4466 nt	Abe i sar., 2007	16.	Z70528 4578 nt	Hemauer i sar., 1996
8.	AB126265 4466 nt	Abe i sar., 2007	17.	Z70560 4621 nt	Hemauer i sar., 1996
9.	AB126266 4466 nt	Abe i sar., 2007	18.	Z70599 4514 nt	Hemauer i sar., 1996

Tabela 3.3, nastavak

Genotip 1 (117 izolata uključujući i 2 <i>outgroup</i> ^a izolata)					
Br.	Acc.no.	Referenca	Br.	Acc.no.	Referenca
19.	Z68146 5156 nt	Hicks i sar., 1996	37.	AY028237 4513 nt	Tolfvenstam, neobjavljeno
20.	AF161223 (Kati1) 4265 nt	Hokynar i sar., 2000	38.	DQ408301 4890 nt	Schneider i sar., 2008
21.	AF161224 (Kati2) 4265 nt	Hokynar i sar., 2000	39.	FJ591158 5412 nt	Chen, neobjavljeno
22.	AF161225 (Kati3) 4268 nt	Hokynar i sar., 2000	40.	FN598217 5594 nt	Op de Beeck i sar., neobjavljeno
23.	AF161226 (Kati4) 4279 nt	Hokynar i sar., 2000	41.	M13178 (Pvbaua ili B19-Au) prot., 5112bp	Shade i sar., 1986
24.	FN669502 4560 nt	Dina i sar., 2011	42.	M24682 5255 nt	Blundell i sar., 1987
25.	FN669503 4483 nt	Dina i sar., 2011	43.	AF162273 (HV) 5594 nt	Gallinella i Venturoli, neobjavljeno
26.	FN669504 4522 nt	Dina i sar., 2011	44.	FW377254 5112 nt	Rinkeru i sar., 2010
27.	FN669506 4485 nt	Dina i sar., 2011	45.	DQ225148 4463 nt	Toan i sar., 2006
28.	FN669507 4560 nt	Dina i sar., 2011	46.	DQ225149 4469 nt	Toan i sar., 2006
29.	AJ781031 4426 nt	Plentz i sar., 2004	47.	DQ225150 4446 nt	Toan i sar., 2006
30.	AJ781032 4426 nt	Plentz i sar., 2004	48.	DQ225151 4456 nt	Toan i sar., 2006
31.	AJ781033 4426 nt	Plentz i sar., 2004	49.	DQ357064 4500 nt	Toan i sar., 2006, <i>outgroup</i>
32.	AJ781034 4426 nt	Plentz i sar., 2004	50.	DQ357065 4449 nt	Toan i sar., 2006, <i>outgroup</i>
33.	AJ781035 4483 nt	Plentz i sar., 2004	51.	AY504945 (NAN) 5595 nt	Norja i sar., 2006
34.	AJ781036 4482 nt	Plentz i sar., 2004	52.	DQ293995 4874 nt	Parsyan i sar., 2006
35.	AJ781037 4482BP	Plentz i sar., 2004	53- 117.	JN211121 do 85, 4280 nt	Molenaar-de Backer i sar., 2012
36.	AJ781038 4643 nt	Plentz i sar., 2004			

a) Za izolate koji su srodni sa ispitivanim izolatima (pripadaju genotipu 1), ali su filogenetski udaljeniji od njih usvojen je engleski naziv „*outgroup*”. Ovi izolati se koriste kao referentni u cilju određivanja korena filogenetskog stabla.

Tabela 3.4 Oznake i reference za izolate genotipa 2 i genotipa 3 u GenBank bazi podataka (cele ili skoro cele sekvence B19 genoma)

Genotip 2 (12 izolata)			Genotip 3 (17 izolata)		
Br.	Acc.no.	Referenca	Br.	Acc.no.	Referenca
1.	AJ717293 4922 nt	Liefeldt i sar., neobjavljeno	1.	AJ249437 5028 nt	Nguyen, neobjavljeno
2.	AY044266 (LaLi) 4935bp	Hokynar i sar., 2002	2.	AX003421 protot. 3a, 5028 nt	Auguste i sar., 1999
3.	AY903437 (IM081) 5106bp, panel M2	Blumel i sar., 2005	3.	AY083234 (3b) 5017 nt	Servant i sar., 2002
4.	DQ333426 4925 nt	Schneider i sar., 2008	4.	AY582124 4866 nt	Parsyan i sar., 2006
5.	DQ333427 4767 nt	Schneider i sar., 2008	5.	AY582125 4866 nt	Parsyan i sar., 2006
6.	DQ333428 4517 nt	Schneider i sar., 2008	6.	AY647977 (3b) 4964 nt	Keller i sar., neobjavljeno
7.	HQ340601 4354 nt	Utta i sar., neobjavljeno	7.	DQ234769 (3a) 4866 nt	Parsyan i sar., 2007
8.	HQ340602 4354 nt	Utta i sar., neobjavljeno	8.	DQ234771 4866 nt	Parsyan i sar., 2006
9.	AB550331 5588 nt	Tsujikawa, neobjavljeno	9.	DQ234775 4866 nt	Parsyan i sar., 2007
10.	AY064475 (A6-2) 4844 nt	Nguyen i sar., 2002	10.	DQ234778 4865 nt	Parsyan i sar., 2006
11.	AY064476 (A8-2) prototype, 4844 nt	Nguyen i sar., 2002	11.	DQ234779 (3b) 4867 nt	Parsyan i sar., 2006
12.	EF216869 4959 nt	Baylis, neobjavljeno	12.	DQ408302 4930 nt	Schneider i sar., 2008
			13.	DQ408303 4931 nt	Schneider i sar., 2008
			14.	DQ408304 4931 nt	Schneider i sar., 2008
			15.	DQ408305 (3b) 4931 nt	Schneider i sar., 2008
			16.	FJ265736 4846 nt	Rinckel i sar., neobjavljeno
			17.	NC-004295 (V9- 3a) 5028 nt	Nguyen, neobjavljeno

Tabela 3.5 Pregled B19 izolata genotipa 1 (cele ili skoro cele sekvence) po geografskom poreklu, tkivu iz koga je virusni genom izolovan i vremenu uzorkovanja:

DataBase ID, lokacija i informacije o uzorku	Tip uzorka	Referenca
Srbija (n=5)		
2009: RS-B1/M1	krv	
2011: RS-4, RS-8, RS-9	plazma	
2012: RS-10A	plazma	
Japan (n=13)		
1986: AB030673 (N8)	serum	Takasawa i sar., 2004
1992: AB030693 (Mi)	koštana srž	
1992: AB030694 (Rm)	serum/ koštana srž	
1996: AB126263 (AN28)	jetra	Abe i sar., 2007
1997: AB126266 (AN40), AB126267 (AN41)	jetra	
1998: AB126262 (AN23), AB126264 (AN30), AB126265(AN34), AB126268 (AN56), AB126269 (AN66), AB126270 (AN85)	jetra	
2000: AB126271 (B18-AN87)		
Finska (n=4)		
1996: AF161223-6 (Kati1-4)	sinovijalno tkivo	Hokynar i sar., 2000
Nemačka (n=13)		
1994: Z70560 (1/I), Z70528 (2/II), Z70599 (Sp2)	serum	Hemauer i sar., 1996
1997: AF113323 (SLE)	serum	Hemauer i sar., 1999
2002: AJ781031-8	krv	Plentz i sar., 2004
2008: DQ408301 (BN30.1)	jetra	Schneider i sar., 2008

Tabela 3.5, nastavak

DataBase ID, lokacija i informacije o uzorku	Tip uzorka	Referenca
Švedska (n=1)		
2001: AY028237 (E.1.1.)	serum	Tolfvenstam, neobjavljeno
SAD (n=5)		
1982: M13178 (Au)	serum	Shade i sar., 1986
2004: NC_000883 (J35), nukleotidna sekvenca identična sa AY386330, 1999.	serum	Zhi i sar., 2004
2006: AY504945 (NAN)	serum	Norja i sar., 2006
2007: FW377254	?	Rinkeru i sar., 2010
2008: FJ591158 (KU1)	serum	Chen i sar., neobjavljeno*
Belgija (n=2)		
2000: DQ293995 (C39)	plazma	Parsyan i sar., 2006
2002: FN598217 (BB19)	plazma	Op de Beek i sar., neobjavljeno
Engleska (n=3)		
1973: M24682 (Wi or PVBPRO)	serum	Blundell i sar., 1987
1990: AF162273 (HV)	tkivo/serum	Gallinella, Venturoli neobjavljeno
1993: Z68146 (Stu)	serum	Hicks i sar., 1996
Vijetnam (n=6)		
2001: DQ225148-51 (KyMa, SN807, OsFr, AnTo)	serum	Toan i sar., 2006
2001: DQ357064-5 (Vn147, Vn115)	serum	

Tabela 3.5, nastavak

DataBase ID, lokacija i informacije o uzorku	Tip uzorka	Referenca
Holandija (n=65)		
2003: 14 izolata	serum	Molenaar-de Backer i sar., 2012
2004: 14 izolata	serum	
2006: 14 izolata	serum	
2008: 8 izolata	serum	
2009: 15 izolata		
JN211121 to JN211185		
Francuska (n=5)		
2009: FN669502	biopsija srca	Dina i sar., 2011
2009: FN669503	biopsija pluća	
2009: FN669504	aspirat nosa	
2009: FN669506	aspirat nosa	
2009: FN669507	amnionska tečnost	

Dva izolata genotipa 1 selektovana iz navedenih nukleotidnih baza podataka na osnovu kriterijuma skoro celih B19 cDNK, isključena su iz dalje analize. Kod izolata FW377252 (Rinkeru i sar., 2010) je konstatovana neuobičajena insercija A761 koja je jedinstvena u odnosu na sve ostale dostupne genomske sekvencama B19. Kako u pomenutom radu nije navedeno da li je sekvenciranje rađeno u oba smera i koliko puta je navedena insercija potvrđena, ovaj izolat je isključen iz dalje analize. Izolat FN669505 (Dina i sar., 2011) je takođe isključen pošto je njegova sekvenca kraća za približno 500 nt od svih ostalih B19 genoma u našem poravnanju različitih B19 cDNK izolata.

Pored navedenih izolata u radu su za analizu korišćene i sekvence delova genoma (994 nt) izolata iz Srbije, dobijenih iz seruma uzorkovanih 2007. godine (FN295732, FN295733, FN295734, FN295735, FN295736, FN295737, Hubschen i sar., 2009).

U radu je korišćena, za analizu strukture kapsida i virusnih proteina, i baza RSCB PDB – *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). PDB je baza podataka koja sadrži 3D strukture velikih bioloških molekula – proteina i nukleinskih kiselina. U navedenoj bazi podaci o strukturi proteina dobijeni su na osnovu kristalografije X zracima, NMR spektroskopijom ili *in silico* simulacijama i dostupni su putem interneta.

3.2. Metode

3.2.1 Izolacija virusne DNK iz uzoraka plazme i krvi

3.2.1.1 Izolacija virusne DNK iz uzoraka plazme

Virusna DNK je izolovana iz 200 µL plazme upotrebom kita *QIAamp MinElute Virus Spin Kit* prema uputstvima proizvođača (QIAGEN GmbH, Nemačka). Izolacija virusne RNK i DNK zasniva se na specifičnom vezivanju nukleinskih kiselina za silika-gel membranu, uz efikasne korake ispiranja kojima se uklanjaju nečistoće koje mogu inhibirati PCR– dvovalentni katjoni i proteini. Procedura podrazumeva nekoliko koraka centrifugiranja a izolacija se vrši bez prisustva fenola i hloroforma. U pufer za lizu dodavana je interna kontrola (veštački sintetisan oligonukleotid koji se amplifikuje istim prajmerima kao i virusna DNK ali daje fragment različite dužine, Zimmermann i sar., 2000), a izolovana DNK je eluirana sa 60 µL pufera za eluciju. Amplifikacija interne kontrole je dokaz odsustva inhibicije PCR-a pa tako i kriterijum za validnost rezultata.

3.2.1.2 Izolacija virusne DNK iz uzoraka krvi

Virusna DNK je izolovana iz 200 µL plazme upotrebom kita *QIAamp DNA Blood Virus Spin Kit* prema uputstvima proizvođača (QIAGEN GmbH, Nemačka), prema sličnom principu navedenom za izolaciju iz plazme. U pufer za lizu dodavana je ista interna kontrola, a izolovana DNK je eluirana sa 60 µL pufera za eluciju.

3.2.2 Detekcija i semikvantifikacija parvovirusne DNK

Za detekciju i semikvantifikaciju B19 DNK u uzorcima plazme i krvi korišćena je *end-point* PCR metoda pomoću tzv. NS1 prajmera (Tabela 3.6), a prema metodi Servant i sar., (2002.). „*End-point* PCR“, složenica preuzeta iz engleskog jezika a prihvaćena u internacionalnoj literaturi, se odnosi na procenu količine sintetisanih amplikona nakon prekida reakcije amplifikacije. Po završetku PCR-a dobijeni amplikoni se razdvajaju elektroforezom u 8% poliakrilamidnom gelu (*Multiphor II Electrophoresis System, Amercham Biosciences* ili *Sigma vertical electrophoresis*

modul – Z375071 sa napajanjem Amercham Biosciences Power Supply), bojenom metodom AgNO₃ a jačina signala je procenjivana na osnovu površine pika svake trake nakon denzitometrije (na 560 nm, izabrani mod je transmisija, procena preko površine pika, na denzitometru CD 60 DESAGA, Nemačka ili Molecular Imager Gel Doc XR System sa softverom Quantity One ver. 4.6.0, BioRad).

Tabela 3.6. Sekvenca NS1 prajmera korišćenih za procenu viremije pozitivnih uzoraka (Servant i sar., 2002) i interne kontrole (Zimmermann i sar., 2000)

Naziv prajmera	Sekvenca	Nukleotidna lokacija ^a Dužina amplikona	Literatura
NS1-F	5'-TGCAGATGCCCTCCACCCA-3' (19 nt)	2085 - 2103	Servant i sar., 2002.
NS1n-R	5'-GCTGCTTTCAGTCTGAGTTCTTC-3' (21 nt)	2165 - 2185 103 bp ^b	
IK ^c	5'-GCCAAGAAACCCCGCATTACCATGTTATGGAT AGACTGGCTAAGCAAAGCGCGATCCAAAACACA AAAGGCTTTGTTCTTACTCTTTAACTTTGTTC AACTATGGTAACTGGT-3'	117 bp	Zimmermann i sar., 2000

- a) pozicija nukleotida u genomu B19 prikazana je u odnosu na referentnu sekvencu NC_000883
- b) dužina amplikona izražena je u baznim parovima (bp)
- c) sekvence prajmera kojima se amplifikuje interna kontrola prikazane su podebljanim fontom

Pored navedenog metoda za semikvantifikaciju genoma B19, u toku rada razvijena je i **interna metoda** za detekciju i semikvantifikaciju B19 DNK, uzimajući u obzir dostupne podatke iz baza podataka i preporuke za pouzdanu dijagnostiku virusnih infekcija, koja je takođe korišćena za analizu svih uzoraka.

3.2.3 Određivanje nukleotidne sekvence delova genoma ispitivanih izolata B19 virusa

Dobijeni izolati B19 genoma su podvrgnuti PCR umnožavanju u pripremi za sekvenciranje DNK. Metoda koja nam je bila dostupna sastoji se od amplifikacije

međusobno preklapajućih regiona virusnog genoma upotrebom više različitih parova prajmera. S obzirom na varijabilnost virusnog genoma za neke izolate je bilo neophodno koristiti više različitih setova prajmera za amplifikaciju istog regiona. Korišćeni su prajmeri navedeni u literaturi ali i prajmeri posebno dizajnirani u ovom radu u cilju sekvenciranja. U tabeli 3.7 su navedeni nazivi korišćenih prajmera i delovi genoma (u odnosu na referentnu sekvencu NC_000883) koji se pomoću tih prajmera amplifikuju.

Tabela 3.7 - Nukleotidne sekvence prajmera korišćenih za sekvenciranje

Prajmer	Sekvenca	Lokacija ^{a)}	Gen	Referenca
NV1-F	5'-AACTAACAGGTATTTATACT-3'	578-597	preNS1	Stamenkovic i sar., 2013
G1-F	5'-TAGATACCTGTATTTCTGCTA-3'	1097-1117	NS1	Stamenkovic i sar., 2013
G1-R	5'-ATAGTTTGAACTTTATGCTA-3'	1251-1271	NS1	Stamenkovic i sar., 2013
P3-F	5'-TGGATTGATAAAAAATGTGG-3'	1552-1571	NS1	Koppelman i sar., 2007
NV2-R	5'-GCCATTGCCAAGTTTGT'TTT-3'	1615-1634	NS1	Stamenkovic i sar., 2013
NS-F	5'-TGCAGATGCCCTCCACCCA-3'	2085-2103	NS1	Servant i sar., 2002
NSn-R	5'-TGCTTTCACCTGAGTTCTTC-3'	2167-2185	NS1	Stamenkovic i sar., 2013
PV-2-(f)	5'-GCTTGGTATAATGGATGGAA-3'	2482-2501	NS1	Koppelman i sar., 2007
PV-3(r)	5'-CCAGACAGGTAAGCACATTT-3'	2584-2603	NS1	Koppelman i sar., 2007
VP1-R	5'-TTGGCTATACCTAAAGTCAT-3'	3081-3100	VP1	Servant i sar., 2002
NV3-R	5'-TTATAATGGTGCTCTGGGTCA-3'	3448-3468	VP1/VP2	Stamenkovic i sar., 2013
NV4-F	5'-CCCAAGCATGACTTCAGTTA-3'	3298-3317	VP1/VP2	Stamenkovic i sar., 2013
NV4-R	5'-AAGTGTTGACTGCAGCCCTC-3'	4031-4050	VP1/VP2	Stamenkovic i sar., 2013
NV5-F	5'-TCAGCTTTTAGGTACAGGAGG-3'	3961-3981	VP1/VP2	Stamenkovic i sar., 2013
NV5-R	5'-CCCAATTTAAATGTCATAGT-3'	4769-4788	VP1/VP2	Stamenkovic i sar., 2013
NSNI ^{G1} : 1-F	F 5'-GACGTAATTGTCCGCATCT-3'	297-316	preNS1	Schneider i sar., 2008

Tabela 3.7, nastavak

Prajmer	Sekvenca	Lokacija ^{a)}	Gen	Referenca
1-R	R 5'-GCTAGACTCCCCAGCATCAC-3'	1184-1203	NS1	Schneider i sar., 2008
1N-F	F 5'-TACCGGAAGTCCCGCCTAC-3'	319-337	preNS1	
1N-R	R 5'-ATGGCAAGCTCCCCTTCTAA-3'	1121-1140	NS1	
VPCII ^{G1} : 2-F	F 5'-GCAAGGAGTGGGTAGATTTC -3'	4408-4428	VP1/VP2	
2-R	R 5'-ACGGTGGGGAGTGTTTACAA-3'	4964-4983	VP1/VP2	
2N-F	F 5'-CAGGGTTTAAACATGCACACC-3'	4457-447	VP1/VP2	
2N-R	R 5'-CCACAATTCTTCAGGCTTTTC-3'	4919-4939	VP1/VP2	
VPintIV ^{G1} : 3-F	F 5'- CCAGCTGTGGAGTAAAATTCCAAAT-3'	4576-4600	VP1/VP2	
3-R	R 5'-ACCGGAAGTCCCGCCTAC-3'	5260-5277	VP1/VP2	
3N-F	F 5'-AGTTTGCAGCCTTAGGAGGA-3'	4623-4642	VP1/VP2	
3N-R	R 5'-CGGCATCTGATTTGGTGTC-3'	5228-5246	VP1/VP2	
NV6-F	5'-ACTAGAATATCCTTACGCCC-3'	4273-4292	VP1/VP2	Stamenkovic i sar., 2013
NV6-R	5'-GTCCACAATTCTTCAGGCTT-3'	4921-4940	VP1/VP2	Stamenkovic i sar., 2013

a) nukleotidi su označeni u odnosu na referentnu sekvencu NC_000883

Automatsko sekvenciranje amplifikovanih fragmenata B19 genoma rađeno je na automatskom sekvenatoru metodom završetka lanca (*ABI 310, Applied Biosystems, Foster, CA, SAD*). Amplikoni dobijeni upotrebom navedenih prajmera su sekvencirani upotrebom *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-a (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)* a sekvence su "očitanje" i sastavljene upotrebom ABI softvera *Sequencing Analysis 5.1* i *SeqScape software, v 2.5*.

Delovi genoma ispitivanih virusnih izolata su sekvencirani na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i u laboratoriji *Eurofins MWG Operon* (<http://www.eurofinsgenomics.eu>) posredstvom saradnika *Virologie Immunologie Moléculaires, (Institut National de la Recherche Agronomique), UR892, INRA, Jouy-*

en-Josas, Francuska. Rezultat automatskog sekvenciranja dobija se u vidu grafičkog i slovnog zapisa.

3.2.4 Bioinformatička obrada podataka

U cilju analize izolovanih sekvenci korišćeno je više bioinformatičkih alata, kako za sklapanje segmenata dobijenih sekvenciranjem tako i za njihovo međusobno poređenje i analizu. Genetičke distance između sekvenci određuju se na osnovu nukleotidnih sekvenci (nukleotidne distance), odnosa nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS) ili na osnovu aminokiselinskih sekvenci. U ovom radu, primenom više bioinformatičkih alata, analizirani su odnos nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS) i nukleotidne distance izolata.

3.2.4.1 Finch TV

Elektroforegrami dobijeni nakon sekvenciranja su pregledani u Finch TV programu (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>), verzija 1.4. Ovaj program omogućava pregledan i interaktivan način za vizuelizaciju rezultata sekvenciranja kao i manuelno-vizuelnu korekciju nukleotidne sekvence nakon uvida u grafički prikaz hromatograma. Program sa može koristiti za obradu ab1 ili scf fajlova, a podaci se mogu čuvati i u FASTA formatu.

3.2.4.2 MEGA

MEGA (eng. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), verzija 5.03, <http://www.megasoftware.net>, (Tamura i sar., 2011) je programski paket, odnosno bioinformatički alat koji je korišćen za poravnanje sekvenci (Clustal X, Larkin i sar., 2007), konstruisanje filogenetskih stabala, pretragu baza podataka (PubMed, BLASTA), procenu stope mutacija, testiranje evolutivnih hipoteza i određivanje genetičkih distanci. Programi koji su integrisani u MEGA paket korišćeni su kroz upotrebu opcija u programu MEGA.

3.2.4.3 Bioedit

BioEdit verzija 7.0.9.0., <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html> (Hall, 1999) je program korišćen za poravnanje, vizuelni pregled identičnosti nukleotidnih i proteinskih sekvenci, određivanje konsenzusnih sekvenci za dato

poravnanje i određivanje procentualne identičnosti nukleotidnih i proteinskih sekvenci.

3.2.4.4. Datamonkey

Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) je server, odnosno aplikacija, koji na brz i jednostavan način omogućava analizu zasnovanu na HyPhy softverskom paketu (eng. *Hypothesis testing using Phylogenies*) i brzu detekciju mesta rekombinacije (Kosakovsky Pond *i sar.*, 2006). Preko ovog servisa sprovedene su SLAC (eng. *Single Likelihood Ancestor Counting*) i GARD (eng. *Genetic Algorithm for Recombination Detection*) analize. SLAC analiza zasniva se na proceni očekivanih i dobijenih sinonimnih i nesinonimnih zamena koje program analizira u odnosu na jednu najverovatniju predačku sekvencu, a koju konstruiše na osnovu unetih sekvenci primenom algoritma kojim se povezuju susedi (eng. *neighbor-joining*). GARD analiza je zasnovana na modelu zasnovanom na verovatnoći (eng. *likelihood-based*) koji primenom genetičkog algoritma pretražuje poravnanja sekvenci u potrazi za potencijalnim mestima rekombinacije.

3.2.4.5. Testiranje modela za analizu genskih sekvenci B19

Aplikacija jModelTest se koristi za statističku analizu i izbor najpogodnijeg modela za poređenje nukleotidnih supstitucija u genomima izolata pripremljenog poravnanja. Ova aplikacija podrazumeva pet različitih strategija za izbor modela: testiranje odnosa hijerarhijske i dinamičke verovatnoće (eng. *hierarchical and dynamical likelihood ratio tests* - hLRT i dLRT), Akaike i Bayesian informacione kriterijume (eng. *Akaike and Bayesian information criteria* - AIC i BIC), i metod teorije odlučivanja (eng. *decision theory method* - DT). Aplikacija nudi i mnoštvo dodatnih podataka kao što su značajnost parametara, nesigurnost modela i drugi.

Modeli koji se testiraju u okviru jModelTest aplikacije navedeni su u tabeli 3.8. jModelTest ispituje adekvatnost za 11 mogućih supstitucionih modela, svaki u varijanti sa jednakim i nejednakim učestalostima nukleotida (22 varijante). Primenom različitih vrednosti za procenat invarijabilnih mesta (+I) i stepen varijacije između mesta sa brojem kategorija (eng. *rate variation among sites with a number of rate categories*, +G), dobija se 88 različitih modela, koji se testiraju kako bi se izabrao model koji je najpogodniji za analizu podataka od interesa.

Tabela 3.8. Supstucioni modeli testirani u okviru aplikacije jModelTest2.

Model	Referenca	Broj slobodnih parametara	Učestalosti baza	Stepen supstitucije	Kod
JC	Jukes i Cantor, 1969	0	jednake	AC=AG=AT=CG=CT=GT	000000
F81	Felsenstein, 1981	3	nejednake	AC=AG=AT=CG=CT=GT	000000
K80	Kimura, 1980	1	jednake	AC= AT=CG= GT; AG=CT	010010
HKY	Hasegawa i sar., 1985	4	nejednake	AC= AT=CG= GT; AG=CT	010010
TNef	Tamura i Nei, 1993	2	jednake	AC= AT=CG= GT; AG; CT	010020
TN	Tamura i Nei, 1993	5	nejednake	AC= AT=CG= GT; AG; CT	010020
TPM1	Kimura, 1981	2	jednake	AC=GT; AT=CG; AG= CT	012210
TPM1uf	Kimura, 1981	5	nejednake	AC=GT; AT=CG; AG= CT	012210
TPM2		2	jednake	AC=AT; CG=GT; AG= CT	010212
TPM2uf		5	nejednake	AC=AT; CG=GT; AG= CT	010212
TPM3		2	jednake	AC=CG; AT=GT; AG= CT	012012
TPM3uf		5	nejednake	AC=CG; AT=GT; AG= CT	012012
TIM1ef	Posada, 2003	3	jednake	AC=GT; AT=CG; AG; CT	012230
TIM1	Posada, 2003	6	nejednake	AC=GT; AT=CG; AG; CT	012230
TIM2ef		3	jednake	AC=AT; CG=GT; AG; CT	010232
TIM2		6	nejednake	AC=AT; CG=GT; AG; CT	010232
TIM3ef		3	jednake	AC=CG; AT=GT; AG; CT	012032
TIM3		6	nejednake	AC=CG; AT=GT; AG; CT	012032
TVMef	Posada, 2003	4	jednake	AC; AT; CG; GT; AG=CT	012314
TVM	Posada, 2003	7	nejednake	AC; AT; CG; GT; AG=CT	012314
SYM	Zharkikh, 1994	5	jednake	AC;AG;AT;CG;CT;GT	012345
GTR	Tavere, 1886	8	nejednake	AC;AG;AT;CG;CT;GT	012345

000000 predstavlja model gde je svih 6 stopa supstitucije (eng. *substitution rates*) jednako, i označava se kao JC69 model ako je učestalost baza jednaka (0.25), odnosno kao F81 model ako je različita. Kod modela sa kodom 010010 stepeni supstitucije A-G i C-T su međusobno jednaki ali se razlikuju od ostalih parametara, i on se označava se kao K80 model ako je učestalost baza jednaka (0.25), odnosno kao HKY85 model ako je različita. Model sa kodom 010020 se naziva i TN93 model, a model sa kodom 012345 je GTR model.

3.2.4.6. Program za analizu rekombinacionih događaja – RDP4

RDP4 (verzija Beta 4.16) je program za analizu rekombinacija koji koristi brojne algoritme za detekciju i procenu rekombinantnih događaja u grupi poravnanih sekvenci, kao i njegova prethodna verzija RDP3 (Martin i sar., 2010). U okviru RDP programa opciono se mogu izabrati algoritmi RDP (Martin i Rybicki, 2000), BootScan (Martin i sar., 2005), SiScan (Gibbs i sar., 2000), 3seq (Boni i sar., 2007), MaxChi (Maynard Smith, 1992), Phylpro (Weiller, 1998) i drugi.

4. Rezultati

4.1. Identifikovanje uzoraka pozitivnih na B19 DNK

4.1.1. Metode za detekciju i kvantifikaciju B19 DNK u uzorcima krvi i plazme

Za potrebe analize u ovom radu razvijena je interna metoda kojom se uspešno mogu detektovati i kvantifikovati izolati sva tri genotipa B19 virusa. S obzirom na to da je metoda predmet patentne prijave detalji metode će biti razmotreni u publikaciji nakon dobijanja broja u patentnoj bazi.

Prema smernicama Evropske farmakopeje datim u monografiji 07/2010:20621 (Ph.Eur.2010) izvršena je validacija uspostavljene interne metode za detekciju i kvantifikaciju genoma B19 koja je predmet patentne prijave i pokazana je zadovoljavajuća specifičnost, preciznost, tačnost i lineanost u opsegu od 10^3 - 10^5 IU/mL (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Rezultati validacije interne metode

Parametar	Zahtevi /Rezultati
Specifičnost: Nedvosmisleno određena nukleinska kiselina u prisustvu komponenti koje mogu biti prisutne, bez lažno pozitivnih rezultata sa B19 negativnim materijalom.	<ol style="list-style-type: none">specifičnost metode proveriti u nukleotidnim bazama podataka Analiza nukleotidne baze podataka pokazala je da je metoda specifična za B19 virus.proveriti metodu sekvenciranjem, hibridizacijom ili restrikcionom analizom genoma korišćenih izolata B19 pozitivni uzorci su sekvencirani. Sekvence su poređenjem sa bazom podataka (GenBank) identifikovane kao sekvence B19 virusa.testirati najmanje 20 negativnih plazma pool-ova i pokazati da su nereaktivni Testirano je 20 plazma poolova (plazma dobrovoljnih davalaca krvi, bez simptoma B19 infekcije) i svi su bili negativni.

Tabela 4.1 Rezultati validacije interne metode, nastavak

Parametar	Zahtevi /Rezultati
<p><u>Linearnost:</u></p> <p>Pokazatelj da su rezultati direktno proporcionalni koncentraciji matrice. Procenjuje se u toku ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti testiranjem ponovaka razblaženih uzoraka u celom opsegu</p>	<p>R²>0.90, za opseg 10³-10⁵ IU/ml</p> <p>U toku ispitivanja preciznosti (i tačnosti) urađeno je 5 nezavisnih testova. Koefficient determinacije (R²) bio je u opsegu od 0.9199 do 1.000, sa srednjom vrednošću od 0.9758.</p>
<p><u>Tačnost:</u></p> <p>Pokazatelj bliskosti dobijenog rezultata očekivanoj (teorijskoj) vrednosti.</p> <p>5 koncentracija materijala kalibrisanog u IU (razmak 0.5 log) najmanje po 3 replike za svako razblaženje, određeno u odnosu na standard koji pokriva opseg oko 10⁴ IU/ml (npr 10⁵, 10^{4.5}...10³). Navodi se kao određen procenat u odnosu na poznatu količinu DNK.</p>	<p>Odstupanje od teorijske vrednosti manje od 1.0 log, odstupanje srednje vrednosti u opsegu 50-200% u odnosu na teorijsku vrednost.</p> <p>Svi dobijeni rezultati su u okviru ± 1log u odnosu na očekivanu vrednost, a dobijene srednje vrednosti su u opsegu 50-200% u odnosu na očekivanu vrednost:</p> <p><u>Uzorak ValA (10⁵IU/ml):</u> 7 rezultata iz 4 nezavisna testa min. 10^{4.60}IU/ml, maks. 10^{5.60}IU/ml, srednja vrednost 10^{5.25}IU/ml (176.9%)</p> <p><u>Uzorak ValB (10^{4.5}IU/ml):</u> 12 rezultata iz 5 nezavisnih testova min. 10^{3.75}IU/ml, maks. 10^{4.99}IU/ml, srednja vrednost 10^{4.61} IU/ml (129.3%)</p> <p><u>Uzorak ValC (10⁴IU/ml):</u> 8 rezultata iz 4 nezavisna testa min. 10^{3.59}IU/ml, maks. 10^{4.87}IU/ml, srednja vrednost 10^{4.25}IU/ml (179.5%)</p> <p><u>Uzorak ValD (10^{3.5}IU/ml):</u> 11 rezultata iz 5 nezavisnih testova min. 10^{2.51}IU/ml, maks. 10^{3.97}IU/ml, srednja vrednost 10^{3.51} IU/ml (103.5%)</p> <p><u>Uzorak ValE (10³IU/ml):</u> 8 rezultata iz 4 nezavisna testa min. 10^{2.50}IU/ml, maks. 10^{3.62}IU/ml, srednja vrednost 10^{3.29}IU/ml (196.8%)</p> <p>Svi pojedinačni rezultati su bili u opsegu od ± 1log10 u odnosu na očekivanu vrednost, a prosečne vrednosti su u opsegu od 103.5%-196.8%.</p>

Tabela 4.1 Rezultati validacije interne metode, nastavak

Parametar	Zahtevi /Rezultati
<p><u>Limit kvantifikacije:</u></p> <p>Najniža koncentracija nukleinskih kiselina koja se može kvantifikovati dovoljno precizno i tačno. Procenjuje se u toku ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti.</p>	<p>U toku ispitivanja preciznosti (i tačnosti) urađeno je 5 nezavisnih testova i za svaki od njih konstruisano je po tri standardne krive (za svaki par prajmera ponaosob). Sve krive imale su tačku od 10^3 IU/ml, a njihovi koeficijenti determinacije su bili prihvatljivi (vidi linearnost). Ispitivanja nižih koncentracija nisu rađena, pošto nisu od interesa.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata potvrđeno je da je limit kvantifikacije najmanje 10^3 IU/ml.</p>
<p><u>Preciznost:</u></p> <p>Usklađenost nezavisnih merenja istog homogenog uzorka (testirana na uzorcima koncentracije ValB-$10^{4.5}$ IU/ml i ValD-$10^{3.5}$ IU/ml)– ponovljivost, intermedijarna preciznost, i reproducibilnost</p>	<p>1. Ponovljivost: izraziti preciznost kao koeficijent varijacije između tri ponovka istog uzorka u okviru testa</p> <p>Koeficijent varijacije (CV) za uzorak ValB bio je 24.1%, 7.6% i 69.8%, a za uzorak ValD 15.5%, 58.8% i 54.9%.</p> <p>2. Intermedijarna preciznost: izraziti preciznost kao koeficijent varijacije između srednjih vrednosti dobijenih u tri nezavisna testa</p> <p>Koeficijent varijacije (CV) u okviru ispitivanja intermedijarne preciznosti bio je za uzorak ValB 77.3%, a za uzorak ValD 79.8%.</p> <p>3. reproducibilnost: uspešno ušesće u međulaboratorijskom poređenju</p> <p>PTS studija PTS117 (organizovana od strane EDQM – evropskog direktorata za kvalitet lekova) je uspešno urađena, i to za svih 10 uzoraka (1 negativan uzorak, 3 pozitivna uzorka ali ispod limita od 10000 IU/ml, 6 pozitivnih uzoraka i to preko limita od 10000 IU/ml; od pozitivnih uzoraka 2 su bila genotipa 2, 1 genotipa 3, a ostali uzorci genotipa 1.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata utvrđena je preciznost metode ($7.6\% < CV < 79.8\%$) koja se mora uzeti u obzir pri tumačenju rezultata.</p>

Tabela 4.1 Rezultati validacije interne metode, nastavak

Parametar	Zahtevi /Rezultati
<p><u>Robustnost:</u></p> <p>Pokazatelj otpornosti procedure na male namerne varijacije u parametrima. Kroskontaminacija i interferencija.</p>	<p>1. Kroskontaminacija:</p> <p>U izolaciji punog kapaciteta uzoraka naizmenično naneti visoko pozitivni uzorci dali su pozitivan rezultat i svi negativni uzorci bili su negativni.</p> <p>2. Interferencija matriksa:</p> <p>Svi testirani uzorci plazme koji su spajkovani sa 10^4 IU/ml (13/13) i sa 10^3 IU/ml B19 (13/13) bili su pozitivni, čime je pokazano da sam uzorak (plazma) ne inhibira određivanje.</p> <p>3. Interferencija u prisustvu očekivanih virusa u plazmi:</p> <p>4 B19 negativna uzoraka, pozitivna na druge viruse (HCV, HIV, HBV, HCV+HIV+HBV) i spajkovana sa 10^4 B19 dala su pozitivan rezultat.</p> <p>4. Variranje uslova testa:</p> <p>Metoda je u toku ispitivanja preciznosti i tačnosti urađena i upotrebom različite opreme i reagenasa, a radilo je ukupno 3 operatera.</p>

Metoda je nakon validacije korišćena za detekciju pozitivnih uzoraka, kao i za semi-kvantitativno određivanje titra virusa u pozitivnim uzorcima.

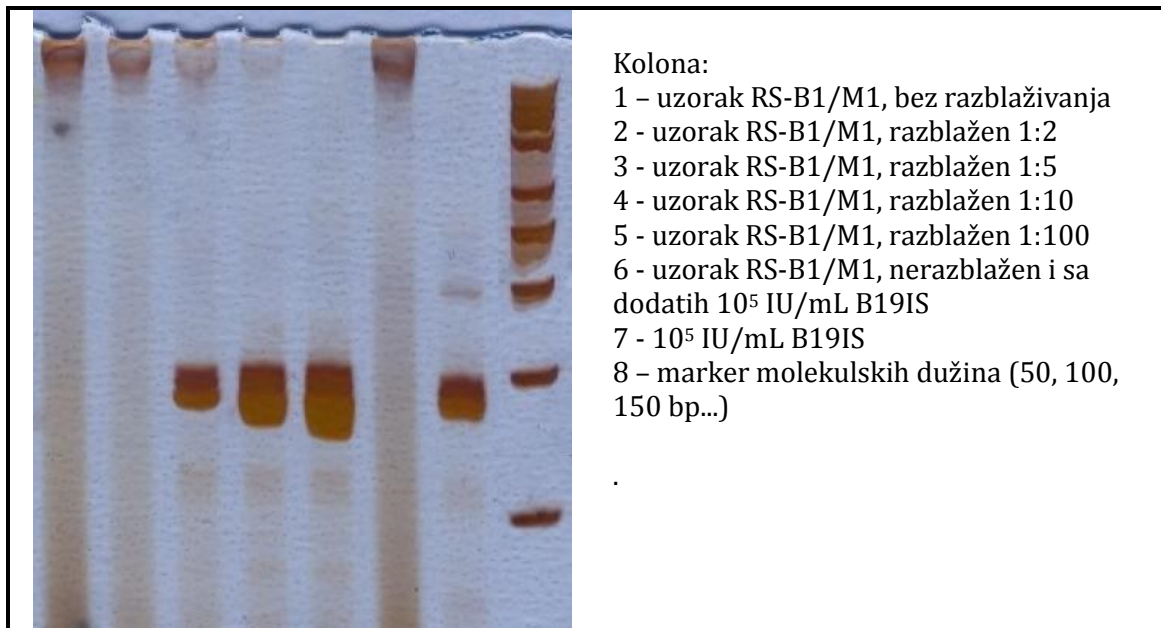
S obzirom na to da je metoda predmet patentne prijave u ovom radu prikazaćemo rezultate semikvantifikacije pomoću *end-point* PCR-a sa NS1 prajmerima (Materijal i metode 3.2.2). Nakon PCR amplifikacije kontrolisane pomoću interne kontrole dobijeni amplikoni se razdvajaju elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, boje srebrom a jačina signala se procenjuje na osnovu površine pika svake DNK trake nakon denzitometrije (Slika 4.1).



Slika 4.1 Poliakrilamidni gel nakon bojenja srebrom. Kolona 1: marker molekularnih dužina O Gene ruler, 100 i 150 bp; Kolone 2-6: standard B19 DNK različitih koncentracija (B19IS 10^5 IU/ml, $10^{4.5}$ IU/ml, 10^4 IU/ml, $10^{3.5}$ IU/ml i 10^3 IU/ml); Kolone 7-10: uzorci iz panela genotipova M1-M4, razblaženi u odnosu 1:100; Kolona 11: negativna kontrola. Traka dužine 103 bp je traka sa NS1 prajmerima, traka dužine 117 bp je traka interne kontrole.

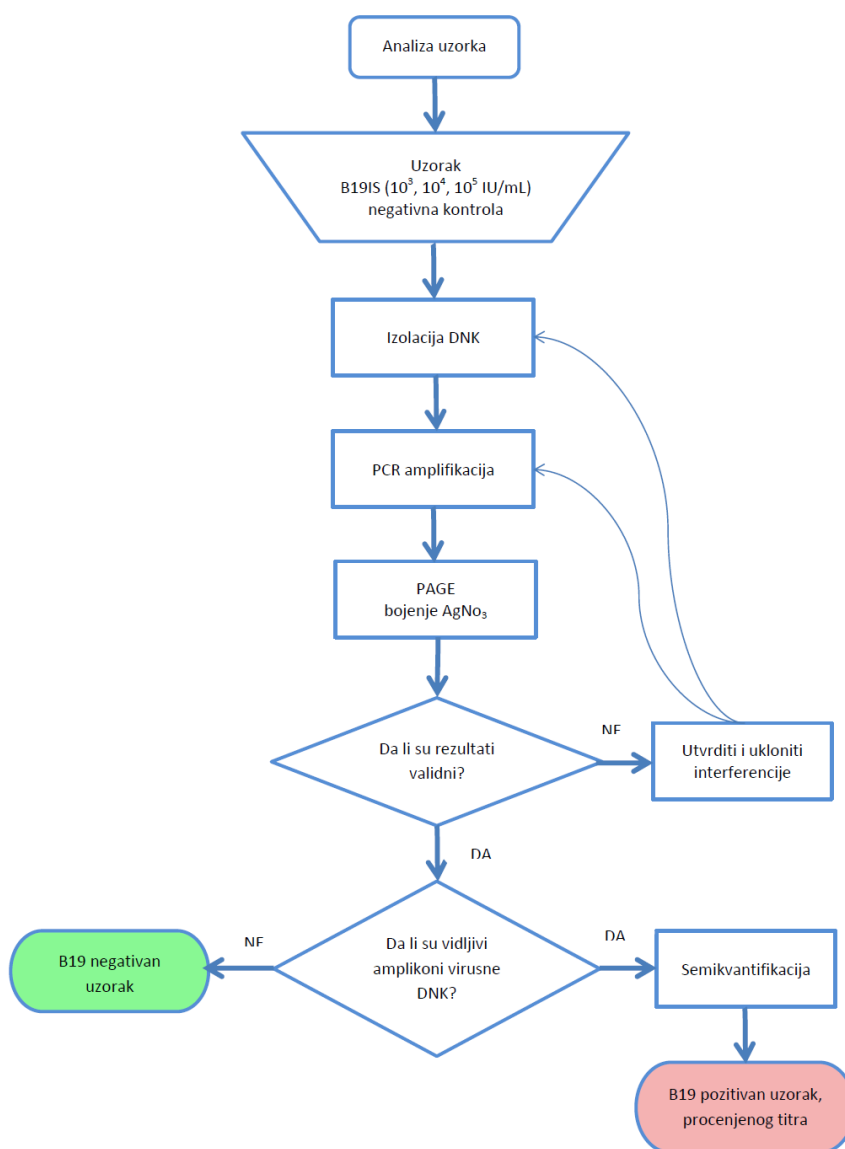
Da bi uzorak bio proglašen negativnim potrebno je da se dokaže da PCR nije inhibiran, što dokazuje prisustvo DNK trake amplifikovane interne kontrole (jedina vidljiva traka u kolonama 10 i 11). Odsustvo trake specifične za virusni genom i DNK trake specifične za internu kontrolu je pokazatelj inhibicije same PCR reakcije i takav rezultat nije validan.

Prvi rezultat za uzorak RS-B1/M1 nije bio validan. Na gelu nije bilo vidljivih DNK amplikona dobijenih sa genoma virusa ali ni amplikona sa interne kontrole (Slika 4.2). Kada je u uzorak dodat B19IS ponovo je izostala DNK amplifikacija, što je potvrdilo sumnje da se u uzorku usled inhibicije ne može amplifikovati virusna sekvenca čak ni kada je sigurno prisutna (kolona 6). Pretpostavka da je do inhibicije došlo zbog prevelike količine virusne DNK u uzorku je potvrđena testiranjem razblaženog uzorka – što je razblaživanje uzorka bilo veće količina amplifikovane DNK je takođe bila veća (kolone 3-5), pošto je inhibicija enzimske reakcije bila manja. Amplifikacija interne kontrole je i u uzorku razblaženom 100 puta (kolona 5) i u standardu (kolona 7) bila inhibirana, usled kompeticije virusne sekvence i sekvence interne kontrole za prajmere.



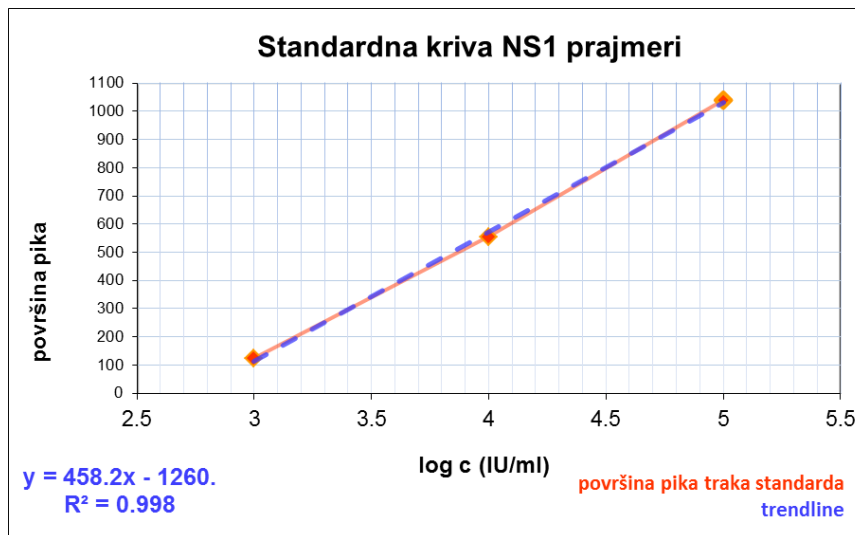
Slika 4.2 Poliakrilamidni gel (PAA) sa DNK amplikonima dobijenim u PCR-u sa izolatom RS-B1/M1 kao matricom (8% PAA, bojenje sa AgNO_3 metodom).

U daljem radu, uzorci koji su bili visoko pozitivni (sa više od 10^5 IU/mL) su radi semikvantifikacije razblaženi tako da razblaženi uzorak ima aktivnost u opsegu metode, a faktor razblaženja uzet je u obzir pri izračunavanju rezultata. (Slika 4.3).



Slika 4.3 Algoritam za B19 DNK detekciju i semikvantifikaciju pomoću NS1 prajmerskog para (Materijal i metode 3.2.2).

Ukoliko je došlo do amplifikacije virusnog genoma semikvantifikacija se vrši nakon denzitometrije konstruisanjem standardne krive. Primer standardne krive koja je konstruisana radi određivanja viremije *end-point* PCR metodom dat je u slici 4.4.



Slika 4.4. Standardna kriva konstruisana na osnovu izmerene površine pikova amplikona dobijenih amplifikacijom referentnog standarda (B19IS). Prikazane su vrednosti za B19IS koncentracije 10^3 IU/mL, 10^4 IU/mL i 10^5 IU/mL, nakon denzitometrije gela bojenog srebrom.

4.1.2. Uzorci plazme dobrovoljnih davalaca krvi

Kao reprezentativan uzorak zdrave populacije korišćeni su uzorci plazme dobrovoljnih davalaca krvi, koji se smatraju zdravim osobama na osnovu uobičajene transfuziološke ankete. U radu su korišćeni uzorci dobrovoljnih davalaca krvi iz Centra za transfuziju Kliničko bolničkog centra Zemun, Beograd, uzetih u periodu februar-april 2010. godine (77 uzoraka, testiranih pojedinačno) i u periodu septembar-novembar 2011. godine (450 uzoraka, testiranih po 25 zajedno kao mini-*pool*). Svi testirani uzorci (527/527) bili su negativni, odnosno nisu detektovane DNK trake (amplikoni) koje bi ukazivale na amplifikaciju sa B19 genoma, odnosno na prisustvo virusnog genoma u uzorcima. Ovaj rezultat potvrđen je primenom obe korišćene metode (*end-point* PCR-a sa NS1 prajmerima i internom metodom), kako bi se smanjila verovatnoća lažno negativnih rezultata usled varijabilnosti virusne sekvence.

4.1.3. Uzorci pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju

U toku rada analizirano je 13 uzoraka pacijenata koji su imali kliničku sliku koja se može dovesti u vezu sa B19 infekcijom. Pored određivanja B19 DNK internom metodom nivo viremije određen je i amplifikacijom sa NS1 parom prajmera, prema metodi koju je objavila Servant sa saradnicima (Servant i sar., 2002). U tabeli 4.2

dat je pregled rezultata određivanja antiB19 antitela i broja kopija B19 DNK u jedinici zapremine uzorka.

Tabela 4.2 Rezultati određivanja antiB19 antitela i B19 genomske DNK

Uzorak	Vreme uzorkovanja	Interna oznaka	Simptomi	IgM/IgG ^a	B19 DNK (log ₁₀ IU/mL)	
RS-B1/M1	jul 2009	F406	<i>Hydrops fetalis</i>	+/+	>9	
RS-B2 ^b	avg 2010	B406	bez simptoma	-/+	Neg	
RS-M2^b	avg 2010	M2-406	bez simptoma	-/+	3	
RS-3	sep 2010	/	Simptomi koji ukazuju na mogućnost B19 infekcije ^c	+/+	Neg	
RS-4	jan 2011	3341		+/+	6	
RS-5	jan 2011	/		+/+	Neg	
RS-6	jan 2011	/		+/+	Neg	
RS-7	jan 2011	4055		ND/ND	3-4	
RS-8	maj 2011	5248		+/ND	6	
RS-9	maj 2011	1577		ND/ND	>6	
RS-10A	12. jan 2012	M21		Migratorni artritis, perikarditis	ND/ND	7
RS-10B	27. jan 2012	M48			ND/ND	6
RS-10C	13. feb 2012	M65	ND/ND		5	

ND – analiza nije rađena; Neg – genom B19 virusa nije detektovan (<10³ IU/ml); Pozitivni uzorci označeni su podebljanim fontom.

a) Referentna vrednost (*cut off*) je 17 IU/ml i 5 IU/ml za IgM odnosno IgG; b) uzorak testiran radi praćenja nakon prethodne infekcije; c) Neki ili svi od navedenih: povišena telesna temperatura, osip, bol u mišićima i/ili zglobovima, jeza, glavobolja.

Od ukupno 13 analiziranih uzoraka 9 je bilo pozitivno na prisustvo B19 genoma, uglavnom sa viremijama preko 10⁶ IU/mL (od 10³ IU/mL do više od 10⁹ IU/mL).

Od ukupno 10 pacijenata kod 6 je potvrđena infekcija B19 virusom.

4.2 Određivanje nukleotidne sekvence genoma B19 virusnih izolata

4.2.1. Reakcije PCR-a tokom pripreme za sekvenciranje B19 genoma

Uzorci za koje je pokazano prisustvo B19 DNK su dalje pripremani za dobijanje nukleotidne sekvence genoma B19. Izolati B19 su amplifikovani upotrebom različitih kombinacija prajmera (sekvence prajmera date su u tabeli 3.5) kako bi se dobila što kompletnija nukleotidna sekvenca cDNK B19 virusnog genoma (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Pregled uzoraka i prajmera sa kojima su dobijeni delovi sekvence izolata:

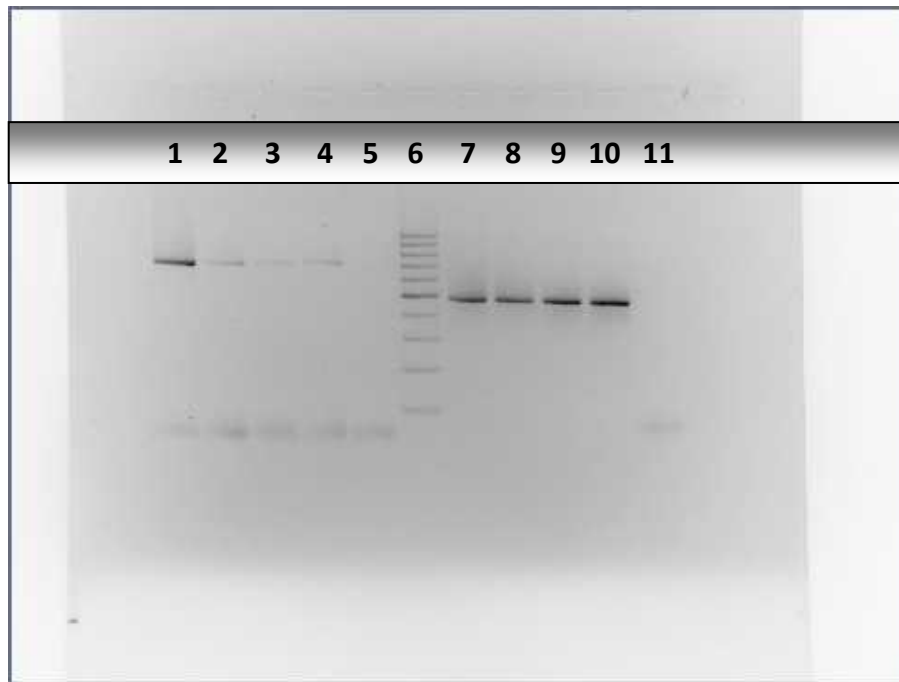
prajmeri lokacija	Uzorak							
	RS- B1/M1	RS-M2	RS-4	RS-7	RS-8	RS-9	RS- 10A	RS- 10B
NV1F/G1R 586-1250	X		X		X	X	X	
G1-F/NSn-R 1143-2186	X	X	X	X	X	X	X	X
G1-F/NV2-R 1096-1633	X		X		X			
P3-F/NSn-R 1551-2186					X		X	
NS-F i VP1-R 2084-3099	X		X		X	X		
NS-F/PV-3(R) 2084-2602					X	X	X	
PV-2(f)/VP1-R 2481-3099	X		X		X			
PV-2F i NV3R 2481-3467	X		X		X	X	X	

Tabela 4.3. Pregled uzoraka i prajmera sa kojima su dobijeni delovi sekvence izolata, nastavak

prajmeri lokacija	Uzorak							
	RS-B1/M1	RS-M2	RS-4	RS-7	RS-8	RS-9	RS-10A	RS-10B
NV4-F/NV4-R 3297-4049	X ¹⁾		X		X	X	X	
NV5-F/NV5-R 3960-4787					X	X	X	
1F/R 297-1203	X				X	X	X	X
1NF/R 319-1140	X		X		X	X	X	
2F/R 4408-4983	X							
2NF/R 4457-4939	X							
3F/R 4576-5277	X				X	X	X	
3NF/R 4623-5246	X		X		X	X	X	X
NV5F/2R 3960-4983	X							
NV5F/2NR 3960-4939	X							

¹⁾ X - uspešno amplifikovanje i sekvenciranje navedenog segmenta.

U slučaju slabije amplifikacije pojedinih segmenata, amplifikacija je ponavljana sa setom prajmera u okviru prvobitno umnožene sekvence (*nested* PCR), slika 4.4.



Slika 4.4. Elektroforetogram amplifikovanih segmenata za sekvenciranje. Amplikoni su razdvojeni na 1.2% agaroznom gelu i naneto je 5 μ L uzorka; Trake 1-4: uzorci RS-4, RS-9, RS-10A i RS-10B, amplifikovani sa setom prajmera NV6F/2R, amplikon dužine 710 bp; Traka 5: negativna kontrola sa setom prajmera NV6F/2R; Traka 6: marker molekulskih dužina (100, 200, 300, 400, 500,600, 700, 800, 900, 1000 bp); Trake 7-10: uzorci RS-4, RS-9, RS-10A i RS-10B, amplifikovani sa setom prajmera 2NF/2NR, amplikon dužine 482 bp; Traka 11: negativna kontrola sa setom prajmera 2NF/2NR.

Dobijeni su segmenti genoma koji se preklapaju, i svaki segment je sekvenciran u oba smera. Tako dobijene sekvence su analizirane pregledom hromatograma (finch.tv, zapisi u Prilogu 1) poređene i preklapane kako bi se nedvosmisleno utvrdila sekvenca B19 genoma.

4.2.2. Genomske sekvence virusnih izolata B19 pozitivnih uzoraka

Od ukupno 9 uzoraka humane krvi/plazme/seruma, kod kojih je potvrđeno prisustvo B19 genoma iz 8 uzoraka je uspešno amplifikovan i sekvenciran deo genoma B19 virusa. Dobijene nukleotidne sekvence su navedene u prilogu (Prilog 2).

Uspešno su sekvencirani sledeći izolati:

1. **Uzorak RS-B1/M1**, segment genoma od **380 do 5311 nt**;
2. **Uzorak RS-M2**, segment genoma od **1234 do 2109 nt**;
3. **Uzorak RS-4**, segment genoma od **380 do 5226 nt**
4. **Uzorak RS-7**, segment genoma od **1224 do 2106 nt**
5. **Uzorak RS-8**, segment genoma od **384 do 5226 nt**
6. **Uzorak RS-9**, segment genoma od **384 do 5226 nt**
7. **Uzorak RS-10A**, segment genoma od **380 do 5230 nt**
8. **Uzorak RS-10B**, segmenti genoma: **657 do 2121 nt i 4526 do 5232 nt**

Svi navedeni uzorci su pokazali najveću sličnost sa sekvencama genotipa 1 iz baze podataka (BLAST poređenje sa dostupnim genomskim sekvencama B19 u NCBI bazi, tabele 3.3 i 3.4), tako da se dalja analiza genoma B19 izolata zasnivala na poređenju sekvenci naših izolata sa sekvencama izolata genotipa 1. Genotipizacija RS izolata je finalno potvrđena konstruisanjem filogenetskog stabla (navedeno u daljem tekstu).

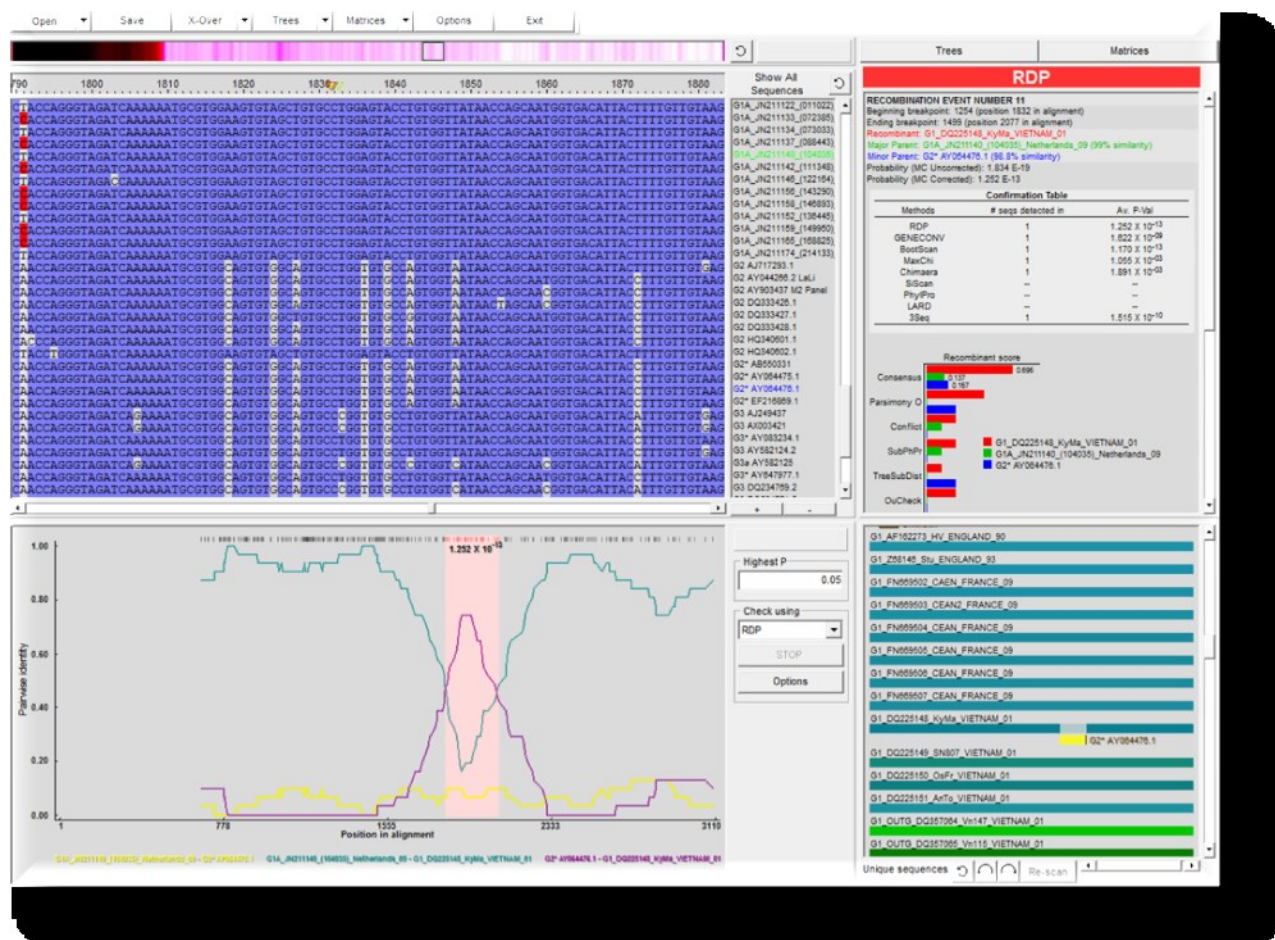
4.3 Analiza genoma B19 pozitivnih izolata

4.3.1. Provera potencijalne rekombinacije u okviru sekvenci od interesa

4.3.1.1. Analiza genoma B19 izolata RDP4 programom

Skup genomskih sekvenci izolata sva tri genotipa analiziran je pomoću alatki RDP4 programa (verzija 4.17). Analiziran je 161 izolat i to 146 izolata celih ili skoro celih sekvenci iz baza podataka (Tabela 3.3 i Tabela 3.4), 6 izolata iz Srbije sa delimičnim genomskim sekvencama (FN295732, FN295733, FN295734, FN295735, FN295736, FN295737, dužine 992 nt, od 2118 do 3110 nt, Hubschen i sar., 2009) i 8 izolata koji su dobijeni u ovom radu (RS-B1/M1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-10B). Sve B19 genomske sekvence uzoraka iz Srbije, od toga 5 skoro celih, 9 delimičnih, su uključene u ovu analizu.

RDP4 analiza svih dostupnih sekvenci genotipa 1, 2 i 3 (sa opcijama RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Cimaera i 3Seq) pokazala je da u okviru svih izolata genotipa 1 samo izolat DQ225148 (Vijetnam) pokazuje moguću rekombinaciju između genotipa 1 i 2, i to u delu od 1832 do 2077 nt, pri čemu se pretpostavlja da su izvorne sekvence JN211140 (genotip 1, major parent, 99% sličnosti, Holandija) i AY064476 (genotip 2, minor parent, 98.8% sličnosti, Vijetnam). Verovatnoća za ovaj događaj označena je kao 1.834×10^{-19} (MC Uncorrected), odnosno $1,252 \times 10^{-13}$ (MC Corrected).



Slika 4.5. RDP4 analiza za B19 genske sekvence genotipa 1, 2 i 3.

Prikaz rezultata za rekombinacioni događaj kojim je izolat DQ225148 identifikovan kao potencijalni rekombinant.

U okviru genotipa 2 i 3 veći broj sekvenci je pokazao moguću rekombinaciju, uglavnom pri krajevima genoma. U okviru ovog istraživanja dalje razmatranje je fokusirano isključivo na genotip 1.

Skup genomskih sekveneci izolata genotipa 1 (ukupno 131, kako naših tako i izolata iz baze podataka, Tabela 3.3) takođe je analiziran je pomoću alatki RDP4 programa (verzija 4.17).

RDP4 analiza svih sekvenci genotipa 1 (sa opcijama RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Cimaera i 3Seq) pokazala je da je u okviru svih izolata genotipa 1 verovatnoća postojanja rekombinacionih događaja izvan statističke značajnosti ($p > 0.05$).

4.3.1.2. Analiza genoma B19 izolata HyPhy programom pomoću Datamonkey servera

Za filogenetsku analizu su formirane grupe izolata genotipa 1 (kako dobijenih u našem radu tako i izolata iz baza podataka – i izdvojeni su izolati sa nukleotidnim sekvencama u sledećim delovima genoma: 665 - 4851 nt, 1234 - 2106 nt i 2118 - 3110 nt.

Pomoću Datamonkey servera urađena je GARD analiza za sve sekvence genotipa 1 (kako naših tako i izolata iz baze podataka), koje su kompletne u delu od 665 - 4851 nt (skoro cela cDNK, Prilog 3). Analiza modela pokazala je da je odgovarajući supstitucionni model 010010. GARD analizom 122 izolata genotipa 1 pokazano je da je verovatnoća mogućih rekombinacionih događaja izvan statističke značajnosti ($p > 0,05$). S obzirom na dobijene rezultate za dalje analize B19 genoma u okviru genotipa 1 svi pripremljeni izolati genotipa 1 su uključeni u dalju analizu.

4.3.2. Analiza odnosa stepena nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS)

Za analizu odnosa stepena nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS) formirane su grupe izolata genotipa 1 (kako dobijenih u našem radu tako i izolata iz baza podataka – Tabele 3.1 i 3.5) i izdvojeni su izolati sa kompletnim sekvencama u sledećim delovima genoma (Prilog 3):

616-2631 nt (kodirajuća sekvenca za NS1 protein)

2084-2308 nt (kodirajuća sekvenca za 7.5 kDa protein)

2624-3305 nt (kodirajuća sekvenca za VP1 jedistveni segment– VP1u)

2874-3119 nt (kodirajuća sekvenca za protein X)

3305-4969 nt(kodirajuća sekvenca za VP2 protein)

4890-5174 nt (kodirajuća sekvenca za 11 kDa protein)

Kodirajuća sekvenca za VP1 protein (2624-4969 nt) analizirana je kroz dva svoja segmenta - VP1u region i VP2 region, od kojih se sastoji.

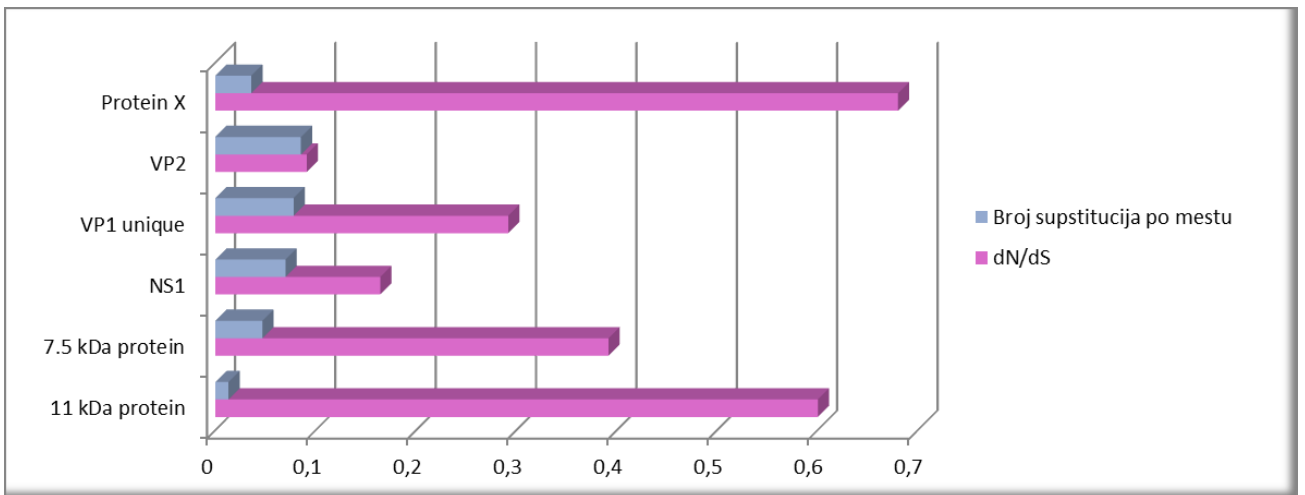
Za navedene grupe izolata, za svaki deo genoma ponaosob, urađena je SLAC analiza preko Datamonkey servera. SLAC analiza podrazumeva procenu odnosa očekivanih i dobijenih sinonimnih i nesinonimnih zamena koje program analizira u odnosu na jednu najverovatniju predačku sekvencu, a koju konstruiše na osnovu unetih sekvenci primenom *neighbor-joining* algoritma.

Pregled dobijenih rezultata dat je u tabeli 4.4.

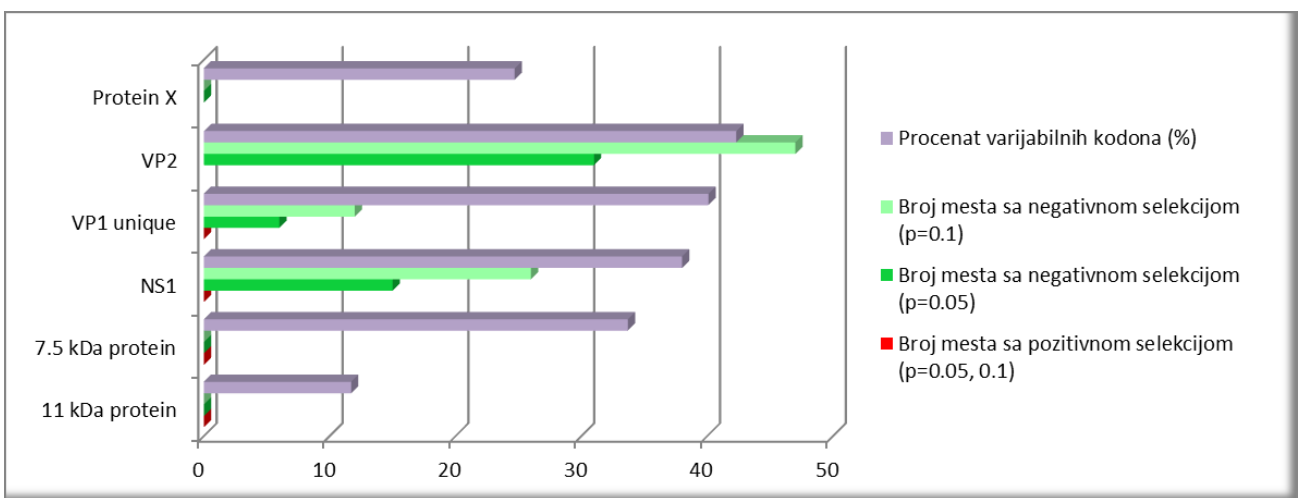
Tabela 4.4. Rezultati analize izabranih sekvenci preko Datamonkey servera.

	11 kDa protein	7.5 kDa protein	NS1	VP1u	VP2	Protein X
model	010010 HKY85	010010 HKY85	010232	010010 HKY85	010020 TrN	010010 HKY85
Broj sekvenci naše/iz baze	6/18	5/123	5/47	5/122	5/48	5/123
Br. analiziranih (bez duplikata)	9	28	42	73	45	21
Br. varijabilnih mesta/broj kodona	11/94	25/74	255/671	91/227	238/554	20/81
Procenat varijabilnih kodona	11.7%	33.7%	38%	40.1%	42.3%	24.7%
Broj zamena	11	31	417	158	420	26
Broj sinonimnih zamena	6	18	298	88	344	10
Broj nesinonimnih zamena	5	13	119	70	76	16
Broj mesta sa negativnom selekcijom (p=0.1) / po kodonu	0 / 0%	0 / 0%	26 / 3.9%	12 / 5.3%	47 / 8.5%	0 / 0%
Broj mesta sa negativnom selekcijom (p=0.05) / po kodonu	0 / 0%	0 / 0%	15 / 2.2%	6 / 2.6%	31 / 5.6%	0 / 0%
Broj mesta sa pozitivnom selekcijom (p=0.05, 0.1)	0	0	0	0	0	0
dN/dS	0.600413	0.391635	0.164392	0.291752	0.091115	0.680134
Broj supstitucija po mestu	0.0130807	0.0468402	0.0699869	0.0779535	0.0852525	0.0358628

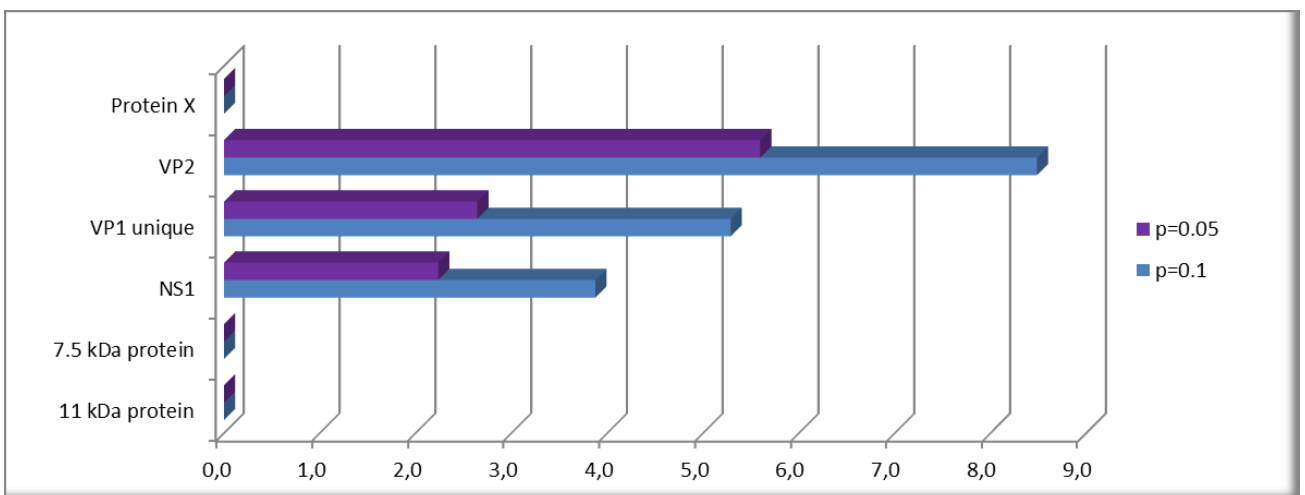
Histogramski prikazi dobijenih vrednosti analize parametara selektivnog pritiska izračunati su na osnovu nukleotidnih sekvenci izabranih izolata dati su na Slici 4.5 (odnos dN/dS i broj supstitucija po mestu), Slici 4.6 (procenat varijabilnih kodona i broj mesta sa negativnom i pozitivnom selekcijom) i Slici 4.7 (broj mesta sa negativnom selekcijom po broju kodona):



Slika 4.5. Prosečna vrednost odnosa dN/dS i broja zamena po mestu za analizirane gene



Slika 4.6. Procenat varijabilnih kodona i broj mesta sa negativnom/pozitivnom selekcijom



Slika 4.7. Pregled broja mesta sa negativnom selekcijom po broju kodona (u %)

4.4 Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma

4.4.1. Izbor genomskih segmenata za analizu

Za filogenetsku analizu pripremljeni su setovi sekvenci koje su kompletne u određenom delu, a segmenti su određeni prema principu da se analizira što je moguće veći broj izolata sa poznatom sekvencom u određenom regionu. Analizirani su sledeći segmenti genoma:

1. Prvi segment (1234 do 2104 nt). U ovom opsegu analizirano je 125 sekvenci, među kojima i 8 izolata dobijenih u ovom radu odnosno izolata iz Srbije: RS-B1/M1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-10B);
2. Drugi segment (2118 do 3110 nt). U ovom opsegu analizirano je 128 sekvenci, među kojima i 5 izolata dobijenih u ovom radu (RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9 i RS-10A) i 6 sekvenci iz Srbije (FN295732, FN295733, FN295734, FN295735, FN295736, FN295737, Hubschen i sar., 2009);
3. Skoro cela cDNK (665 do 4851 nt). U ovom opsegu analizirano je 122 sekvence, među kojima i 5 naših izolata (RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9 i RS-10A);

Oznake svih analiziranih izolata nalaze se u Prilogu 3.

4.4.2. Testiranje modela za filogenetsku analizu

4.4.2.1. Jmodeltest

Pogodni modeli za filogenetsku analizu testirani su pomoću aplikacije Jmodel test (ver. 2.1.3).

Jmodeltest analizira ukupno 88 modela, pošto je izabrano maksimalnih 11 šema supstitucije (JC, HKY, TN, TPM1, TPM2, TPM3, TIM1, TIM2, TIM3, TVM i GTR). Model je biran na osnovu AIC kriterijuma (*Akaike information criterion*).

Za analizu pogodnosti modela za **prvi segment** izabrane su sekvence navedene u odeljku 4.4.1., pri čemu su uzeti samo izolati genotipa 1 (izuzeti su izolati

DQ357064 i DQ357065 kao *outgroup*). U tabeli 4.5 je navedeno 10 najpogodnijih modela sa parametrima.

Tabela 4.5. Rezultati testiranja modela Jmodeltest aplikacijom za prvi segment.

	Model	-lnL	K	AIC	delta	AIC značajnost	kumulativna AIC značajnost
1	TIM3+I+G	2706.3041	254	5920.6082	0.0000	0.2799	0.2799
2	TIM3+I	2708.5941	253	5923.1882	2.5800	0.0771	0.3570
3	TrN+I+G	2708.6357	253	5923.2714	2.6632	0.0739	0.4309
4	GTR+I+G	2705.8572	256	5923.7144	3.1062	0.0592	0.4901
5	GTR+G	2706.9089	255	5923.8178	3.2095	0.0562	0.5464
6	TrN+G	2709.9272	252	5923.8544	3.2461	0.0552	0.6016
7	TIM3+G	2709.0887	253	5924.1773	3.5691	0.0470	0.6486
8	TPM3uf+I+G	2709.1190	253	5924.2381	3.6298	0.0456	0.6942
9	GTR+I	2707.2516	255	5924.5033	3.8950	0.0399	0.7341
10	TIM1+I+G	2708.3134	254	5924.6268	4.0186	0.0375	0.7716

-lnL: negativan logaritam verovatnoće (eng. *negative log likelihood*); K: broj procenjivanih parametara; AIC: *Akaike Information Criterion*; delta – odstupanje AIC od minimalnog; AIC značajnost (eng. *weight*); kumulativna AIC značajnost (eng. *cumWeight*).

Nakon analize kao najpogodniji model za prvi segment definisan je model TIM3+I+G. Od modela koje podržava program MEGA5 najbolje je rangiran model TPM3uf+I+G.

Za analizu pogodnosti modela za **drugi segment** izabrane su sekvence navedene u odeljku 4.4.1., pri čemu su izuzete DQ357064 i DQ357065 (*outgroup* sekvence). U tabeli 4.6 je navedeno 10 najpogodnijih modela sa parametrima.

Tabela 4.6. Rezultati testiranja modela Jmodeltest aplikacijom za drugi segment.

	Model	-lnL	K	AIC	delta	AIC značajnost	kumulativna AIC značajnost
1	TPM2uf+I+G	2930.1276	259	6378.2553	0.0000	0.2483	0.2483
2	TPM3uf+I+G	2930.5750	259	6379.1500	0.8947	0.1587	0.4070
3	TVM+I+G	2928.7268	261	6379.4536	1.1984	0.1364	0.5433
4	HKY+I+G	2931.9714	258	6379.9427	1.6875	0.1068	0.6501
5	TIM2+I+G	2930.1222	260	6380.2443	1.9890	0.0918	0.7419
6	TIM3+I+G	2930.5727	260	6381.1454	2.8901	0.0585	0.8004
7	GTR+I+G	2928.7248	262	6381.4496	3.1943	0.0503	0.8507
8	TrN+I+G	2931.9669	259	6381.9338	3.6785	0.0395	0.8902
9	TPM1uf+I+G	2931.9673	259	6381.9347	3.6794	0.0394	0.9296
10	TIM1+I+G	2931.9628	260	6383.9257	5.6704	0.0146	0.9442

-lnL: negativan logaritam verovatnoće (eng. *negative log likelihood*); K: broj procenjivanih parametara; AIC: *Akaike Information Criterion*; delta – odstupanje AIC od minimalnog; AIC značajnost (eng. *weight*); kumulativna AIC značajnost (eng. *cumWeight*).

Nakon analize kao najpogodniji model za drugi segment definisan je model TPM2uf+I+G, koji podržava i program MEGA5.

Za analizu pogodnosti modela za skoro cele sekvence (sekvence kompletne od 665 do 4851 nt) izabrane su sekvence navedene u odeljku 4.4.1., pri čemu su izuzete sekvence DQ357064 i DQ357065 (*outgroup* sekvence), ali i AF161223, AF161224 i AF161222 kao i RS-B1/M1 (za koje nedostaje deo sekvence od dvadesetak nukleotida u regionu između 4000 do 4100 nt). U tabeli 4.7 je navedeno 10 najpogodnijih modela sa parametrima.

Tabela 4.7. Rezultati testiranja modela Jmodeltest aplikacijom za skoro cele sekvence.

	Model	-lnL	K	AIC	delta	AIC značajnost	kumulativna AIC značajnost
1	TIM3+I+G	14168.0989	238	28812.1979	0.0000	0.8137	0.8137
2	GTR+I+G	14167.6022	240	28815.2044	3.0065	0.1810	0.9947
3	TrN+I+G	14174.7699	237	28823.5399	11.3420	0.0028	0.9975
4	TIM2+I+G	14174.4922	238	28824.9845	12.7866	0.0014	0.9988
5	TIM1+I+G	14174.7646	238	28825.5293	13.3314	0.0010	0.9999
6	TPM3uf+I+G	14178.1585	237	28830.3169	18.1191	9.46e-005	1.0000
7	TVM+I+G	14177.5715	239	28833.1431	20.9452	2.30e-005	1.0000
8	HKY+I+G	14184.5153	236	28841.0306	28.8327	4.46e-007	1.0000
9	TPM2uf+I+G	14184.1557	237	28842.3113	30.1134	2.35e-007	1.0000
10	TPM1uf+I+G	14184.5096	237	28843.0192	30.8213	1.65e-007	1.0000

-lnL: negativan logaritam verovatnoće (eng. *negative log likelihood*); K: broj procenjivanih parametara; AIC: *Akaike Information Criterion*; delta – odstupanje AIC od minimalnog; AIC značajnost (eng. *weight*); kumulativna AIC značajnost (eng. *cumWeight*).

Nakon analize kao najpogodniji model za skoro cele sekvence definisan je model TIM3+I+G. Od modela koje podržava program MEGA5 najbolje je rangiran model TPM3uf+I+G.

4.4.2.2. MEGA testiranje modela za filogenetsku analizu

Pogodni modeli za filogenetsku analizu testirani su pomoću programskog paketa MEGA 5 (verzija 5.05, Nei i Kumar, 2000; Tamura i sar., 2011).

Za analizu pogodnosti modela izabrane su sekvence navedene u prethodnom odeljku, pri čemu su izuzete sekvence DQ357064 i DQ357065 (*outgroup* sekvence). Analiza je izvršena na osnovu automatski kreiranog stabla (pomoću *neighbor-joining* algoritma), kao statistički metod izabran je ML (*maximum*

likelihood), i izabrani su odgovarajući tip supstitucije (nukleotid) i opcija kompletne delecije nedostajućih podataka. Uključene su sve pozicije nukleotida (1st+2nd+3rd+Noncoding) a nedostajući podaci i prekidi sekvence (eng. *gap*) su eliminisani iz analize.

Modeli sa najnižim vrednostima za BIC (*Bayesian Information Criterion*) smatraju se najpogodnijim za opisivanje supstitucione šeme. Za svaki model navedene su i AICc vrednosti (*Akaike Information Criterion, corrected*), *Maximum Likelihood* vrednost (*lnL*), i broj parametara (uključujući dužinu grana).

Testiranje modela izvršeno je za prvi i drugi segment i za skoro celu cDNK (kako je navedeno u odeljku 4.4.1, a po 10 najpogodnijih modela za svaku grupu sekvenci navedno je u tabelama 4.8, 4.9 i 4.10.

Tabela 4.8. Rezultati testiranja modela MEGA5 programom za prvi segment.

	Model	Parametri	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
1	T92+G	248	8317.404	5939.963	-2721.409	n/a	0.20	3.23
2	T92+I	248	8321.667	5944.226	-2723.541	0.72	n/a	3.23
3	T92+G+I	249	8327.376	5940.354	-2720.600	0.49	0.77	3.23
4	HKY+G	250	8334.221	5937.616	-2718.226	n/a	0.20	3.26
5	TN93+G	251	8339.548	5933.362	-2715.095	n/a	0.20	3.22
6	HKY+G+I	251	8344.070	5937.884	-2717.355	0.49	0.76	3.26
7	TN93+G+I	252	8349.427	5933.659	-2714.239	0.50	0.79	3.22
8	K2+G	247	8350.880	5983.021	-2743.943	n/a	0.20	3.21
9	K2+I	247	8355.910	5988.051	-2746.458	0.72	n/a	3.21
10	K2+G+I	248	8359.314	5981.873	-2742.364	0.49	0.73	3.22

(+I) – parametar koji uzima u obzir da je deo mesta evolutivno invarijabilan

(+G) – parametar koji uzima u obzir nejednake stope evolucije za različita mesta koja se mogu svrstati u 5 kategorija na osnovu Gama distribucije.

(R) – parametar koji ukazuje na nejednak odnos tranzicija/transverzija

GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

BIC: *Bayesian Information Criterion*; AICc: *Akaike Information Criterion, corrected*; lnL, logaritam verovatnoće, *Maximum Likelihood* vrednost

Tabela 4.9. Rezultati testiranja modela MEGA5 programom za drugi segment.

	Model	Parametri	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
1	T92+G	254	8854.220	6380.297	-2935.634	n/a	0.14	4.07
2	T92+I	254	8857.914	6383.992	-2937.481	0.76	n/a	4.07
3	K2+G	253	8859.311	6395.124	-2944.051	n/a	0.14	4.09
4	T92+G+I	255	8859.788	6376.129	-2932.545	0.58	0.77	4.07
5	K2+I	253	8862.999	6398.812	-2945.895	0.77	n/a	4.09
6	K2+G+I	254	8864.343	6390.420	-2940.695	0.58	0.75	4.10
7	HKY+G	256	8877.522	6384.128	-2935.541	n/a	0.14	4.09
8	HKY+I	256	8881.173	6387.779	-2937.366	0.77	n/a	4.09
9	HKY+G+I	257	8883.034	6379.904	-2932.425	0.58	0.77	4.09
10	TN93+G	257	8889.264	6386.133	-2935.539	n/a	0.14	4.09

(+I) – parametar koji uzima u obzir da je deo mesta evolutivno invarijabilan

(+G) – parametar koji uzima u obzir nejednake stope evolucije za različita mesta koja se mogu svrstati u 5 kategorija na osnovu Gama distribucije.

(R) – parametar koji ukazuje na nejednak odnos tranzicija/transverzija

GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

BIC: *Bayesian Information Criterion*; AICc: *Akaike Information Criterion, corrected*; lnL, logaritam verovatnoće, *Maximum Likelihood* vrednost

Prema navedenim rezultatima, za filogenetsku analizu prvog i drugog segmenta najpogodniji je Tamura 3-parametarski model (+G).

Tabela 4.10. Rezultati testiranja modela MEGA5 programom za skoro cele cDNK.

	Model	Parametri	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
1	T92+G+I	241	32358.355	29680.289	-14599.027	0.56	0.83	3.40
2	TN93+G+I	244	32370.763	29659.364	-14585.561	0.56	0.82	3.40
3	HKY+G+I	243	32379.127	29678.839	-14596.300	0.56	0.83	3.44
4	T92+G	240	32388.952	29721.998	-14620.882	n/a	0.18	3.40
5	GTR+G+I	247	32399.818	29655.084	-14580.418	0.55	0.79	3.41
6	TN93+G	243	32401.916	29701.627	-14607.694	n/a	0.19	3.39
7	HKY+G	242	32409.900	29720.724	-14618.243	n/a	0.18	3.43
8	GTR+G	246	32430.918	29697.296	-14602.525	n/a	0.19	3.40
9	K2+G+I	240	32478.787	29811.833	-14665.799	0.56	0.81	3.40
10	K2+G	239	32510.732	29854.889	-14688.329	n/a	0.18	3.39

(+I) – parametar koji uzima u obzir da je deo mesta evolutivno invarijabilan

(+G) – parametar koji uzima u obzir nejednake stope evolucije za različita mesta koja se mogu svrstati u 5 kategorija na osnovu Gama distribucije.

(R) – parametar koji ukazuje na nejednak odnos tranzicija/transverzija

GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

BIC: *Bayesian Information Criterion*; AICc: *Akaike Information Criterion, corrected*; lnL, logaritam verovatnoće, *Maximum Likelihood* vrednost

Prema navedenim rezultatima, za filogenetsku analizu skoro cele cDNK najpogodniji je Tamura 3-parametarski model (+G +I).

Navedeni modeli korišćeni su pri određivanju distanci i konstruisanju filogenetskih stabala.

4.4.3. Određivanje nukleotidnih distanci

4.4.3.1. Određivanje nukleotidne distance (*pairwise distance*) svih uzoraka

Genetička distanca određivana je na osnovu nukleotidnih sekvenci u programu MEGA5, opcijom „*Compute pairwise distances*“. Analizirani su parovi sekvenci (procenjena je genetička udaljenost za svaki par ponaosob), primenom Tamura-3 parametarske metode i Bootstrap metode za procenu standardne greške (sa 500 replikata). Ostale opcije su podešene kako je opisano za testiranje modela. Gama parametar (G) je, prema vrednosti dobijenoj za testiranje modela, za prvi segment podešen na 0.2, za drugi segment na 0.14 a za skoro cele sekvence na 0.83.

Tabela 4.11. Rezultati određivanja nukleotidne distance (*pairwise distance*) svih uzoraka MEGA5 programom.

Analiza na osnovu	Prosečna distanca	Standardna greška	Maksimalna distanca	Maksimalno udaljeni izolati
prvog segmenta	1.4%	0.004	11.5%	RS-M2 i DQ357064
drugog segmenta	1.0%	0.003	6.3%	DQ293995 i DQ3570645
skoro cele cDNK	1.3 %	0.002	6.8%	JN211138 i DQ3570645

Prosečna genetička distanca procenjena na osnovu prvog segmenta bila je 0.014 (1.4%). Maksimalna genetička distanca utvrđena je između uzorka RS-M2 i izolata DQ357064 (*outgroup* izolat iz Vijetnama) i iznosila je 0.115, odnosno 11.5%. Standardna greška je u proseku bila 0.004 (od 0.000 do 0.018).

Prosečna genetička distanca procenjena na osnovu drugog segmenta bila je 0.010 (1.0%). Maksimalna genetička distanca utvrđena je između uzorka DQ293995 (Belgija) i izolata DQ3570645 (*outgroup* izolat iz Vijetnama) i iznosila je 0.063, odnosno 6.3%. Standardna greška je u proseku bila 0.003 (od 0.000 do 0.013).

Prosečna genetička distanca procenjena na osnovu skoro celih sekvenci bila je 0.013 (1.3%). Maksimalna genetička distanca utvrđena je između uzorka JN211138 (Holandija) i izolata DQ3570645 (*outgroup* izolat iz Vijetnama) i iznosila je 0.068, odnosno 6.8%. Standardna greška je u proseku bila 0.002 (od 0.000 do 0.004).

4.4.3.2. Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka

Grupe uzoraka određene su prema geografskom poreklu (Srbija, Japan, Finska, Nemačka, Švedska, SAD, Belgija, Engleska, Francuska, Vijetnam i Holandija). Dva *outgroup* izolata (inače poreklom iz Vijetnama) izdvojena su u posebnu grupu.

Genetička distanca na osnovu nukleotidnih sekvenci u okviru grupa određena je u programu MEGA5 opcijom „*Compute within group mean distance*“, dok je genetička distanca između grupa određena opcijom „*Compute between group mean distance*“ i to za sva tri izabrana segmenta primenom prethodno navedenih parametara.

Genetičke distance između grupa navedene su u tabeli 4.12, a genetičke distance između grupa (odnosno distanca ostalih grupa u odnosu na Srbiju) u tabeli 4.13. Standardna greška za genetičke distance u okviru grupa bila je u proseku oko 0.002, a između grupa oko 0.003 (0.002 do 0.004).

Tabela 4.12. Nukleotidne distance u okviru grupa.

Grupa	Broj uzoraka	Nukleotidna distanca u okviru grupe (%) na osnovu:			Prosek (%)
		prvog segmenta	drugog segmenta	skoro cele sekvence ^{d)}	
SAD	5	0.48	0.68	0.95	0.70
Engleska	3	0.80	0.64	0.80	0.75
Nemacka	13	0.73	0.68	0.92	0.78
Srbija	8^{a)}/11^{b)}/5^{c)}	0.80	0.73	0.93	0.82
Francuska	5	1.01	0.82	0.97	0.93
Holandija	65	1.05	0.82	1.17	1.01
Belgija	2	1.09	1.09	0.84	1.01
<i>outgroup</i>	2	1.33	0.41	1.31	1.02
Finska	4	0.79	1.07	1.33	1.06
Japan	13	1.08	1.02	1.33	1.14
Vijetnam	4	2.31	0.78	1.45	1.51
Svedska	1	N/A	N/A	N/A	N/A
^{a)} Izolati iz Srbije za prvi segment: 8 izolata (RS-B1/M1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-10B); ^{b)} Izolati iz Srbije za drugi segment: 11 izolata (5 naših izolata, RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9, RS-10A i 6 izolata iz Srbije preuzetih iz literature (delimične sekvence, Hubschen i sar., 2009); ^{c)} Izolati iz Srbije za skoro cele sekvence: 5 izolata (RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9, RS-10A) ^{d)} Za analizu na osnovu skoro celih sekvenci korišćeni su i izolati kojima nedostaje mali deo sekvence (do 50 nukleotida - RS-B1/M1 i izolati iz Finske AF161223, AF161224 i AF161225 koji imaju nedefinisan manji deo sekvence u regionu od 4000 do 4100 nukleotida).					

Za određivanje nukleotidnih distanci korišćena je Tamura-3 parametarska metoda, Bootstrap metoda za procenu standardne greške (sa 500 replikata) i Gama parametar (G) za prvi segment 0.2, za drugi segment 0.14 a za skoro cele sekvence 0.83.

Tabela 4.13. Nukleotidna distanca izolata iz Srbije u odnosu na ostale definisane grupe

Grupa	Broj uzoraka	Nukleotidna distanca izolata iz Srbije u odnosu na grupe (%) na osnovu:			Prosek (%)
		prvog segmenta	drugog segmenta	skoro cele sekvence ^{a)}	
Francuska	6	1.0	0.9	1.0	0.97
SAD	5	0.9	0.8	1.3	1.00
Švedska	1	1.0	0.7	1.3	1.00
Engleska	3	1.1	0.8	1.2	1.03
Holandija	65	1.1	0.9	1.2	1.07
Finska	4	1.1	1.0	1.3	1.13
Nemacka	13	1.3	1.0	1.4	1.23
Belgija	2	1.4	1.1	1.3	1.27
Japan	13	1.3	1.1	1.5	1.30
Vijetnam	4	2.5	1.1	1.9	1.83
<i>outgroup</i>	2	10.0	5.0	6.3	7.10

^{a)} Za analizu na osnovu skoro celih sekvenci korišćeni su i izolati kojima nedostaje mali deo sekvence (do 50 nt - RS-B1/M1 i izolati iz Finske AF161223, AF161224 i AF161225 koji imaju nedefinisan manji deo sekvence u regionu od 4000 do 4100 nt).

Za određivanje nukleotidnih distanci korišćena je Tamura-3 parametarska metoda, Bootstrap metoda za procenu standardne greške (sa 500 replikata) i Gama parametar (G) za prvi segment 0.2, za drugi segment 0.14 a za skoro cele sekvence 0.83.

4.4.3.3. Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka iz Srbije

Definisane su dve grupe uzoraka, jedna grupa od 5 uzoraka sakupljenjih u okviru našeg rada (RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9, RS-10A u periodu od 2009. do 2012. godine i grupa od 6 izolata iz Srbije preuzetih iz literature (delimične sekvence, uzorci sakupljeni 2007 godine, Hubschen i sar., 2009). Navedeni uzorci bili su kompletni u delu genoma od 2118 do 3110 nt (drugi segment).

Genetičke distance u okviru grupe su bile 0.36% za uzorke sakupljene 2007. godine i 0.75% za uzorke sakupljene u periodu od 2009. do 2012. godine.

Genetička distanca između ove dve grupe uzoraka određena na osnovu nukleotidnih sekvenci drugog segmenta, primenom parametara definisanih u odeljku 4.4.3.1. je **0.90%** (odnosno 0.009 sa standardnom greškom od 0.002).

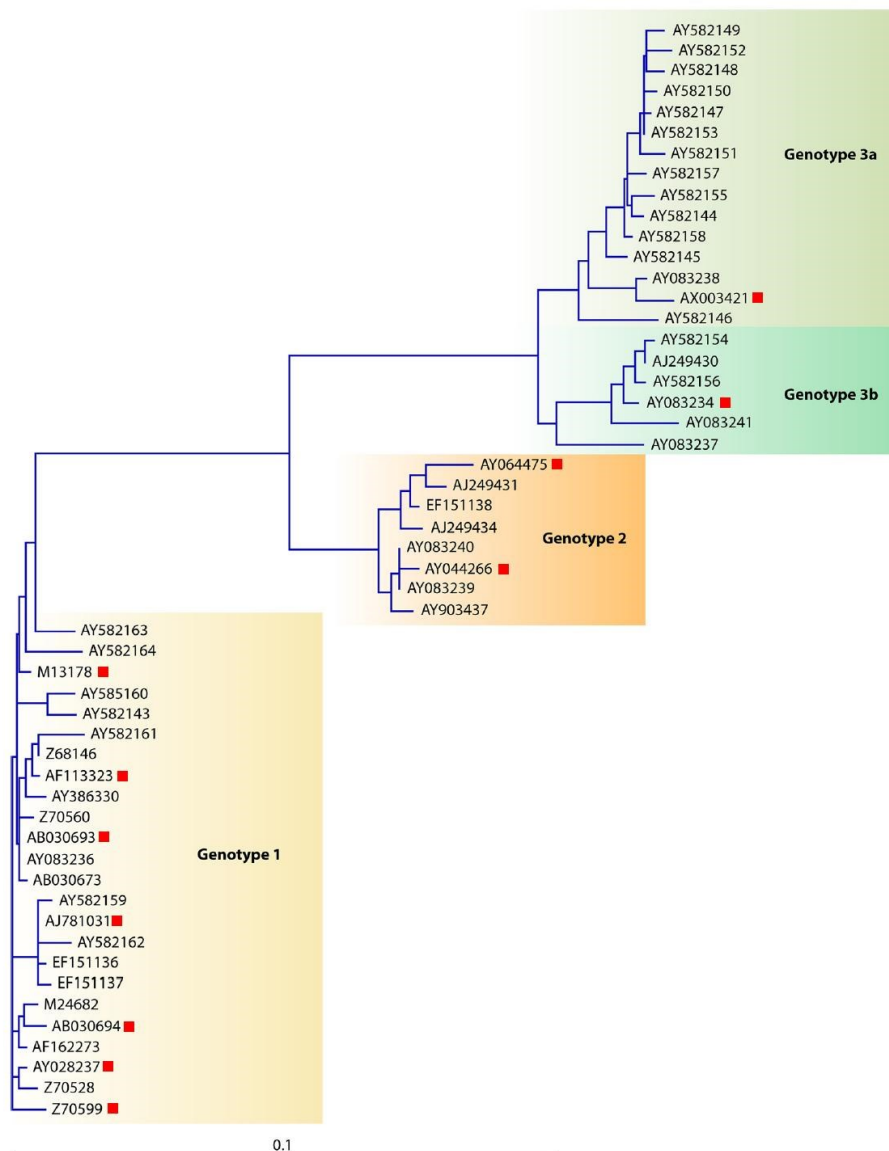
4.4.4. Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidnih sekvenci

Konstruisana su tri filogenetska stabla, jedno sa manjim brojem izolata sva tri genotipa u cilju potvrde genotipizacije izolata dobijenih u ovom radu i dva filogenetska stabla za izolate genotipa 1 u cilju deteljnije filogenetske analize.

Filogenetska stabla konstruisana su u programu MEGA5, opcijom „*Construct/test neighbor joining tree*“, obzirom na relativno malu prosečnu genetičku distancu između sekvenci (1.0 do 1.4%). Filogenetski odnosi određivani su poređenjem nukleotidnih sekvenci genoma analiziranih izolata B19.

4.4.4.1. Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidne sekvence reprezentativnih izolata sva tri genotipa

Filogenetsko stablo u cilju potvrde genotipizacije konstruisano je na osnovu izolata već korišćenih u ovom radu (Tabele 3.3 i 3.4), za koje je potvrđen genotip i koji pripadaju, prema reviji Servant-Delmas et.al. 2010, nekim od klastera primećenih u okviru genotipova (Slika 4.8).



Slika 4.8. Filogenetski odnosi između humanih eritrovirusa na osnovu NS1-VP1u sekvenci (858 nt). Analiza sekvence urađena je upotrebom *neighbor-joining* algoritma na osnovu *Kimura 2 parameter distance estimation* metode. Crvenim kvadratićima su označeni izolati koji su, pored izolata dobijenih u ovom radu, korišćeni u konstrukciji filogenetskog stabla (genotip 1: M13178 (prototip pvbau), AF113323, AB030693, AJ781031, AB030694, AY028237, Z70599, genotip 2: AY044266 (prototip Lali) i AY064475 (A6), genotip 3a: AX003421 (prototip V9) i 3b: AY083234 (prototip D91.1). Modifikovano prema Servant-Delmas i sar., 2010.

Filogenetsko stablo konstruisano je u programu MEGA5, opcijom „*Construct/test neighbor joining tree*“. Korišćeno je 19 izolata (11 iz baza podataka i 8 RS izolata) za koje su dostupne nukleotidne sekvence u različitom opsegu i to od 380 do 5311 nt za RS-B1/M1, od 1234 do 2109 nt za uzorak RS-M2, od 380 do 5226 nt za uzorak RS-4, od 1224 do 2106 nt za uzorak RS-7, od 384 do 5226 nt za uzorak RS-8, od 384 do 5226 nt za uzorak RS-9, od 380 do 5230 nt za uzorak RS-10A, od 657

do 2121 nt i od 4526 do 5232 nt za uzorak RS-10B, od 181 do 5292 nt za M13178, od 605 do 5142 nt za AF113323, od 245 do 5047 nt za AB030693 i AB030694, od 631 do 5056 nt za AJ781031, od 605 do 5117nt za AY028237, od 598 do 5111 nt za Z70599, od 201 do 5143 nt za AY044266, od 373 do 5225 nt za AY064475, od 280 do 5316 nt za AX003421 i od 286 do 5310 nt za AY083234. Sve pozicije koje su sadržale gepove ili za koje nisu bili dostupni podaci su eliminisane iz analize (opcija kompletne delecije nedostajućih podataka „*deletion*“, uz uključene sve pozicije kodona – prvi, drug, treći i nekodirajući), tako da je finalno analizirano 873 pozicije.

Za ovaj set sekvenci urađeno je testiranje modela MEGA5 programskim paketom i rezultati testiranja za 3 najbolje rangirana modela su dati u tabeli 4.14.

Tabela 4.14. Rezultati testiranja modela MEGA5 programom za reprezentativne izolate sva tri genotipa i RS uzorke.

Model	Parametri	BIC	AICc	<i>lnL</i>	(+I)	(+G)	R
T92+G	38	4977.020	4683.977	-2303.899	n/a	0.16	2.88
T92+G+I	39	4986.630	4685.880	-2303.846	0.18	0.24	2.91
HKY+I	40	4989.745	4681.288	-2300.545	0.73	n/a	2.97

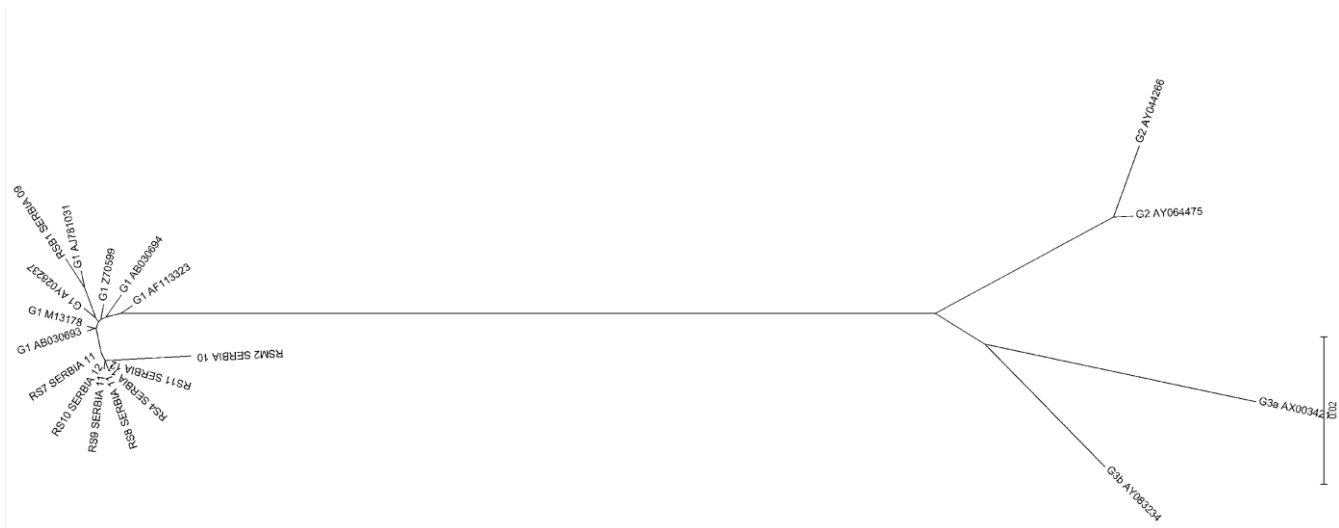
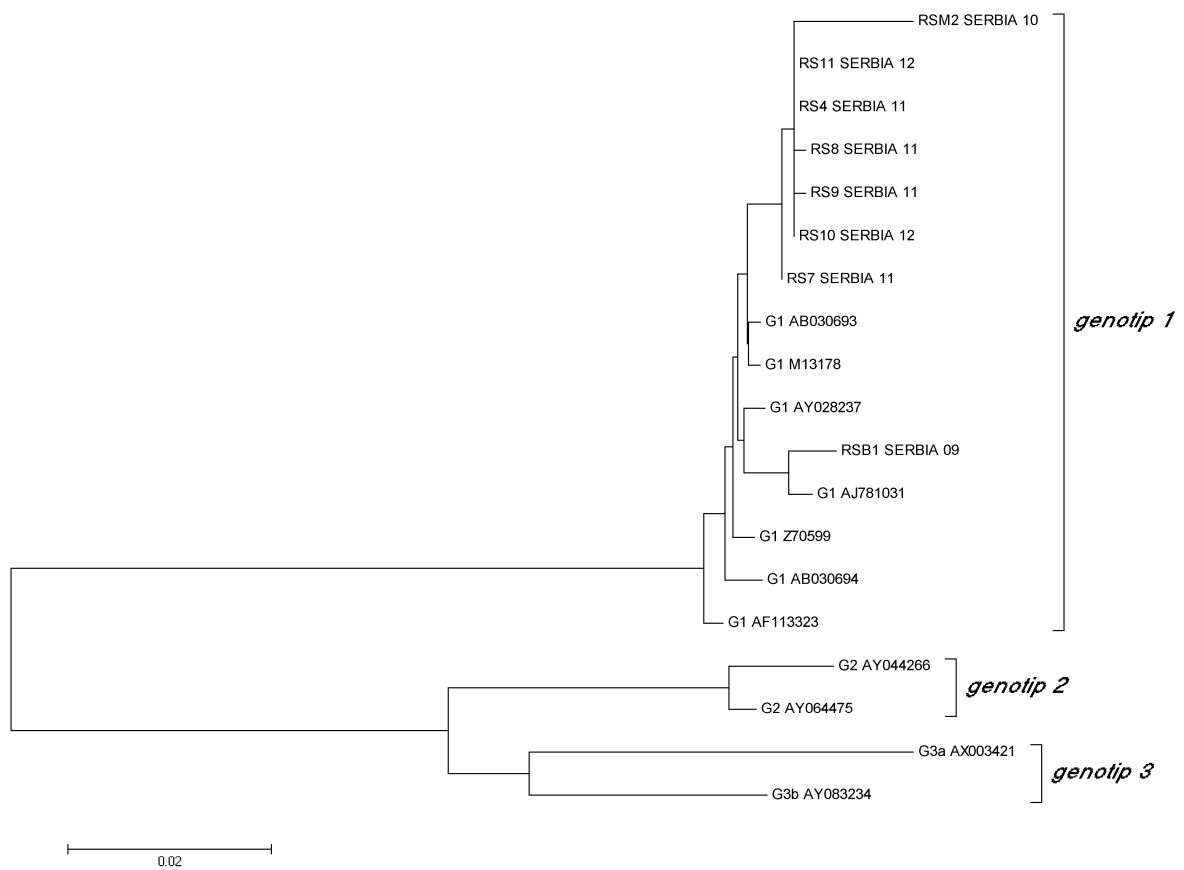
(+I) – parametar koji uzima u obzir da je deo mesta evolutivno invarijabilan

(+G) – parametar koji uzima u obzir nejednake stope evolucije za različita mesta koja se mogu svrstati u 5 kategorija na osnovu Gama distribucije.

(R) – parametar koji ukazuje na nejednak odnos tranzicija/transverzija

HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; T92: Tamura 3-parameter;

Na osnovu navedenog, genetičke distance računane su na osnovu nukleotidnih sekvenci, Tamura-3 parametarskim metodom uz Bootstrap metodu za procenu standardne greške (sa 500 replikata), a Gama parametar (G) je, prema vrednosti dobijenoj za testiranje modela, podešen na 0.16. Prikazano je optimalno stablo dobijeno *neighbor-joining* algoritmom za koje je suma dužine grana 0.26720255, prikazano srazmerno u odnosu na izračunate distance (Slike 4.9.a i 4.9.b).



Slika 4.9 Filogenetsko stablo 11 reprezentivnih izolata sva tri genotipa i 8 RS izolata; Pravougaono (a) i radijalno (b) grananje.

Stablo je konstruisano u MEGA 5 programu upotrebom *neighbor-joining* algoritma na osnovu nukleotidne sekvence dužine 873 nt.

Na stablu se izdvajaju genotip 2 i 3 (3a i 3b), koji su međusobno evolutivno bliži, i genotip 1 u okviru koga se grupišu i svi RS izolati (RS-B1/M1, na stablu označen kao B1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-10B. Svi RS izolati grupišu se u jedinstvenom klasteru u okviru genotipa 1, osim izolata RS-B1/M1 koji se grupiše zajedno sa izolatom AJ781031, takođe u okviru genotipa 1.

4.4.4.2. Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidne sekvence cDNK od 665 do 4851 nt (skoro cele sekvence, 4186 nukleotida)

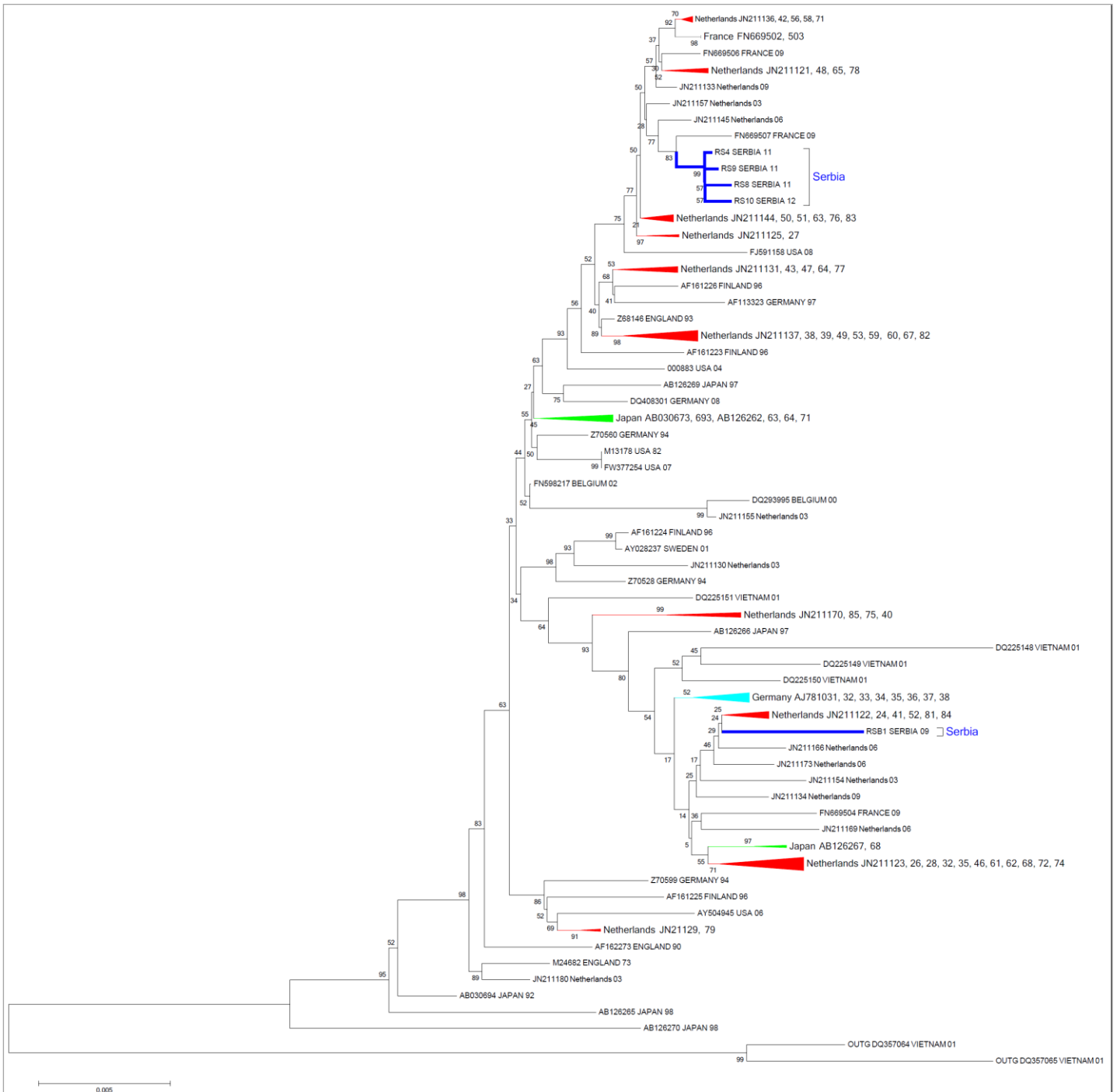
Prvo filogenetsko stablo za analizu u okviru genotipa 1 konstruisano je na osnovu skoro celih cDNK (odnosno segmenta dužine 4186 nt, od 665. do 4851. pozicije u genomu). Ovaj segment izabran je kako bi bio analiziran što veći broj uzoraka u što većoj dužini sekvence.

Filogenetsko stablo konstruisano je na osnovu 122 izolata kompletnih sekvenci u navedenom opsegu, i to 117 izolata iz baza podataka (Tabela 3.3) i 5 RS izolata koji su kompletni u tom segmentu (RS-4, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-B1/M1, na stablu označen kao RS-B1).

Filogenetsko stablo konstruisano je u programu MEGA5, opcijom „*Construct/test neighbor joining tree*“. Sve pozicije koje su sadržale gepove ili za koje nisu bili dostupni podaci su eliminisane iz analize (opcija kompletne delecije nedostajućih podataka „*deletion*“, uz uključene sve pozicije kodona – prvi, drugi, treći i nekodirajući), tako da je finalno analizirano 4129 pozicija. Na osnovu navedenog u odeljku 4.4.3.1, distance su računane Tamura-3 parametarskim metodom uz Bootstrap metodu za procenu standardne greške (sa 500 replikata), a Gama parametar (G) je, prema vrednosti dobijenoj za testiranje modela, podešen na 0.83.

Prikazano je optimalno stablo dobijeno *neighbor-joining* algoritmom za koje je suma dužine grana 0.34372534, prikazano srazmerno u odnosu na izračunate distance.

Na osnovu ovako konstruisanog filogenetskog stabla izolati genotipa 1 se grupišu u više klastera, pri čemu se u odnosu na *outgroup* sekvence odvajaju prvo manji klasteri, pa zatim dva glavna klastera u koje se grupiše većina izolata. Svi RS izolati grupišu se zajedno u okviru jednog većeg klastera, osim RS-B1/M1 (označen na stablu kao B1) koji je prema ovom stablu grupisan najbliže izolatima iz Holandije (JN211122, JN211124, JN211141, JN211152, JN211181, JN211184) u okviru drugog većeg klastera (Slika 4.10).



Slika 4.10 Filogenetsko stablo konstruisano u MEGA 5 programu, na osnovu cDNK 122 izolata od 665. do 4851. nukleotida (skoro cele sekvence).

Stablo je konstruisano upotrebom *neighbor-joining* algoritma. Brojnije grupe izolata označene su bojama: izolati iz Holandije su označeni crvenom bojom, iz Japana zelenom a iz Nemačke svetloplavom bojom. Izolati iz Srbije označeni su tamnoplavom bojom.

Slika 4.10 u većem formatu nalazi se u Prilogu 4.

4.4.4.3. Ispitivanje filogenetskih odnosa B19 genoma na osnovu nukleotidne sekvence dela sekvence od 2118 do 3110 nt (drugi segment)

Drugo filogenetsko stablo za analizu u okviru genotipa 1 konstruisano je na osnovu drugog segmenta (odnosno segmenta dužine 993 nt, od 2118. do 3110. pozicije u genomu) ukupno 128 izolata (122 izolata korišćena u prethodnoj analizi uz još 6 sekvenci iz Srbije iz 2007. godine (Hubschen i sar., 2009)).

Ovaj segment izabran je kako bi se u analizu uključili svi dostupni izolati iz Srbije. Filogenetsko stablo konstruisano je u programu MEGA5, opcijom „*Construct/test neighbor joining tree*“. Sve pozicije koje su sadržale gepove ili za koje nisu bili dostupni podaci su eliminisane iz analize (opcija kompletne delecije nedostajućih podataka *deletion*, uz uključene sve pozicije kodona – prvi, drugi, treći i nekodirajući), tako da je finalno analizirano 992 pozicije. Kao što je navedeno u odeljku 4.4.3.1, distance računane su Tamura-3 parametarskim metodom uz Bootstrap metodu za procenu standardne greške (sa 500 replikata), a Gama parametar (G) je, prema vrednosti dobijenoj za testiranje modela, podešen na 0.14. Prikazano je optimalno stablo dobijeno *neighbor-joining* algoritmom za koje je suma dužine grana 0.24992957.



Slika 4.11 Filogenetsko stablo konstruisano u MEGA 5 programu, na osnovu cDNK 128 izolata od 2118. do 3110. nukleotida (drugi segment).

Stablo je konstruisano upotrebom *neighbor-joining* algoritma. Brojnije grupe izolata označene su bojama: izolati iz Holandije su označeni crvenom bojom, iz Japana zelenom a iz Nemačke svetloplavom bojom. Izolati iz Srbije označeni su tamnoplavom bojom.

Slika 4.11 u većem formatu nalazi se u Prilogu 4.

Na osnovu ovako konstruisanog filogenetskog stabla izolati genotipa 1 se grupišu u više klastera, pri čemu se u odnosu na *outgroup* sekvence odvajaju prvo manji klasteri, pa zatim dva glavna klastera u koje se grupiše većina izolata. RS izolati RS-4, RS-8, RS-9 i RS-10A, odnosno svi analizirani osim RS-B1/M1 (označen na stablu kao B1) grupišu se zajedno u okviru jednog većeg klastera, a u okviru istog klastera, relativno blisko, grupiše se i pet od šest izolata iz Srbije iz 2007. godine- FN295733, FN295734, FN295735, FN295736 i FN295737. U okviru drugog većeg klastera nalaze se izolati RS-B1/M1 (označen na stablu kao B1) koji je prema ovom stablu grupisan najbliže izolatu iz Holandije (JN211126), i šesti izolat iz Srbije FN295732 (Slika 4.11). Slike filogenetskih stabala u većem formatu su radi preglednosti date i u Prilogu 4.

4.4.5. Retke i jedinstvene nukleotidne supstitucije u genomima B19 RS izolata

Sekvence RS izolata su nakon poravnanja upoređene sa sekvencom referentnog izolata NC_000883. Uočene su i tabelarno prikazane sve nesinonimne zamene, bez obzira na njihovu učestalost u bazi podataka (*DataBase*, DB). Pored toga, prikazane su i sve sinonimne (*silent*) supstitucije ukoliko su u poređenju sa podacima u DB one jedinstvene (*unique*), ili ukoliko se mogu smatrati retkim (sa učestalošću ispod 5%). Broj dostupnih izolata sa određenom sekvencom varira od pozicije do pozicije, ali su u analizi korišćeni svi dostupni podaci zaključno sa 01.06.2013. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.15.

Tabela 4.15. Nukleotidne i aminokiselinske supstitucije u analiziranim izolatima iz Srbije u odnosu na referentnu sekvencu NC_000883, u poređenju sa dostupnim sekvencama izolata u *DataBase* .

Nt pozicija 1)	AK zamena 2)	Nt zamena	RS-B1/M1	RS-4	RS-8	RS-9	RS-10A	RS-7	RS-M2	Unique RS/DB	Retka ³⁾ RS/DB
P6											
402	/	C→G	C→G					ns	ns	0/48	
487	/	C→T		C→T				ns	ns	0/72	
534	/	C→T		C→T				ns	ns	0/71	
569	/	T→C		T→C	T→C	T→C	T→C	ns	ns		1/71
NS1											
666	<i>silent</i> ⁴⁾	T→C		T→C							14/146
771	<i>silent</i>	T→C		T→C	T→C	T→C	T→C	ns	ns		2/146
956	E114G	A→G	A→G					ns	ns		
978	<i>silent</i>	G→A					G→A	ns	ns	0/159	
1020	<i>silent</i>	G→A		G→A	G→A	G→A	G→A	ns	ns		5/161
1176	<i>silent</i>	T→C		T→C	T→C	T→C	T→C	ns	ns		1/161
1158	I181M	T→G	T→G					ns	ns		
1198	S195P	T→C	T→C					ns	ns		1/116
1217	E201V	A→T	A→T					ns	ns	0/183	
1218	E201D	G→T			G→T			ns	ns	0/183	
1222	V203L	G→C			G→C			ns	ns	0/183	
1277	N221T	A→C				A→C				0/183	
1355/56	S247T	GT→C							GT→C		
1358	S248I	G→T							G→T	0/195	
1400	A262V	C→T							C→T	0/195	
1423	V270L	G→C							G→C	0/195	
1437	<i>silent</i>	A→T							A→T	0/195	
1444	<i>silent</i>	T→C	T→C								4/177
1450	T279A	A→G	A→G								
1959	C448W	C→G							C→G	0/145	
2266	G551R	G→A					G→A	ns	ns	0/459	
2275	F554L	T→C	T→C					ns	ns		11/561
2276	F554S	T→C		T→C	T→C	T→C	T→C	ns	ns		
2316	<i>silent</i>	G→C		G→C	G→C	G→C	G→C	ns	ns		3/664
2332	Y573H	T→C					T→C	ns	ns		1/474
2421	<i>silent</i>	G/A→T	G/A→T								2/513
2409	<i>silent</i>	T→G	T→G					ns	ns	0/422	
2598	<i>silent</i>	G→A	G→A					ns	ns		4/558

Tabela 4.15. Nukleotidne i aminokiselinske supstitucije u analiziranim izolatima iz Srbije u odnosu na referentnu sekvencu NC_000883, u poređenju sa dostupnim sekvencama izolata u *DataBase* - nastavak.

Nt pozicija 1)	AK zamena 2)	Nt zamena	RS-B1/M1	RS-4	RS-8	RS-9	RS-10A	RS-7	RS-M2	Unique RS/DB	Retka ³⁾ RS/DB
VP1u											
2711	V30L	G→C	G→C					ns	ns		
2877	G85E	G→A				G→A		ns	ns	0/717	
2916	S98N	G→A	G→A					ns	ns		
2942	D107N	G→A	G→A					ns	ns		
VP1/VP2											
3481	<i>silent</i>	C→G	C→G					ns	ns	0/269	
3517	<i>silent</i>	G→A	G→A					ns	ns	0/274	
3686	V355I	G→A	G→A					ns	ns	0/245	
3878	V419I	G→A	G→A					ns	ns	0/229	
4037/403	C472L	TG→C	ns		TG→C			ns	ns	0/226	
4038	C472F	G→T	ns			G→T		ns	ns	0/226	
4345	<i>silent</i>	A→T		A→T	A→T	A→T	A→T				5/199
4680	K686I	T→A	T→A							0/389	
4711	<i>silent</i>	T→A			T→A						4/363
4763	T714S	A→T			A→T					0/363	
4771	<i>silent</i>	C→G	C→G							0/363	
4891	<i>silent</i>	T→C	T→C								11/237

1) pozicije nukleotida su pobrojane u odnosu na referentnu sekvencu NC_000883;

2) broj aminokiseline u odnosu na NS1 odnosno VP1/VP2 protein;

3) kao redak polimorfizam označen je onaj koji se pojavljuje u bazi podataka u < 5% izolata;

4) *silent* nukleotidna zamena navedena je u tabeli samo ako je jedinstvena (*unique*) ili retka;

VP1 – sekvencu samo VP1 proteina; VP1/VP2 – preklapajuća sekvencu za oba proteina; ns – nije sekvencirano; RS/DB – broj izolata u bazi sa datom supstitucijom u odnosu na ukupan broj izolata iz baze podataka gde je dati nukleotid sekvenciran (DB-DataBase); Nukleotidne zamene koje se javljaju u svim RS izolatima izuzev RS-B1/M1 su navedene podebljanim fontom.

5. Diskusija

5.1. Identifikovanje uzoraka pozitivnih na B19 DNK

Najčešći put prenosa parvoB19 virusa je respiratorni, ali se infekcija može preneti i vertikalnim putem sa majke na fetus kao i putem krvi i preko zaraženih krvnih derivata (Heegaard i Brown 2002). Poznato je da se putem krvi i krvnih derivata mogu preneti različite infektivne bolesti, a kao najčešće i najozbiljnije navode se infekcije hepatitis B virusom (HBV), hepatitis C virusom (HCV) i humanim virusom imunodeficijencije (HIV) (Deuffic-Burban i sar., 2011). Savet Evrope je, preko Evropskog direktorata za kvalitet lekova (EDQM), u Evropskoj farmakopeji, u više monografija za različite varijante humane plazme naglasio važnost virusne bezbednosti plazme. Prema monografiji 0853 (Ph.Eur. 2013), pulirana humana plazma za frakcionisanje mora biti negativna na antitela na viruse, i to na anti-HIV-1, anti-HIV-2 i HBsAg, kao i na hepatitis C RNK. Međutim, pored ovih odavno poznatih transmisivnih agenasa, za humanu plazmu puliranu i tretiranu radi inaktivacije virusa (monografija 1646), kao i za plazmu namenjenu proizvodnji Humanog anti-D imunoglobulina (prema monografijama za humani anti-D imunoglobulin, 1527 i 0557) zahtev farmakopeje je i da ona mora sadržati manje od 10 IU/ μ L parvoB19 DNK (Baylis, 2008., Ph.Eur. 2013).

Razlozi za definisanje maksimalne dozvoljene količine B19 virusa u humanoj plazmi leže pre svega u činjenici da je B19 virus otporan na većinu uobičajenih postupaka za inaktivaciju virusa (Brown i Young, 1995, Schmidt i sar., 2001), pa veća bezbednost krvnih derivata može biti obezbeđena isključivo kontrolisanjem *pool*-ova plazme na prisustvo B19 virusa i ograničenjem količine virusne DNK u polaznom materijalu (Baylis, 2008.). Prema ustaljenoj proizvodnoj praksi tehnikama koje podrazumevaju amplifikaciju DAK se ne testira svaka jedinica plazme, već samo pulirana plazma (pri čemu veličina *pool*-a može biti i do 500 jedinica plazme). S obzirom na relativno visoke viremije i do 10^{14} IU/mL (Schmidt i sar., 2001, Baylis i sar., 2004, Koppelman i sar., 2004), samo jedna B19 pozitivna donacija može kontaminirati ceo plazma *pool*. U studiji Schmidt i sar., (2001) čak 60% testiranih plazma *pool*-ova bilo je pozitivno na B19 DNK, ali 65% pozitivnih *pool*-ova bilo je sa nižim vrednostima viremije. Odbacivanje svih *pool*-ova koji su B19 pozitivni u ovom slučaju značilo bi gubitak 60% sakupljene plazme, dok

odbacivanje samo visoko pozitivnih *pool*-ova (u ovoj studiji 35% od ukupno pozitivnih) znači gubitak samo 20 % sakupljene plazme.

Transfuzija plazme koja je sadržala manje od 10^4 IU/ml uglavnom nije dovela do serokonverzije (Blumel i sar., 2002), pa je ta granica od januara 2004. godine u Evropskoj farmakopeji definisana kao najveća dozvoljena količina B19 DNK u plazmi koja se koristi u proizvodnji anti-D imunoglobulina (monografija 1646, Ph.Eur.2013). B19 pozitivna plazma koja sadrži B19 ispod propisanog limita se ne odbacuje jer se smatra dovoljno bezbednom, a predstavlja dragocenu sirovinu u proizvodnji uglavnom deficitarnih derivata krvi. Sličnu preporuku proizvođačima krvnih derivata uputilo je i najviše regulatorno telo u Sjedinjenim Američkim Državama, FDA (*Food and Drug Administration*, 2009).

Na osnovu svega navedenog, sa aspekta bezbednosti krvnih derivata, cilj je plazmu testirati metodom koja može pouzdano detektovati sve varijante B19 virusa, i kvantifikovati ih u opsegu oko granične dozvoljene koncentracije (oko 10^4 IU/ml).

5.1.1. Metoda za detekciju i kvantifikaciju B19 DNK u uzorcima krvi i plazme

Do sada je razvijeno više različitih komercijalnih i internih (eng. *in-house*) PCR metoda za detekciju, kvantifikaciju i/ili genotipizaciju B19 virusa koji su prilagođeni za *in vitro* dijagnostiku i naučna istraživanja. Kvantitativne metode se baziraju na *nested* PCR-u uz razblaživanje uzoraka (Wu i sar., 2005, Geng i sar., 2007), kompetitivnom PCR-u (Gallinella i sar., 1997, Bonvicini i sar., 2004) ili najčešće na različitim *Real-Time* PCR sistemima kao što su SYBR Green (Corcioli i sar., 2008), LightCycler System (Schalasta i sar., 2004, Buller i Storch, 2004, Hokynar i sar., 2004,) i TaqMan (Aberham i sar., 2001, Liefeldt i sar., 2005, Kleinman i sar., 2007, Koppelman i sar., 2007, 2011). Varijabilnost virusnog genoma jedan je od ključnih problema za pouzdanu dijagnostiku virusnih infekcija. Naime, varijabilnost genoma B19 virusa iznosi u proseku 10-14% na nivou celog genoma (Servant i sar., 2002, Gallinella i sar., 2003), a pokazano je da pogrešno sparivanje ili nekomplementarnost (eng. *mismatch*) na nivou samo jednog nukleotida između sekvence prajmera i genoma virusa može dovesti do lažno

negativne reakcije ili pogrešne procene titra virusa (Baylis i sar., 2007, Koppelman i sar., 2011).

Za razvoj, standardizaciju i validaciju metoda za detekciju i kvantifikaciju od velikog značaja bila je i kolaborativna studija kojom je jedan izolat genotipa 1 (acc. no. NC-000883) proglašen za međunarodni referentni standard B19 DNK - *First WHO standard*, NIBSC code 99/800 (Saldanha i sar., 2002.). Većina prvo razvijenih metoda za detekciju B19 genoma ipak nije bila pogodna za detekciju virusa genotipa 2 i 3, što je otkriveno u međunarodnim studijama u kojima su upoređivani rezultati dobijeni različitim metodama za grupu pozitivnih uzoraka različitih genotipova (Baylis 2008). U cilju razvoja metoda koje bi mogle da detektuju i kvantifikuju i viruse genotipa 2 i 3 uspostavljen je i međunarodni panel genotipova - *Referent panel for B19 genotypes 1, 2 and 3*, NIBSC code 09/110 (Baylis i sar., 2009), i date su smernice za validaciju B19 NAT metoda (07/2010:20621, Ph.Eur. 2010).

End-point PCR metodom pomoću NS1 prajmera (Tabela 3.6), a prema metodi Servant i sar., (2002.), dobijeni su rezultati koji se prema smernicama Evropske farmakopeje (Ph.Eur.07/2010:20621) mogu smatrati validnim. Ipak, analiza baze podataka na osnovu dostupnih B19 genomskih sekvenci u regionu NS1 prajmera pokazala je da postoje izolati sa nekomplementarnom sekvencom u regiji prajmera.

Pozicije NS1-N i NS1-F prajmera (Servant i sar., 2002, a prema referentnoj sekvenci NC_000883), date su u tabeli 3.6.

Pregledom baze podataka (DB, zaključno sa 01.06.2013.) pronađeno je 282 izolata sa poznatom sekvencom u regionu NS1-F prajmera, i kod 3 izolata uočeno je po jedno nepoklapanje sa sekvencom prajmera:

NS1-F prajmer, 5'-->3'	TGCAGATGCCCTCCACCCA	
DQ225151C.....	genotip 1
Z70534A.....	nije definisan genotip
JN211128	.A.....	genotip 1

Pregledom baze podataka (DB, zaključno sa 01.06.2013) pronađeno je i 594 izolata sa poznatom sekvencom u regionu NS1n-R prajmera, i kod 11 izolata uočen je *mismatch* sa sekvencom prajmera. Takođe, *mismatch* je primećen i kod jednog izolata iz Srbije (RS-B1/M1):

NS1n-R prajmer , 3'-->5'	GAAGA ACTCAGTGAAAGCAGC	
(komplementarna sekvenca)		
DQ357065	...C.....	genotip 1, <i>outgroup</i>
DQ357064	...C.....	genotip 1, <i>outgroup</i>
AY582163G.....	genotip 1
FJ904105A.....	genotip 1
AY582146G.....	genotip 3
FJ904104G.....	genotip 3
AY064475G.....	genotip 2
Z70542A.....	nije definisan genotip
FN295611	...R.....	nije definisan genotip
AY083235A.....	genotip 1
EU144316T.....	genotip 1
RS-B1/M1G.....	genotip 1

Tri od navedenih 12 izolata imaju *mismatch* na četvrtoj poziciji na 3'-kraju NS1n-R prajmera, što bi moglo dovesti do inhibicije elongacije DNK lanca pomoću Taq polimeraze. Pokazano je da nepodudaranje sekvence prajmera i umnožavane sekvence može imati negativan uticaj na efikasnost PCR amplifikacije, ali da efekat *mismatch*-a zavisi pre svega od njegove pozicije. Najveći uticaj imaju terminalni nukleotidi, i to od prvog do četvrtog sa 3'-kraja prajmera (Kwok i sar., 1990, Huang i sar., 1992, Bru i sar., 2008), dok *mismatch* sa pozicijom bližoj sredini prajmera ima neznatan efekat na PCR amplifikaciju (Liefeldt i sar., 2005). Ipak, s obzirom na to da svaka sekvenca DNK ima svoje fiziko-hemijske specifičnosti, samo empirijski

se može utvrditi egzaktni uticaj tipa i pozicije *mismatch*-a na efikasnost sinteze rastućeg lanca DNK u toku PCR-a (Kwok i sar., 1990, Huang i sar., 1992).

Izolat RS-B1/M1, koji ima *mismatch* na šestoj poziciji u odnosu na 3'-kraj NS1n-R prajmera, uspešno je amplifikovan pomoću ovih prajmera.

Detaljna analiza bila bi neophodna da se sa sigurnošću utvrdi koji uticaj na kvantifikaciju B19 DNK ima svako od uočenih nepodudaranja sekvence prajmera sa sekvencom virusa, ali se može očekivati da dolazi umanjene sinteze pa tako i pogrešne procene viremije. Izbor prajmerskog para koji će ovakve probleme svesti na minimum je od velike važnosti, pogotovo za kvantitativne metode.

Interna metoda razvijena u toku ovog rada, a čiji je opis izostavljen pošto je metoda predmet patentne prijave, prevazilazi većinu navedenih problema i drastično smanjuje verovatnoću lažno negativnih rezultata, bez obzira na genotip i genomsku varijabilnost virusa, što je od velike važnosti za dijagnostiku B19 virusa (Baylis 2008). Preporuka Centra za transfer tehnologije Univerziteta u Beogradu (Prilog 5) je da navedena metoda bude predmet patentne prijave, a kao takva ne sme biti objavljena pre podnošenja patentne prijave prema Zakonu o patentima ("Sl. glasnik RS", br. 99/2011).

Interna metoda za detekciju i semikvantifikaciju virusne DNK u plazmi je validirana prema smernicama Evropske farmakopeje (Ph.Eur., 2010), što je ključno za procenu pogodnosti metode za primenu u datoj situaciji (Koppelman i sar., 2004, Daniel i sar., 2009, Hue i sar., 2011), i tek nakon sprovedene validacije korišćena za analizu uzoraka. Metoda je validirana u opsegu od 10^3 do 10^5 IU/mL, s obzirom na zahtev Ph.Eur da se za plazmu i derivate plazme/krvni obezbedi nivo virusne DNK ispod 10^4 IU/mL, što je za našu metodu u sredini opsega za koji je validirana. Ista metoda korišćena je i za analizu uzoraka plazme/krvni pacijenata.

Svi testirani uzorci, kako uzorci davalaca krvi tako i uzorci pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju, su testirani i internom metodom, čime su prvobitno dobijeni rezultati potvrđeni. Na osnovu limita kvantifikacije određenog u toku validacije metode možemo reći da su detektovani svi pozitivni uzorci kod kojih je viremija bila iznad 10^3 IU/mL.

5.1.2. Uzorci plazme dobrovoljnih davalaca krvi

Kao reprezentativan uzorak zdrave populacije korišćeni su uzorci plazme dobrovoljnih davalaca krvi. Svi testirani uzorci (527/527) bili su negativni, odnosno nisu detektovane DNK trake (amplikoni) koje bi amplifikacijom sa B19 matrice ukazivale na prisustvo virusnog genoma u uzorcima.

Negativan rezultat za svih 527 uzoraka plazme dobrovoljnih davalaca krvi je u skladu sa podacima iz literature. Naime, iako je asimptomatska infekcija moguća (Heegaard i Brown 2002, Servant-Delmas i sar., 2010) i teorijski je moguće da dobrovoljni davalac bez simptoma ima viremiju u krvi, učestalost viremije u populaciji je relativno niska (1: 17346, Koppelman i sar., 2004, 1:20000-1:50000, Brown i sar., 2001, 1:15000 Latinen i sar., 2002). Aubin i saradnici (2000) su za populaciju od oko 1 250 000 dobrovoljnih davalaca krvi u Francuskoj pokazali da je van sezone učestalost B19 pozitivnih donacija 1:5950, a da je u vreme epidemije učestalost viša i da iznosi 1:1420. Učestalost B19 pozitivnih donacija se prema dostupnim literaturnim podacima u vreme epidemije kreće u opsegu od 1:167 do 1:1420 (Schmidt i sar., 2001). Do epidemija dolazi jednom u svake 3-4 godine, najčešće u periodu kasne zime ili ranog proleća (Servant-Delmas i sar., 2010), a za sada ne postoje publikovani epidemiološki podaci za B19 u Srbiji. Kako je veći broj uzoraka uzet u periodu septembar-novembar 2011.godine (450 uzoraka), moglo bi se pretpostaviti da u tom vremenskom periodu nije bilo epidemije parvoB19 virusa u regionu Beograda u Srbiji.

5.1.3. Uzorci pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju

U toku rada analizirano je 13 uzoraka pacijenata koji su imali kliničku sliku koja se može dovesti u vezu sa B19 infekcijom.

Uzorci krvi ili plazme pacijenata sa sumnjom na B19 infekciju su testirani i 9 od 13 uzoraka je bilo pozitivno. Viremije su uglavnom bile preko 10^6 IU/ml, osim za uzorak RS-7 (viremija oko 10^3 do 10^4) i za uzorak RS-M2 koji je testiran radi praćenja toka B19 prethodno detektovane infekcije (viremija oko 10^3).

Prema dostupnim podacima viremija u B19 pozitivnim uzorcima varira od 10^3 (Kleinman i sar., 2007) do najčešće 10^6 - 10^{14} IU/ml, dok su niže vrednosti karakteristične za perzistentne infekcije (Schmidt i sar., 2001, Baylis i sar., 2004,

Koppelman i sar., 2004, Liefeldt i sar., 2005). Dobijene vrednosti za viremiju kod pozitivnih uzoraka (10^3 do više od 10^9 IU/ml) su u okviru B19 virmije kod akutnih i perzistentnih viremija. U odnosu na druge transmisivne infekcije B19 virus ima relativno visoke viremije – visokim viremijama se za HBV, HCV i HIV smatraju viremije reda veličine 10^6 kopija/mL (Berger i sar., 2001, Novitsky i Essex. 2012), dok su za B19 u akutnoj infekciji uobičajene vrednosti znatno više i to od 10^6 do 10^{14} IU/mL (Schmidt i sar., 2001, Baylis i sar., 2004, Koppelman i sar., 2004). Nakon uspostavljanja internacionalnog standarda količina B19 DNK se izražava u internacionalnim jedinicama (IU). Faktor konverzije broja kopija u IU je 3.34 odnosno 0.52 log (Koppelman i sar., 2004), pa su viremije izražene bilo u broju kopija bilo u IU u okviru istog reda veličine.

Visoka viremija za uzorak RS-B1/M1 (10^9 IU/mL) može se dovesti u vezu i sa činjenicom da je za razliku od ostalih uzoraka, RS-B1/M1 uzorak pune krvi. Naime, pokazano je da se, s obzirom na prirodu B19 virusa i njegov afinitet za ćelije eritroidne loze, oko trećina virusnih čestica nalazi u plazmi, a oko dve trećine vezano za eritrocite (Lee i sar., 2011). Reakcija je kontrolisana amplifikacijom interne kontrole i nedvosmisleno je uzorak RS-B1/M1 pozitivan sa viremijom iznad 10^9 IU/mL, ali bi za precizniju procenu viremije metoda ispitivanja prethodno morala biti validirana za uzorke iz pune krvi.

Viremija od oko 10^3 IU/ml za uzorak RS-M2, godinu dana nakon akutne infekcije je u skladu sa vrednostima za B19 perzistentne infekcije (Candotti i sar., 2004, Liefeldt i sar., 2005, Le Frere i sar., 2005, Kleinman i sar., 2007).

Od 6 IgM pozitivnih uzoraka 3 su bila negativna na B19 DNK, što se može objasniti činjenicom da prisustvo IgM antitela u krvi može biti prolongirano i nakon uklanjanja virusa iz cirkulacije (Heegaard i Brown 2002, Parsyan i sar., 2007).

Uzorak RS-5 bio je B19 DNK negativan, iako je rezultat određivanja B19 antitela pokazao prisustvo IgM a odsustvo IgG antitela, što ukazuje na ranu fazu virusne infekcije. Viremija najčešće pada nakon pojave IgM antitela, a kako se IgG antitela pojavljuju nešto kasnije (Heegaard i Brown 2002) moglo bi se pretpostaviti da je uzorak uzet u trenutku kada je viremija pala ispod nivoa detekcije primenjene metode a nivo IgG antitela još uvek nije bio na detektabilnom nivou (Slika 1.5).

5.2 Određivanje nukleotidne sekvence genoma B19 virusnih izolata

Izolati genomske B19 DNK su sekvencirani i dobijene su njihove cele ili delimične sekvence. Izolati su amplifikovani upotrebom različitih kombinacija prajmera i dobijeni su segmenti koji se na krajevima medjusobno preklapaju od 100 do 500 nt. Takođe, svaki segment je sekvenciran u oba smera. Na taj način, u ovom radu, dobijene nukleotidne genomske sekvence potvrđene su od 2 do 4 puta.

Od ukupno 9 uzoraka humane krvi/plazme/seruma, kod kojih je potvrđeno prisustvo B19 genoma iz 8 uzoraka je uspešno amplifikovan i sekvenciran deo genoma B19 virusa, dok je kod jednog uzorka amplifikovanje željenih segmenata bilo neuspešno a zbog ograničene količine uzorka veći broj ponavljanja nije bio moguć. Za 5 uzoraka dobijena je sekvenca dužine preko 4800 nt, što je 86.5 % celog genoma odnosno kompletna cDNK sa delovima netranslirajućih regiona na 5' i 3'-krajevima genoma.

5.3 Analiza genoma B19 pozitivnih izolata

5.3.1. Analiza potencijalne rekombinacije

U cilju postavljanja osnove za dalje filogenetske analize ispitivali smo potencijalne rekombinacione događaje za populaciju izolata genotipa 1.

Podaci o eventualnim rekombinacionim događajima za parvovirus B19 nisu brojni i pojavljuju se sporadično – kao rekombinanti označeni su izolat AN40 (acc. no. AB126266) iz Japana (Shackelton i Holmes, 2006), i izolat 07BRSP7612 iz Brazila (da Costa i sar., 2013), iako se mogućnost rekombinacije, pre svega kod ljudi sa perzistentnim infekcijama izloženim drugom tipu B19 virusa, pokazana i u znatno ranijim radovima (Johansen i sar., 1998). Schackelton i Holmes su kao potencijalnog rekombinanta identifikovali izolat iz Japana AN40 za koji je pretpostavljeno da je nastao rekombinacijom između druga dva izolata iz Japana, AN41 i AN66 sa tačkama prekida na nukleotidnim pozicijama 3805 i 3863. Da Costa i saradnici (2013) su identifikovali jedan potencijalni rekombinant između izolata genotipa 1a (u delu od 949 do 1879 nt) i genotipa 3b (u delu od 1886 do

2160 nt). Prema podacima iz literature do sada nisu uočene karakteristične tačke prekida koje bi bile zajedničke za više rekombinacionih događaja.

Da bi do rekombinacije došlo neophodno je da domaćin istovremeno bude inficiran sa dva različita virusna izolata, što je verovatnije u slučaju perzistentnih infekcija. Procene o broju perzistentnih infekcija nakon primarne B19 infekcije variraju od <1% do čak 8% (Lefrere i sar., 2005), i zasnovane su na ograničenom broju uzoraka. Na procenu utiče i mogućnost asimptomatske infekcije, ali se većina autora slaže da je perzistentna infekcija B19 virusom i kod imunokompetentnih osoba moguća, i da virus može perzistirati u organizmu domaćina i godinama (Servant-Delmas i sar., 2010). U našem radu, B19 DNK je perzistirala u krvi pacijenta (RS-M2) najmanje godinu dana nakon akutne infekcije (nakon toga infekcija više nije praćena), dok za ostale pacijente nismo imali mogućnost da pratimo eventualnu perzistenciju virusa u krvi. Ukoliko pacijent sa perzistentnom infekcijom ponovo dođe u kontakt sa B19 virusom rekombinacioni događaji su mogući, ali su na osnovu dostupnih podataka rekombinacije kod B19 redak događaj, pa bi se moglo reći da su manje važan mehanizam u evoluciji B19 virusa.

RDP4 kao i GARD analiza svih ispitivanih sekvenci genotipa 1 pokazale su da u okviru svih ispitivanih izolata genotipa 1 (Prilog 3) ne postoji statistička značajnost ($p > 0.05$) za pojavu rekombinacionog događaja.

Za RDP4 analizu korišćene su sekvence 161 izolata genotipa 1, 2 i 3: 146 izolata celih ili skoro celih sekvenci iz baza podataka (Tabela 3.3 i Tabela 3.4), 6 izolata iz Srbije sa delimičnim genomskim sekvencama (FN295732, FN295733, FN295734, FN295735, FN295736, FN295737, dužine 992 nukleotida, od 2118 do 3110 nt, Hubschen i sar., 2009) i 8 izolata koji su dobijeni u ovom radu (RS-B1/M1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-10B). Analiza je pokazala da u okviru svih izolata genotipa 1 samo izolat DQ225148 (Vijetnam) pokazuje moguću rekombinaciju između genotipa 1 i 2, i to u delu od 1832 do 2077 nt, pri čemu se pretpostavlja da su izvorne sekvence JN211140 (genotip 1, major parent, 99% sličnosti, Holandija) i AY064476 (genotip 2, minor parent, 98.8% sličnosti, Vijetnam). Verovatnoća za ovaj događaj označena je kao 1.834×10^{-19} (MC Uncorrected), odnosno 1.252×10^{-13} (MC Corrected). Ovaj izolat je korišćen u daljoj filogenetskoj analizi s obzirom na to da u okviru samog genotipa 1 nije pokazao statistički značajnu verovatnoću rekombinacije.

5.3.2. Analiza odnosa stepena nesinonimnih i sinonimnih zamena (dN/dS)

Za određivanje selektivnog pritiska formirane su grupe izolata genotipa 1 i izdvojeni su izolati sa kompletnim sekvencama u delovima genoma za koje je poznato da kodiraju sekvence za strukturne i nestrukturne B19 virusne proteine. Kodirajuća sekvenca za VP1 protein (2624-4969 nt) analizirana je kroz dva segmenta - VP1u region i VP2 region, od kojih se sastoji.

Sve analizirane sekvence pokazuju genetičku varijabilnost, pri čemu je procenat varijabilnih kodona najveći kod strukturnih proteina – 42.3% za VP2, 40.1% za VP1u, a najmanji procenat varijabilnih kodona primećen je kod 11 kDa proteina – 11.7%. Veliki broj primećenih zamena ne dovodi do zamene aminokiselina, pa je dN/dS odnos verodostojniji pokazatelj varijabilnosti na aminokiselinskom nivou. U svim analiziranim proteinima odnos dN/dS bio je ispod 1 (za $p=0,1$), što ukazuje na negativnu selekciju i u skladu je sa podacima za druge analizirane populacije izolata (Servant i sar., 2002, Molenaar de-Backer 2012). Neki autori, ipak, smatraju da je analiza dN/dS odnosa za filogenetski bliske organizme kompleksna i da ne može jednoznačno ukazati na evolutivne pritiske u okviru ispitivanih populacija (Kryazhimskiy i Plotkin, 2008). Naime, u ovom radu je pokazano da vrednosti $dN/dS < 1$ u slučaju analize blisko srodnih organizama, pogotovo mikroorganizama, mogu biti u vezi kako sa negativnom tako i sa pozitivnom selekcijom. Pored analize dN/dS odnosa praćeni su i drugi parametri (procenat varijabilnih kodona, broj mesta sa pozitivnom i negativnom selekcijom) kako bi se dobila kompletna slika o značaju varijabilnosti za pojedine regone genoma B19 virusa.

5.3.2.1. Strukturni proteini

U poređenju sa ostalim proteinima za VP2 protein, strukturni protein virusa koji gradi 96% kapsida, primećen je najveći procenat varijabilnih kodona, dok odnos dN/dS ima najnižu vrednost (0.091, $p=0.1$). Prema ovim podacima može se zaključiti da je većina primećenih zamena sinonimna, odnosno da ne dovodi do promene na aminokiselinskom nivou. Servant i saradnici (2002) takođe navode

niže vrednosti dN/dS za VP2 gen (0.021-0.028) u odnosu na npr. NS1 gen (0.038-0.071). Sličan odnos dN/dS vrednosti navode i Molenaar de-Backer i saradnici (2012) – od 0.029 do 0.065 za strukturne proteine u odnosu na 0.065 do 0.136 za NS1 protein. Pored navedenog, za VP2 region uočen je najveći broj mesta sa negativnom selekcijom (8.5% mesta po kodonu za $p=0.1$, 5.6% za $p=0.05$).

Kod VP1u regiona procenat varijabilnih kodona je sličan sa VP2 regionom ali je odnos dN/dS tri puta veći (0.292). Broj mesta sa negativnom selekcijom je manji (5.3% mesta po kodonu za $p=0.1$, 2.6% za $p=0.05$). Prema navedenom zamene koje dovode do promene aminokiselinske sekvence se za VP1u region lakše „tolerišu“ nego za VP2 region. Servant i saradnici (2002) navode da je u okviru VP1u regiona divergenca na aminokiselinskom nivou veća od divergencije na nukleotidnom nivou. Hokynar i saradnici (2002) takođe navode da je na aminokiselinskom nivou divergenca između izolata M13178 i AY044266 za VP1u region veća nego za VP2 region (4.4% u odnosu na 1.1%), dok je na nukleotidnom nivou situacija obrnuta (4.6% za VP1u u odnosu na 11.9% za VP2). Većina zamena u VP2 proteinu je sinonimna, što potvrđuje i niska vrednost za odnos dN/dS dobijena u našoj analizi.

Oba strukturna proteina grade epitope za koje se vezuju neutrališuća antitela (Kajigaya i sar., 1991; Sato i sar., 1991). Imunski odgovor uglavnom izaziva VP1u region (Kaufmann i sar., 2004), pa izmene u aminokiselinskoj sekvenci ovog regiona mogu omogućiti virusu izbegavanje imunskog odgovora domaćina. Ipak, smatra se da VP1u region sadrži i motiv sličan fosfolipazi A2 (eng. *secreted phospholipase A2* - sPLA2,) koji omogućava oslobađanje virusa iz endozoma nakon ulaska virusa u ćeliju (Suikkanen i sar., 2003; Zadori i sar., 2001). Za kodone koji su ključni za fosfolipaznu aktivnost (ak 130 do 195) pokazano je da su visoko konzervativni, dok je N-terminalni deo, aminokiseline od 1 do 123, označen kao varijabilan (Servant i sar., 2002).

Iako postoji značajna varijabilnost B19 virusa na nivou nukleotidne sekvence, aminokiselinska sekvenca različitih B19 izolata pokazuje 96-97% homologije, pa je serološka ukrštena reaktivnost skoro potpuna (Heegaard i Brown, 2002).

5.3.2.2. Nestrukturni protein NS1

Kod NS1 kodirajućeg regiona utvrđen je visok procenat varijabilnih kodona (38%), i niži odnos dN/dS (0.164, iznad vrednosti dobijene za VP2 ali ispod vrednosti

dobijene za VP1u). Slične podatke navode i Servant i saradnici (2002), prema kojima je odnos dN/dS za NS1 protein (0.038-0.071) nešto viši od vrednosti dobijenih za VP2 protein (0.021-0.028). U odnosu na strukturne proteine B19 virusa, primećen je nešto niži broj mesta sa negativnom selekcijom (3.9% mesta po kodonu za p=0.1, 2.2% za p=0.05).

NS1 protein ima ulogu u vezivanju za DNK, deluje kao ATP-aza, helikaza i ima ulogu transaktivatora transkripcije, i to direktnim vezivanjem za P6 promotor, ali i posredno preko ćelijskih transkripcionih faktora (Heegaard i Brown, 2002; Raab i sar., 2002). U strukturi NS1 proteina uočeni su domeni koji su konzervirani kod svih parvovirusa i to motivi u vezi sa smicanjem jednolančane DNK. Distribucija varijabilnosti duž sekvence NS1 proteina nije ujednačena, pa je pokazano da se na N-terminalnom delu nalazi hipervarijabilni region između aminokiselina 180 i 210, ali i konzervativni motivi u vezi sa smicanjem jednolančane DNK, a da se u središnjem delu sekvence NS1 proteina nalaze konzervativni motivi koji mogu imati ATP-aznu i helikaznu aktivnost kao i NTP-vezujući domeni (Momoeda i sar., 1994; Moffatt i sar., 1998; Heegaard i Brown 2002; Ekman i sar., 2007).

Na osnovu navedenog, jasno je da je NS1 protein od velikog značaja za replikaciju B19 virusa i da su ključni domeni ovog proteina konzervisani, odnosno da na njihove eventualne zamene deluje negativna selekcija koja je utvrđena u ovom radu, manje izražena u odnosu na strukturne proteine VP1 i VP2. U poređenjima izolata sva tri genotipa pokazano je da je divergencija na aminokiselinskom nivou veća za NS1 protein u odnosu na VP1 i VP2 (Hokynar i sar., 2002, Ekman i sar., 2007).

5.3.2.3. Mali virusni proteini – 11 kDa, 7.5 kDa i protein X

Kod malih virusnih proteina primećen je viši odnos dN/dS nego za glavne proteine virusa (0.60 za 11 kDa, 0.39 za 7.5 kDa i 0.68 za protein X). Procenat varijabilnih kodona je bio nešto niži u odnosu na strukturne proteine, ali su zamene češće dovodile do promene aminokiselinske strukture nego kod glavnih virusnih proteina. I drugi autori navode da su razlike na nivou aminokiselina veće kod malih nego kod glavnih virusnih proteina. Servant i saradnici (2002), čak navode da su zamene u delovima koji su zajednički za male i velike proteine (na mestima gde su ORF preklapljeni, 7.5 kDa sa NS1, 11 kDa sa VP2 i protein X sa VP1u) češće

dovodile do aminokiselinske zamene u malom nego u glavnom virusnom proteinu – nukleotidna zamena je bila sinonimna za glavni ORF, a nesinonimna za mali ORF. Međutim, rezultati analize Norje i saradnika (2008) pokazuju da je varijabilnost kodirajuće sekvence za protein X veća u odnosu na preklopljeni segment VP1 gena. Naši podaci pokazuju da je odnos dN/dS više puta veći za male virusne proteine, iako je procenat varijabilnih kodona manji. Pored toga, analiza je pokazala da za male virusne proteine nije uočeno ni jedno mesto sa negativnom selekcijom ($p=0.1$). Na osnovu navedenog, za male virusne proteine se može zaključiti da se sa evolutivne tačke gledišta izmene u aminokiselinskoj sekvenci lakše tolerišu. Ipak, u prilog činjenici da su mali virusni proteini, čije funkcije još uvek nisu do kraja razjašnjene, važni za preživljavanje i infektivnost virusa govori i podatak da su otvoreni okviri čitanja za ove proteine očuvani kod svih B19 virusa, bez obzira na genotip i evolutivnu udaljenost (Servant i sar., 2002).

Na osnovu navedenog može se smatrati da na genom parvoB19 virusa evolutivni pritisak deluje u smeru eliminacije polimorfizama sa detektovanom negativnom selekcijom, kao i da je taj smer evolutivnog pritiska bio izraženiji kod glavnih virusnih proteina u odnosu na male virusne proteine. Dejstvo pozitivne selekcije na analiziranim sekvencama nije utvrđeno, ali se s obzirom na to da su ove sekvence vrlo slične, srodne i predstavljaju viruse koji su, sa evolutivne tačke gledišta, savremenici, pozitivna selekcija ne može isključiti kao mehanizam koji dovodi i održava utvrđenu varijabilnost B19 gena. Parvo B19 virus je u ovom trenutku, po svemu sudeći, u svom kompaktnom genomu ostvario osnovne preduslove za efikasno razmnožavanje odnosno visok stepen prilagođenosti domaćinu.

5.4 Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma

5.4.1. Izbor segmenata za analizu

Za filogenetsku analizu pripremljeni su setovi sekvenci koje su kompletne u određenim izabranim delovima. Kao prvi segment izabran je region od 1234 do 2104 nt, pošto je u tom regionu kompletna sekvencija za svih 8 izolata dobijenih u ovom radu odnosno izolata iz Srbije: RS-B1/M1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-

10A i RS-10B. Drugi segment (2118 do 3110 nt) je izabran kao region za koji su bile dostupne sekvence izolata iz Srbije iz 2007. godine (u bazi podataka - FN295732, FN295733, FN295734, FN295735, FN295736, FN295737, Hubschen i sar., 2009), kao i većine izolata dobijenih u ovom radu (RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9 i RS-10A).

Segment od 665 do 4851 nt je označen kao skoro cela cDNK, i izabran je sa ciljem da se analizira što je moguće veći broj izolata sa poznatom sekvencom u što dužem regionu genoma. U ovom opsegu analizirano je 122 sekvence, među kojima i 5 izolata koji su dobijeni u ovom radu (RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9 i RS-10A).

5.4.2. Određivanje nukleotidnih distanci

5.4.2.1. Određivanje nukleotidne distance (*pairwise distance*) svih uzoraka

Uvidom u literaturu utvrđeno je da je analiza nukleotidnih distanci u okviru genotipa 1 na nivou skoro cele cDNK u početku razmatrana na relativno malom broju uzoraka (12 izolata sa sekvencom poznatom u dužini od 4339 nt, Servant i sar., 2002); Sekvenciranjem većeg broja izolata u dužini od 4280 nt Molenaar de Backer i saradnici (2012) su značajno dopunili bazu podataka i omogućili kompletniju analizu na većem broju skoro cele cDNK. Trenutna situacija je da je u DB dostupno više od 100 izolata sa sekvenciranom skoro celom cDNK pa je jedan od ciljeva bio da se filogenetska analiza uradi na statistički značajnijem uzorku.

Genetička distanca određivana je na osnovu nukleotidne sekvence u programu MEGA5, opcijom „*Compute pairwise distances*“. Analizirani su parovi sekvenci (procenjavana je genetička udajenost za svaki par ponaosob) i dobijeni rezultati tabelarno su prikazani u delu 4.4.3.1 (Tabela 4.11).

Na osnovu prvog segmenta prosečna distanca iznosila je 1.4%, a maksimalna distanca primećena je između izolata RS-M2 i DQ357064 (*outgroup*) – 11.5%, što pokazuje da je i u okviru genotipa 1 varijabilnost visoka. Na osnovu drugog segmenta prosečna distanca bila je 1.0%, a na osnovu skoro cele cDNK 1.3%. Najveće genetičke distance bile su između *outgroup* izolata DQ357065 i izolata

DQ293995 (6.3% na osnovu drugog segmenta) i između istog *outgroup* izolata DQ357065 i izolata JN211138 (6.8% na osnovu skoro cele cDNK).

Dobijene prosečne distance su u okviru očekivanih vrednosti za genotip 1. Servant i saradnici (2002) navode da je genetička distanca u okviru genotipa 1, na osnovu segmenta dužine 4338 nt, 0.2%, ali na osnovu malog broja analiziranih izolata (12 izolata genotipa 1). Hubschen i saradnici (2009) navode da je prosečna genetička distanca na osnovu regiona dužine 994 nt, upotrebom Kimura 2-parametarskog modela, 0.91%, a maksimalna distanca 4.70% (između *outgroup* izolata DQ357065 i izolata DQ293995).

Razlike u dobijenim genetičkim distancama na osnovu prvog, drugog segmenta i skoro cele cDNK (1.4%, 1.0% i 1.3%) su očekivane s obzirom na postojanje i varijabilnih i visoko konzervativnih regiona u okviru genoma, odnosno na to da distribucija varijabilnosti duž genoma nije ujednačena.

5.4.2.2. Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka

Grupe uzoraka određene su prema geografskom poreklu (Srbija, Japan, Finska, Nemačka, Švedska, SAD, Belgija, Engleska, Francuska, Vijetnam i Holandija). Dva *outgroup* izolata (inače poreklom iz Vijetnama) izdvojena su u posebnu grupu.

Genetičke distance u okviru geografskih populacija na osnovu skoro cele cDNK bile su u opsegu od 0.80% (Engleska, 3 izolata) do 1.45 (Vijetnam, 4 izolata), dok je za najbrojniju grupu izolata genetička distanca u okviru grupe iznosila 1.17% (Holandija, 65 izolata). Genetička distanca za izolate iz Srbije je bila u okviru navedenog opsega i iznosila je 0.93% (za 5 izolata sa poznatom sekvecnom skoro cele cDNK). Kako bi se procenila genetička distanca za sve dostupne izolate iz Srbije analizirane su genetičke distance i na osnovu drugog segmenta (za 11 izolata iz Srbije) i dobijena genetička distanca na osnovu drugog segmenta iznosila je 0.73%. Dobijena vrednost je takođe u okviru vrednosti dobijenih i za druge populacije, na osnovu drugog segmenta (od 0.68% za SAD do 1.09% za Belgiju).

Genetička distanca izolata iz Srbije u odnosu na ostale grupe, na osnovu skoro cele cDNK, kretala se u opsegu od 1.0% (Francuska) do 1.9% (Vijetnam), a najveća distanca primećena je u odnosu na *outgroup* izolate (6.3%). Podaci na osnovu prvog i drugog segmenta su takođe u skladu sa navedenim. Hubschen i saradnici

(2009) izolate genotipa 1 u okviru geografski definisanih populacija navode prosečne genetičke distance od 0.27% (Gruzija) do 1.07% (Kirgistan). Za populaciju iz Holandije Molenaar-de Backer i saradnici (2012) navode prosečnu genetičku distancu od 1.17%.

Prema navedenim podacima genetičke distance između izolata iz Srbije, kao i u odnosu na druge geografske B19 populacije su u granicama prosečnih genetičkih distanci koje su utvđene za genotip 1 (0.91%, Hubschen i sar., 2009; 0.8%-1.6%, Molenaar-de Backer i sar., 2012).

5.4.2.3. Određivanje nukleotidne distance u okviru i između grupa uzoraka iz Srbije

Definisane su dve grupe uzoraka, jedna grupa od 5 uzoraka sakupljenih u okviru našeg rada (RS-B1/M1, RS-4, RS-8, RS-9, RS-10A u periodu od 2009. do 2012. godine i grupa od 6 izolata iz Srbije preuzetih iz literature (delimične sekvence, uzorci sakupljeni 2007 godine, Hubschen i sar., 2009). Navedeni uzorci bili su kompletni u delu genoma od 2118 do 3110 nt (drugi segment).

Genetičke distance u okviru grupe su bile 0.36% za uzorke sakupljene 2007. godine i 0.75% za uzorke sakupljene u periodu od 2009. do 2012. godine. Viša vrednost genetičke distance za uzorke sakupljene od 2009. do 2012. godine može se objasniti dužim vremenskim periodom u okviru koga su uzorci sakupljeni. Genetička distanca između ove dve grupe uzoraka određena na osnovu sekvenci drugog segmenta je 0.90%, što je u skladu sa vrednostima dobijenim za genetičku distancu u okviru genotipa 1 (Hubschen i sar., 2009, Molenaar-de Backer i sar., 2012).

Vrednosti genetičke distance između grupa su više u odnosu na vrednosti genetičke distance u okviru grupa, ali se mora uzeti u obzir vrlo različit broj izolata u svakoj grupi (od 1 do 65). Moguće je da su niže vrednosti genetičke distance u okviru grupa prouzrokovane malim brojem dostupnih izolata, i da bi analiza većeg broja izolata sa jednog geografskog regiona dala drugačiju sliku – vrednosti za genetičku distancu u okviru najveće grupe izolata iz Holandije (1.17% na 65 izolata, Molenaar-de Backer i sar., 2012) su bliske rezultatima za genetičku distancu između izolata iz Srbije i izolata iz Francuske, Engleske i Holandije (1.0%, 1.2% i 1.2%).

5.4.3. Filogenetski odnosi B19 genomskih nukleotidnih sekvenci

Filogenetska analiza genoma B19 rađena je sa ciljem da se potvrdi genotipizacija B19 izolata dobijenih u ovom radu (Slika 4.9) i da se odrede filogenetski odnosi genoma RS izolata sa genomima izolata koji su dobijeni u različitim regijama Evrope i sveta.

5.4.3.1. Filogenetski odnosi reprezentativnih izolata sva tri genotipa

Potvrda da svi izolati iz Srbije pripadaju genotipu 1 dobijena je konstruisanjem filogenetskog stabla na osnovu izolata reprezentativnih za neke od klastera primećenih u okviru genotipova 1, 2 i 3 (Slika 4.8).

Na stablu se u jasno definisanim klasterima izdvajaju genomi genotipa 2 i 3 (3a i 3b), koji su međusobno evolutivno bliži, i genomi genotipa 1 u okviru koga se grupišu i svi RS izolati (RS-B1/M1, na stablu označen kao B1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-10B). Svi RS izolati grupišu se u jedinstvenom klasteru u okviru genotipa 1, osim izolata RS-B1/M1 koji se grupiše zajedno sa izolatom AJ781031 iz Nemačke, takođe u okviru genotipa 1.

5.4.3.2. Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma na osnovu cDNK 665 do 4851 nt (skoro cele sekvence, 4186 nukleotida)

Prvo filogenetsko stablo za analizu u okviru genotipa 1 konstruisano je na osnovu skoro celih cDNK i to 122 izolata kompletnih sekvenci (117 izolata iz baza podataka (Tabela 3.3) i 5 RS izolata koji su kompletni u tom segmentu (RS-4, RS-8, RS-9, RS-10A i RS-B1/M1, na stablu označen kao RS-B1).

Korišćenjem navedenih genomskih sekvenci B19 izolata za filogenetsku analizu dobijeno je da većina izolata (109 od 122) ima monofiletsko poreklo, dok se ostali grupišu ili u manje klastere ili su na stablu izdvojeni pojedinačno. U okviru izolata sa monofiletskim poreklom dalje se izdvajaju dva glavna klastera u kojima se grupišu i izolati iz Srbije (RS izolati). Većina izolata iz Srbije grupiše se u okviru

prvog klastera, dok se izolat RS-B1/M1 (označen na stablu kao B1) nalazi u okviru drugog klastera, najbliže izolatima iz Holandije (JN211122, JN211124, JN211141, JN211152, JN211181, JN211184).

Izolati iz drugih geografskih regija (Holandije, Japana, Nemačke, Finske) zastupljeni su kako u dva najveća klastera, tako i van njih, pa se može zaključiti da u okviru genotipa 1 klasterizacija B19 virusa nije geografski specifična.

Izraženija klasterizacija u odnosu na geografsko poreklo izolata može se uočiti kod drugih DNK virusa koji su potencijalno prisutni u krvi i krvnim derivatima. Hepatitis B (HBV) je klasifikovan u 8 genotipova koji imaju jasniju geografsku distribuciju. U okviru genotipa D izdvaja se 7 podgenotipova, pri čemu su podgenotipovi D1, D2 i D3 prisutni globalno, a D4 do D7 u pojedinim regionima sveta. U regionu Mediterana najzastupljeniji je genotip D i podgenotip D3 (Stanojević i sar., 2011). U okviru ove studije Stanojević i saradnici su analizirali filogenetske odnose HBV/D3 izolata iz Srbije i 66 izolata istog podgenotipa iz celog sveta prisutnih u bazama podataka (GenBank, DDBJ) i pokazali da navedeni izolati formiraju klaster koji su uglavnom u vezi sa geografskim poreklom izolata, dok se izuzeci objašnjavaju migracijama. Na filogenetskom stablu u okviru izdvojenih klastera grupišu izolati iz Južne Afrike, SAD, Italije, Kanade, Indije i Srbije. U okviru iste tačke grananja nalaze se klasteri izolata iz geografski bliskih regija (Srbije i Italije), ali i iz geografski udaljene regije – Kanada, što autori objašnjavaju nezavisnom evolucijom u geografski udaljenim regijama. Geografska klasterizacija, uočena kod HBV, nije pokazana i za B19 virus, što se može dovesti u vezu i sa različitim putem prenosa ova dva virusa. HBV se prenosi putem krvi i telesnih tečnosti, dok respiratorni način prenosa B19 virusa omogućava lakši prenos i širenje virusa. Za respiratorni virus influence tipa A (H3N2) pokazano je da iako ima relativno visoku stopu mutacija (oko 5×10^{-3} supstitucija po mestu godišnje) i pokazuje geografsku klasterizaciju u toku epidemije, veliku ulogu u geografskoj lokalizaciji različitih tipova virusa imaju migracije, koje dovode do širenja svih tipova virusa influence na globalnom nivou (Bedford i sar., 2010).

5.4.3.3. Filogenetski odnosi analiziranih B19 genoma na osnovu dela sekvence od 2118 do 3110 nt (drugi segment)

Drugo filogenetsko stablo konstruisano je na osnovu segmenta od 2118 do 3110 nt kako bi se u analizu uključilo i 6 sekvenci iz Srbije iz 2007. godine (Hubschen i sar.,

2009), odnosno analizirali uzorci sa iste teritorije sa većom vremenskom distancom. Izgled filogenetskog stabla je u glavnim klasterima sličan stablu konstruisanom na osnovu skoro celih cDNK, a pozicije RS izolata su napromenjene, što bi moglo da se tumači sličnim filogenetskim karakteristikama skoro celih cDNK sa izabranim segmentom B19 genoma.

RS izolati RS-4, RS-8, RS-9 i RS-10A, odnosno svi analizirani osim RS-B1/M1 (označen na stablu kao RSB1) grupišu se zajedno u okviru jednog većeg klastera, a u okviru istog klastera, relativno blisko, grupiše se i pet od šest izolata iz Srbije iz 2007. godine- FN295733, FN295734, FN295735, FN295736 i FN295737. Većina uzoraka iz Srbije iz 2007 godine se grupiše zajedno (FN295733, FN295734, FN295735, FN295736, FN295737), a odvojeno od većine uzoraka sakupljenih na teritoriji Srbije nekoliko godina kasnije (RS-4, RS-8, RS-9, RS-10A), koji takođe međusobno pokazuju monofiletsko poreklo. U okviru drugog većeg klastera nalaze se izolati RS-B1/M1 koji je prema ovom stablu grupisan najbliže izolatu iz Holandije (JN211126), i šesti izolat iz Srbije iz 2007. godine, FN295732 (Slika 4.11).

Pozicioniranje izolata RS-B1/M1 van klastera ostalih RS izolata, na osnovu svih konstruisanih filogenetskih stabala, je u skladu sa visokom genetičkom distancom ovog izolata u odnosu na ostale RS izolate. Naime, na osnovu prvog segmenta genetičke distance između ostalih izolata su u opsegu od 0.0 % do 1.3%, a između RS-B1/M1 i ostalih RS izolata u opsegu od 1.5% do 3.0%. Najveća genetička distanca, 3.0%, dobijena je između izolata RS-B1/M1 i izolata RS-M2. Uzorak RS-M2 uzet je od pacijentkinje godinu dana nakon primarne infekcije koju je imala u trudnoći, kada je uzet uzorak RS-B1/M1. Kod bebe (uzorak RS-B2) godinu dana nakon akutne infekcije B19 DNK nije detektovana.

Iako je kod navedne pacijentkinje pokazana perzistentna infekcija, a poznato je da izolati dobijeni iz perzistentnih infekcija pokazuju veću varijabilnost u odnosu na izolate iz akutnih infekcija (Galinella i sar., 2003), ovako visoka vrednost za genetičku distancu ne može se objasniti pokazanom stopom mutacija za parvoB19 virus (reda veličine 10^{-4} nukleotidnih zamena po mestu godišnje, Parsyan i sar., 2007, Norja i sar., 2008). Međutim, moglo bi se pretpostaviti da je došlo do kombinovane infekcije sa dva različita tipa (kvazivrste) B19 virusa.

Dobijena nukleotidna distanca dva izolata u istom organizmu u razmaku od godinu dana mogla bi nastati usled ugradnje nukleotidnih zamena tokom virusnih replikacija ili selekcijom odnosno favorizovanjem B19 kvazivrste koja je u nultom vremenu bila zastupljena sa < 10%. Naime, vizuelnim pregledom dobijenih elektroforegrama identifikovali samo jasne jednostruke pikove koji odgovaraju prisustvu samo jedne kvazivrste sa učestalošću > 10%.

Infekcije sa više genotipova B19 virusa, ili sa više varijanti istog genotipa-kvazivrste, su dokazane (Schneider i sar., 2008, Dina i sar., 2011), iako su mehanizmi njihovog nastanka još nedovoljno razjašnjeni.

Moguće je da su u uzorku RS-B1/M1 bila prisutne najmanje dve kvazivrste B19 virusa, od kojih je jedan bio dominantan u toku akutne infekcije, a s obzirom na visoku viremiju (10^9 IU/mL) i jedini identifikovan u uzorku (izolat RS-B1/M1), dok je druga kvazivrsta detektovana tek u toku perzistentne infekcije (izolat RS-M2). Uzorak krvi majke pre akutne infekcije nažalost u ovom radu nije bio dostupan, pa se prisustvo kvazivrsta u organizmu može objasniti bilo istovremenom, bilo superinfekcijom. Iako je pokazano da imunski odgovor izazvan jednim genotipom B19 virusa uglavnom pruža zaštitu i od drugih genotipova (Blumel i sar., 2005), i manja aktivnost neutrališućih antitela na virus drugog genotipa (ili tipa) je utvrđena (Schneider i sar., 2008) pa je superinfekcija moguća.

5.4.4. Retke i jedinstvene nukleotidne supstitucije u genomima B19 RS izolata

Sekvence RS izolata su nakon poravnanja upoređene sa sekvencom referentnog izolata NC_000883. Potvrđeno je 27 zamena koje su dovele do izmene aminokiselinske sekvence, i 4 zamene u regionu promotora. Od 27 nesinonimnih zamena 16 je bilo jedinstvenih, 3 retke, dok su 8 identifikovane u bazi podataka sa frekvencom većom od 5%. Od 4 zamene u regionu promotora 3 su jedinstvene, a jedna retka. Uočeno je 6 jedinstvenih i 11 retkih sinonimnih mutacija.

Najviše zamena uočeno je u NS1 regionu (28, od toga 17 nesinonimnih i 11 sinonimnih), u VP1u regionu sve 4 uočene zamene bile su nesinonimne, a u VP1/VP2 regionu uočeno je ukupno 12 zamena (po 6 sinonimnih i nesinonimnih).

U regionima zajedničkim za NS1 i 7.5 kDa protein, odnosno za protein X i VP1 uočene su po 3 nesinonimne zamene za glavne virusne proteine (od toga po jedna jedinstvena), a u regionu zajedničkom za VP1/VP2 i 11 kDa protein jedna sinonimna retka zamena.

Uočeno je 7 nukleotidnih zamena koje su zajedničke za sve RS izolate osim za RS-B1/M1, koji se i na osnovu ovakvog pregleda izdvaja od ostalih RS izolata, i to na pozicijama 569, 771, 1020, 1176, 2276, 2316, 4345. Sve navedene zamene su sinonimne, izuzev zamene na poziciji 2276, koja dovodi do aminokiselinske zamene fenilalanina leucinom u NS1 proteinu (F554L). Ista zamena primećena je i kod svih izolata iz Srbije iz 2007. godine (Hubschen i sar., 2009). U okviru istog kodona, na poziciji 2275, kod izolata RS-B1/M1 takođe je uočena nesinonimna zamena koja dovodi do zamene fenilalanina serinom u aminokiselinskoj sekvenci (F554S) a prema podacima iz DataBase spada u retke, odnosno javlja se sa učestalošću manjom od 5%. Sudeći na osnovu 15 analiziranih RS izolata u vremenskom razmaku od 2007. do 2012. godine, može se zaključiti da je zamena aminokiseline fenilalanin na poziciji 554 u sekvenci NS1 proteina fiksirana u populaciji B19 izolata iz Srbije. Na osnovu SLAC analize 428 izolata iz DB koji imaju sekvenciran region od 402 nt u okolini kodona 554 za ovaj kodon potvrđena je pozitivna selekcija ($p=0.0950263$).

Za izolat RS-7 (sekvenciran samo u regionu 1224 do 2106 nt) nisu uočene nukleotidne zamene, a za izolat RS-4 jedina nesinonimna zamena bila je pomenuta zamena na poziciji 2275. Za izolat RS-10A primećene su 3, a za izolate RS-8 i RS-9 po 4 nesinonimne zamene.

Veći broj nesinonimnih zamena primećen je kod izolata RS-M2 i RS-B1/M1. Kod izolata RS-M2 (sekvenciran samo u regionu od 1234 do 2109 nt) uočeno je 5 nesinonimnih zamena, od kojih su 4 jedinstvene. Za RS-B1/M1 utvrđeno je ukupno 12 nesinonimnih zamena, (od toga 2 retke i 4 jedinstvene). Nesinonimne zamene kod izolata RS-M2 i RS-B1/M1 nalaze se na različitim pozicijama. Ni jedna od uočenih zamena, ni sinonimnih ni nesinonimnih, nije zajednička za izolate RS-M1/B1 i RS-M2, što takođe govori u prilog pretpostavci da se radi o dve različite kvazivrste.

6 Zaključci

Na osnovu rezultata izloženih u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Razvijena interna metoda omogućila je detekciju B19 virusa u analiziranim uzorcima zdrave populacije i populacije sa sumnjom na B19 infekciju, u opsegu od 10^3 do 10^5 IU/mL, za koji je pokazana linearnost ($R^2=0.9758$), preciznost, tačnost kao i specifičnost na osnovu kompletne baze podataka za sve genotipove B19.
2. Na osnovu rezultata analize uzoraka dobrovoljnih davalaca krvi utvrđeno je da je učestalost parvovirus B19 infekcije u Srbiji u opsegu učestalosti koja je opisana za druge populacije u svetu.
3. Na osnovu detekcije B19 DNK kod osoba sa sumnjom na B19 infekciju, pokazano je prisustvo B19 virusa na prostorima naše zemlje, uz nivo viremije od 10^3 do preko 10^9 IU/mL.
4. Za 5 izolata dobijena je sekvenca dužine preko 4800 nt, što je 86.5 % celog genoma odnosno kompletna cDNK.
5. Na osnovu dostupnih podataka rekombinacije kod B19 virusa su redak događaj, što ukazuje da su manje važan mehanizam u evoluciji B19 virusa.
6. Na varijabilnost kodirajućih regiona za strukturne proteine VP1 i VP2 kao i za nestrukturni protein NS1 deluje negativna selekcija ($p=0.1$, $p=0.05$), dok je verovatnoća delovanja pozitivne selekcije znatno niža.
7. Na manje virusne proteine uticaj negativne selekcije je slabije izražen, dok se pozitivna selekcija ne detektuje ($p=0.1$). Pokazana varijabilnost malih virusih proteina, čiji su ORF regioni očuvani kod svih izolata B19 virusa, mogla bi učestvovati u održavanju njihovih funkcija.
8. Prosečna genetička distanca u okviru populacije izolata iz Srbije (0.93%) je u skladu sa vrednostima dobijenim za druge populacije B19 iz različitih delova sveta (0.80-1.45%).

9. Genetička distanca izolata iz Srbije u odnosu na ostale grupe, na osnovu skoro cele cDNK, kretala se u opsegu od 1.0% (Francuska) do 1.9% (Vijetnam)
8. Na osnovu filogenetskih odnosa celih ili delimičnih nukleotidnih sekvenci svi do sada identifikovani B19 izolati iz Srbije su genotipa 1.
9. U okviru genotipa 1 klasterizacija B19 virusa je nezavisna od geografskog porekla izolata.
10. Uočena zamena aminokiseline fenilalanin na poziciji 554 u sekvenci NS1 proteina fiksirana je u populaciji u Srbiji sa pokazanom pozitivnom selekcijom ($p=0.095$).
11. Značajna genetička distanca između izolata RS-B1/M1 i RS-M2, uzetim od istog pacijenta u toku i godinu dana nakon akutne infekcije, sugerise koinfekciju sa dve različite kvazivrste B19 virusa, od kojih se jedna zadržala kao perzistentna.

7 Literatura

A

Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M (2001). A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J Virol Met* 92: 183-191

Allander, T, Tammi, MT, Eriksson, M, Bjerkner, A, Tiveljung-Lindell, A, and Andersson, B (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12891-12896.

Anderson, MJ, Lewis, E, Kidd, IM, Hall, SM, and Cohen, BJ (1984). An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J. Hyg.(Lond)* 93, 85-93.

Anderson, MJ, Higgins, PG, Davis, LR, Willman, JS, Jones, SE, Kidd, IM, Pattison, JR, and Tyrrell, DA (1985). Experimental parvoviral infection in humans. *J. Infect. Dis.* 152, 257-265.

Astell, CR, Thomson, M, Merchlinsky, M, and Ward, DC (1983). The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* 11, 999-1018.

Altman K, *The Doctor's World*, New York Times, 30.11.1982

Aubin JT, Defer C, Vidaud M, Maniez Montreuil M, Flan B (2000). Large-scale screening for human parvovirus B19 DNA by PCR: application to the quality control of plasma for fractionation. *Vox Sang.* 2000;78(1):7-12.

Abe K, Kiuchi T, Tanaka K, Edamoto Y, Aiba N, Sata T (2007). Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *Int J Med Sci.* 2007 Apr 5;4(2):105-9.

Auguste, V, Garbarg-Chenon, A and Nguyen, QT (1999). Erythrovirus and its applications. Patent: WO 9928439-A2 1 10-JUN-1999;

B

Baylis SA, Ma L, Padley DJ, Heath AB and Yu MW (2009). Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Genotype Panel for Parvovirus B19 DNA Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays. Expert committee on biological standardization Geneva 2009. (WHO/BS/09.2122)

Baylis SA, Shah N, Minor PD (2004). Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J Virol Methods* 2004: 121(1):7-16.

Baylis S, Fryer J, Grabarczyk P (2007). Effects of probe binding mutations in an assay designed to detect parvovirus B19: Implications for the quantification of different virus genotypes. *J Virol Met* 139:97-99.

Baylis SA (2008). Standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for different genotypes of parvovirus B19 – a meeting summary. *Vox Sang.* 94: 74-80

Blumel, J, Schmidt, I, Effenberger, W, Seitz, H, Willkommen, H, Brackmann, HH, Lower, J, and Eis-Hubinger, AM (2002). Parvovirus B19 transmission by heat treated clotting factor concentrates. *Transfusion* 42, 1473-1481.

Bonvicini F, Gallinella G, Cricca M, Ambretti S, Delbarba S, Musiani M and Zerbini M. (2004). Molecular testing for detection of in vitro infectivity of plasma pools contaminated with B19 virus. *J Med Virol* 74:272-276.

Broliden, K, Tolfvenstam, T, and Norbeck, O (2006). Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J. Intern. Med.* 260, 285-304.

Brown, T, Anand, A, Ritchie, LD, Clewley, JP, and Reid, TM (1984). Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet* 2, 1033-1034.

Brown KE and Young NS (1995). Parvovirus B19 infection and Hematopoiesis. *Blood Reviews* 9: 176-182.

Brown KE, Anderson SM, and Neal SY (1993). Erythrocyte P Antigen: Cellular Receptor for B19 Parvovirus. *Science* Vol.262. 114-116.

Brown KE, Young NS, Alving BM, Barbosa LH (2001). Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion.* 41(1):130-5.

Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L (2008). Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol.* 74(5):1660-3.

Buller RS, Storch G (2004). Evaluation of a real-time PCR assay using the LightCycler system for detection of parvovirus B19 DNA. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:3326-8.

Boni MF, Posada, D & Feldman, MW (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176, 1035-1047.

Berger A, Preiser W, Doerr HW (2001). The role of viral load determination for the management of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virology* 20 (2001) 23–30.

Blümel J, Eis-Hübinger AM, Stühler A, Bönsch C, Gessner M, Löwer J (2005). Characterization of Parvovirus B19 genotype 2 in KU812Ep6 cells. *J Virol.* 2005 Nov;79(22):14197-206.

Blundell MC, Beard C, Astell CR (1987). In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology.* 1987 Apr;157(2):534-8.

Bedford T, Cobey S, Beerli P, Pascual M (2010). Global migration dynamics underlie evolution and persistence of human influenza A (H3N2). *PLoS Pathog.* 2010 May 27;6(5):e1000918. doi: 10.1371/journal.ppat.1000918.

C

Candotti, D, Etiz, N, Parsyan, A, and Allain, JP (2004). Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J.Virol.* 78, 12169-12178.

Cossart, YE, AM Field, B Cant, and D Widdows (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* i:72-73

Corcioli F, Zakrzewska K, Rinieri A, Fanci R, Innocenti M, Civinini R, De Giorgi V, Di Lollo S, Azzi A (2008). Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J Med Virol* 2008; 80:2005-11.

Cotmore, SF, McKie, VC, Anderson, LJ, Astell, CR, and Tattersall, P (1986). Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J. Virol.* 60, 548-557.

Chen AY, Zhang EY, Guan W, Cheng F, Kleiboeker S, Yankee TM, Qiu J (2010). The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood.* 2010 Feb 4;115(5):1070-80. doi: 10.1182/blood-2009-04-215756. Epub 2009 Oct 27.

D

da Costa AC, Bendit I, de Oliveira AC, Kallas EG, Sabino EC, Sanabani SS (2013). Investigation of human parvovirus B19 occurrence and genetic variability in different leukaemia entities. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Jan;19(1):E31-43. doi: 10.1111/1469-0691.12058. Epub 2012 Nov 20.

Daniel HD, Fletcher JG, Chandy GM, Abraham P (2009). Quantitation of hepatitis B virus DNA in plasma using a sensitive cost-effective "in-house" real-time PCR assay. *Indian J Med Microbiol.* 27(2):111-5.

Deiss, V, Tratschin, JD, Weitz, M, and Siegl, G (1990). Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* 175,247-254.

Doerig, C, Beard, P, and Hirt, B (1987). A transcriptional promoter of the human parvovirus B19 active in vitro and in vivo. *Virology* 157, 539-542.

Deuffic-Burban S, Delarocque-Astagneau E, Abiteboul D, Bouvet E, Yazdanpanah Y. (2011): Blood-borne viruses in health care workers: Prevention and management. *Journal of Clinical Virology* 52 (2011) 4– 10.

Dina J, Villedieu F, Labombarda F, Freymuth F, de la Gastine G, Jokic M, Vabret A (2011). Childhood myocarditis and parvovirus B19 genotypes. *J Clin Virol.* 2011 Jan;50(1):61-4. doi: 10.1016/j.jcv.2010.09.010. Epub 2010 Oct 16.

Dong Y, Huang Y, Wang Y, Xu P, Yang Y, Liu K, Tijssen P, Peng J, Li Y (2013). The effects of the 11 kDa protein and the putative X protein on the P6 promoter activity of Parvovirus B19 in Hela cells. *Virus Genes.* 2013 Feb;46(1):167-9. doi: 10.1007/s11262-012-0839-1. Epub 2012 Nov 2.

E

Ekman A, Hokynar K, Kakkola L, Kantola K, Hedman L, Bonden H, Gessner M, Aberham C, Norja P, Miettinen S, Hedman K and Soderlund-Venermo M (2007). Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1-3. *J. Virol.* 81: 6927-6935.

Enders, M, Schalasta, G, Baisch, C, Weidner, A, Pukkila, L, Kaikkonen, L, Lankinen, H, Hedman, L, Soderlund-Venermo, M, and Hedman, K (2006). Human parvovirus B19 infection during pregnancy--value of modern molecular and serological diagnostics. *J. Clin. Virol.* 35, 400-406.

Enders, M, Weidner, A, Zoellner, I, Searle, K, and Enders, G (2004). Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat. Diagn.* 24, 513-518.

F

FDA - U.S. Food and Drug Administration (2009). Nucleic Acid Testing (NAT) to Reduce the Possible Risk of Parvovirus B19 Transmission by Plasma-Derived Products. Rockville, MD: FDA Center for Biologics Evaluation and Research, July 2009). FDA draft Guidance for Industry available at <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm078510.pdf>

Fryer, JF, Kapoor, A, Minor, PD, Delwart, E, and Baylis, SA (2006). Novel parvovirus and related variant in human plasma. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 151-154.

Felsenstein J (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1981;17(6):368-76.

G

Gallinella G, Zerbini M, Musiani M, Venturoli S, Gentilomi G, Manaresi E (1997). Quantitation of parvovirus B19 DNA sequences by competitive PCR: differential hybridization of the amplicons and immunoenzymatic detection on microplate. *Mol Cell Probes* 1997; 11:127-33.

Gallinella G, Venturoli S, Manaresi E, Musiani M and Zerbini M (2003). B19 virus genome diversity: epidemiological and clinical correlations. *J. Clin. Virol.* 28, 1-13.

Geng Y, Wu C, Bhattacharyya S, Tan D, Guo ZP, and Yu M (2007). Parvovirus B19 DNA in Factor VIII concentrates: effects of manufacturing procedures and B19 screening by nucleic acid testing. *Transfusion* 47: 883-889.

Green, SW, Malkovska, I, O'Sullivan, MG, and Brown, KE (2000). Rhesus and pig-tailed macaque parvoviruses: identification of two new members of the erythrovirus genus in monkeys. *Virology* 269, 105-112.

Guindon S and Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52: 696-704.

Gibbs, MJ, Armstrong, JS & Gibbs, AJ (2000). Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16, 573-582.

H

Hall, TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hue KD, Tuan TV, Thi HT, Bich CT, Anh HH, Wills BA, Simmons CP (2011). Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Meth* 177:168-173.

Heegaard ED and Brown KE (2002). Human Parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:485-505.

Hokynar K, Norja P, Laitinen H, Palomäki P, Garbarg-Chenon A, Ranki A, Hedman K, Söderlund-Venermo M (2004). Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR tests. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(5):2013-9.

Hokynar K, Söderlund-Venermo M, Pesonen M, Ranki A, Kiviluoto O, Partio EK, Hedman K (2002). A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology.* 2002 Oct 25;302(2):224-8.

Hokynar K, Brunstein J, Söderlund-Venermo M, Kiviluoto O, Partio EK, Konttinen Y, Hedman K (2000). Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue. *J Gen Virol.* 2000 Apr;81(Pt 4):1017-25.

Hemauer A, von Poblitzki A, Gigler A, Cassinotti P, Siegl G, Wolf H and Modrow S (1996). Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J Gen Virol* 77: 1781-1785.

Hemauer,A, Beckenlehner,K, Wolf,H, Lang,B and Modrow,S (1999). Acute parvovirus B19 infection in connection with a flare of systemic lupus erythematoses in a female patient. *J. Clin. Virol.* 14 (1), 73-77.

Huang MM, Arnheim N, Goodman MF (1992). Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res.* 20(17):4567-4573.

Hübschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, Schneider F, Aboudy Y, Grossman Z, Rudich H, Kasymbekova K, Sarv I, Nedeljkovic J, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Gerasimova AG, Moskaleva TN, Tikhonova NT, Chitadze N, Forbi JC, Faneye AO, Otegbayo JA, Charpentier E, Muller CP (2009). Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J Clin Microbiol.* 47(11):3735-8.

Hicks KE, Cubel RC, Cohen BJ, Clewley JP (1996). Sequence analysis of a parvovirus B19 isolate and baculovirus expression of the non-structural protein. *Arch Virol.* 1996;141(7):1319-27.

J

Jones, MS, Kapoor, A, Lukashov, VV, Simmonds, P, Hecht, F, and Delwart, E (2005). New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J.Virol.* 79, 8230-8236.

Jordan, JA, and DeLoia, JA (1999). Globoside expression within the human placenta. *Placenta* 20, 103-108.

Johansen JN, Christensen LS, Zakrzewska K, Carlsen K, Hornsleth A, Azzi A (1998). Typing of European strains of parvovirus B19 by restriction endonuclease analyses and sequencing: identification of evolutionary lineages and evidence of recombination of markers from different lineages. *Virus Res.* 1998 Feb;53(2):215-23.

Jukes TH and Cantor CR (1969). *Evolution of Protein Molecules.* New York: Academic Press. pp. 21–132

K

Kauffman B, Simpson A and Rossmann M (2004). The structure of human parvovirus B19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(32): 11628–11633.

Kawase, M, Momoeda, M, Young, NS, and Kajigaya, S (1995). Most of the VP1u region of B19 parvovirus is on the capsid surface. *Virology* 211, 359-366.

- Kajigaya, S, Fujii, H, Field, A, Anderson, S, Rosenfeld, S, Anderson, LJ, Shimada, T, and Young, NS (1991). Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4646-4650.
- Kerr, JR (2005). Pathogenesis of parvovirus B19 infection: host gene variability, and possible means and effects of virus persistence. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 335-339.
- Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, Tobler L, Montalvo L, Todd D, Kiss JE, Shyamala V, Busch MP (2007). Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. National Heart, Lung, Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS-II). *Transfusion*. 2007; 47:1756-64.
- Koppelman MH, van Swieten P, Cuijpers HTM (2011). Real-time polymerase chain reaction detection of parvovirus B19 DNA in blood donations using a commercial and an in-house assay. *Transfusion* 51(6):1346-54.
- Koppelman MH, Rood I, Fryer J, Baylis S, Cuypers H (2007). Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays. *Vox Sang* 93:208-215
- Koppelman MH, Cuypers HT, Emrich T, Zaaijer HL (2004). Quantitative real-time detection of parvovirus B19 DNA in plasma. *Transfusion* 44(1):97-103.
- Kurtzman, G, Frickhofen, N, Kimball, J, Jenkins, DW, Nienhuis, AW, and Young, NS (1989). Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N. Engl. J. Med.* 321, 519-523.
- Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky JJ (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18(4):999-1005.
- Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SD (2006). GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics*. 2006 Dec 15;22(24):3096-8. Epub 2006 Nov 16.
- Kryazhimskiy S, Plotkin JB (2008). The population genetics of dN/dS. *PLoS Genet.* 2008 Dec;4(12):e1000304. doi: 10.1371/journal.pgen.1000304. Epub 2008 Dec 12.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980 Dec;16(2):111-20.
- Kimura M (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jan;78(1):454-8.

L

Lefrere JJ, Servant-Delmas, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrere F, Girot R, Allain JP, and Laperche S (2005). Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood* 106(8):2890-2895.

Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, Kershaw O, Endres AS, Raab U, Neumayer HH, Meisel H, Modrow S (2005). Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J Med Virol* 2005; 75:161-9.

Liu, JM, Green, SW, Shimada, T, and Young, NS (1992). A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J. Virol.* 66, 4686-4692.

Leruez, M, Pallier, C, Vassias, I, Elouet, JF, Romeo, P, and Morinet, F (1994). Differential transcription, without replication, of non-structural and structural genes of human parvovirus B19 in the UT7/EPO cell as demonstrated by in situ hybridization. *J.Gen. Virol.* 75 (Pt 6), 1475-1478.

Laitinen H, Wessberg S, Palomaki P (2002). Simoultaneous blood donor screening of HCV and B19-DNA in Finland. Poster at 27th Congress of the International Society of Blood Transfusion, Vancouver, Canada, August 24-29, 2002.

Lunardi C, Tinazzi E, Bason C, Dolcino M, Corrocher R, Puccetti A (2008). Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 8(2):116-20.

Lee TH, Kleinman SH, Wen L, Montalvo L, Todd DS, Wright DJ, Tobler LH, Busch MP (2011). Distribution of parvovirus B19 DNA in blood compartments and persistence of virus in blood donors. *NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II). Transfusion.* 2011 Sep;51(9):1896-908. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.03035.x. Epub 2011 Feb 8.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

M

Miller, E, Fairley, CK, Cohen, BJ, and Seng, C (1998). Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105,174-178.

Moffatt, S, Yaegashi, N, Tada, K, Tanaka, N, and Sugamura, K (1998). Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J.Virol.* 72, 3018-3028.

Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.

Martin, D and Rybicki, E (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16, 562-563.

Martin, DP, Posada, D, Crandall, K A and Williamson, C (2005). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21, 98-102.

Maynard Smith, J (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34, 126-129.

Momoeda, M, Wong, S, Kawase, M, Young, N S, and Kajigaya, S (1994). A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J. Virol.* 68:8443–8446.

Molenaar-de Backer MW, Lukashov VV, van Binnendijk RS, Boot HJ, Zaaijer HL (2012). Global co-existence of two evolutionary lineages of parvovirus B19 1a, different in genome-wide synonymous positions. *PLoS One.* 2012;7(8):e43206. doi: 10.1371/journal.pone.0043206. Epub 2012 Aug 13.

N

Norja P, Eis-Hübinger AM, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Simmonds P (2008). Rapid sequence change and geographical spread of human parvovirus B19: comparison of B19 virus evolution in acute and persistent infections. *J Virol.* 82(13):6427-6433.

Norja, P, Hokynar, K, Aaltonen, LM, Chen, R, Ranki, A, Partio, EK, Kiviluoto, O, Davidkin, I, Leivo, T, Eis-Hübinger, AM *et al.*, (2006). Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7450-7453.

Norbeck, O, Papadogiannakis, N, Petersson, K, Hirbod, T, Broliden, K, and Tolfvenstam, T (2002). Revised clinical presentation of parvovirus B19-associated intrauterine fetal death. *Clin. Infect. Dis.* 35, 1032-1038.

Nei M and Kumar S (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York.

Norja, Päivi (2012). Prevalence and evolution of human parvoviruses, Department of Virology Haartman Institute University of Helsinki Finland

Novitsky V, Essex M (2012). Using HIV viral load to guide treatment-for-prevention interventions. *Curr Opin HIV AIDS.* 2012 Mar;7(2):117-24.

Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED, Brown KE (2002). Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology.* 2002 Sep 30;301(2):374-80.

Nübling, CM, Daas, A, Buchheit KH (2003). Collaborative study for establishment of a European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (BRP) for B19 virus DNA testing of plasma pools by nucleic acid amplification technique. *Pharmeuropa Bio* 2003-2, 27-33.

O

O'Sullivan, MG, Anderson, DC, Fikes, JD, Bain, FT, Carlson, CS, Green, SW, Young, NS, and Brown, KE (1994). Identification of a novel simian parvovirus in cynomolgus monkeys with severe anemia. A paradigm of human B19 parvovirus infection. *J. Clin. Invest.* 93, 1571-1576.

Ozawa, K, Ayub, J, Hao, YS, Kurtzman, G, Shimada, T, and Young, N (1987). Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* 61, 2395-2406.

Ozawa, K, and Young, N (1987). Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol.* 61,2627-2630.

Ozawa, K, Ayub, J, and Young, N (1988). Functional mapping of the genome of the B19 (human) parvovirus by in vitro translation after negative hybrid selection. *J. Virol.*62, 2508-2511.

P

Parsyan A, Szmaragd C, Allain JP and Candotti D (2007). Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J. Gen. Virol.* 88: 428-431.

Parsyan A, Kerr S, Owusu-Ofori S, Elliott G, Allain JP (2006). Reactivity of genotype-specific recombinant proteins of human erythrovirus B19 with plasmas from areas where genotype 1 or 3 is endemic. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1367-75.

Pattison, JR, Jones, SE, Hodgson, J, Davis, LR, White, JM, Stroud, CE, and Murtaza, L (1981). Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* 1, 664-665.

Ph.Eur. (2010). Nucleic acid amplification techniques; Validation of nucleic acid amplification techniques (NAT) for the quantification of B19 virus (B19V) DNA in plasma pools: guidelines, monograph 07/2010:20621. European Pharmacopoeia, 7th ed. Strasbourg, France: Council of Europe.

Ph.Eur. (2013). Monographs 0853, 1646, 1527, 0557. European Pharmacopoeia, 7th ed. Strasbourg, France: Council of Europe.

Plentz A, Hahn J, Holler E, Jilg W, Modrow S (2004). Long-term parvovirus B19 viraemia associated with pure red cell aplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Virol.* 2004 Sep;31(1):16-9.

Posada D (2003). Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2003 Feb;Chapter 6:Unit 6.5. doi: 10.1002/0471250953.bi0605s00.

R

Raab, U, Beckenlehner, K, Lowin, T, Niller, HH, Doyle, S, and Modrow, S (2002). NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the P6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology* 293, 86-93.

Reitblat T, Drogenikov T, Sigalov I, Oren S, London D (2000). Transient anticardiolipin antibody syndrome in a patient with parvovirus B19 infection. *Am J Med*109(6):512-3.

Rosenfeld, SJ, Yoshimoto, K, Kajigaya, S, Anderson, S, Young, NS, Field, A,Warrener, P, Bansal, G, and Collett, MS (1992). Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J. Clin. Invest.* 89,2023-2029.

Ros, C, Gerber, M, and Kempf, C (2006). Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J. Virol.* 80, 12017-12024.

Rinkeru,LA, Buno,B, Bimusu,B, Glenn,C, Giaman,TM and Lee,DC (2010). Human Erythrovirus. Patent: JP 2010516231-A 130 20-MAY-2010; Talecris Biotherapeutics Inc.

S

Sato, H, Hirata, J, Kuroda, N, Shiraki, H, Maeda, Y, and Okochi, K (1991). Identification and mapping of neutralizing epitopes of human parvovirus B19 by using human antibodies. *J. Virol.* 65, 5485-5490.

Shneerson, JM, Mortimer, PP and Vandervelde EM (1980). Febrile illness due to a parvovirus. *Br. Med. J.* 280:1580.

Schmidt I, Blumel J, Seitz H, Willkommen H and Lower J (2001). Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives. *Vox Sang.* 81: 228-235.

Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF and Garbarg-Chenon A (2002). Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol.* 76: 9124-9134

Servant-Delmas A, Lefrere JJ, Morinet F, Pillet S (2010). Advances in Human B19 Erythrovirus Biology. *J. Virol.* 84: 9658-9665.

Schalasta G, Schmid M, Lachmund T, Enders G (2004). LightCycler Consensus PCR for Rapid and Differential Detection of Human Erythrovirus B19 and V9 Isolates. *J Med Virol* 73: 54-59.

Saldanha J, Lelie N, Yu MW, Heath A and Collaborative Study Group (2002). Establishment of the first World Health Organization International Standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang.* 82: 24-31

Shackelton L and Holmes E (2006). Phylogenetic Evidence for the Rapid Evolution of Human B19 Erythrovirus. *J.Virol.* 80:3666-3669

Siegl, G, Bates, RC, Berns, KI, Carter, BJ, Kelly, DC, Kurstak, E and Tattersall, P (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23:61-73.

Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45, 555-564.

Srivastava, A, Bruno, E, Briddell, R, Cooper, R, Srivastava, C, van Besien, K, and Hoffman, R (1990). Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 76, 1997-2004.

Suikkanen, S, Antila, M, Jaatinen, A, Vihinen-Ranta, M, and Vuento, M (2003). Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316, 267-280.

Stanojević B, Osiowy C, Schaefer S, Bojović K, Blagojević J, Nešić M, Yamashita S, Stamenković G (2011). Molecular characterization and phylogenetic analysis of full-genome HBV subgenotype D3 sequences from Serbia. *Infect Genet Evol.* 2011 Aug;11(6):1475-80. doi: 10.1016/j.meegid.2011.05.004. Epub 2011 May 13.

Schneider B, Höne A, Tolba RH, Fischer HP, Blümel J, Eis-Hübinger AM (2008). Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *J Gen Virol.* 2008 Jan;89(Pt 1):164-76.

Stamenkovic G, Zerjav S, Velickovic ZM, Krtolica K, Samardzija VL, Jemuovic L, Nozic D, Dimitrijevic B (2000). Distribution of HCV genotypes among risk groups in Serbia. *Eur J Epidemiol.* 2000;16(10):949-54.

Stamenković G, Nešić M, Blagojević J, Joksić I, Nikolić V, Šiljić M, Knežević A, Stanojević M (2013). Analyses of parvovirus B19 cDNA in Serbia: phylogeny and characterization of substitution, rad u pripremi.

Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR (1986). Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol.* 1986 Jun;58(3):921-36.

T

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molec. Biol. Evol.* (10):2731-9.

Tattersall, P (2006). The evolution of parvovirus taxonomy. In *Parvoviruses /the book*, Kerr, J.R., Cotmore, S. F., Bloom, M. E., Linden, R. M. and Parrish, C. R. eds., (Great Britain: Hodder Arnold) pp. 5-14.

Tattersall, P, Bergoin, M, Bloom, ME, and i sar., (2005). Parvoviridae. In *Virus taxonomy, VIIIth report of the ICTV*. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. eds., (London: Elsevier/Academic Press) pp. 353-369.

Takasawa N, Munakata Y, Ishii KK, Takahashi Y, Takahashi M, Fu Y, Ishii T, Fujii H, Saito T, Takano H, Noda T, Suzuki M, Nose M, Zolla-Patzner S, Sasaki T (2004). Human parvovirus B19 transgenic mice become susceptible to polyarthritis. *J Immunol.* 2004 Oct 1;173(7):4675-83.

Toan NL, Duechting A, Kreamsner PG, Song le H, Ebinger M, Aberle S, Binh VQ, Duy DN, Torresi J, Kandolf R, Bock CT (2006). Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J Gen Virol.* 2006 Oct;87(Pt 10):2941-9.

Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10 (3): 512–526. PMID 8336541.

Tavaré S (1986). Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* (American Mathematical Society) 17: 57–86.

V

von Landenberg P, Lehmannb H., Modrowc S (2007). Human parvovirus B19 infection and antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev.* 6(5):278-85.

von Poblitzki, A, Hemauer, A, Gigler, A, Puchhammer-Stockl, E, Heinz, FX, Pont, J, Laczika K, Wolf, H and Modrow, S (1995). Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 172:1356–1359.

W

Wu C, Mason B, Jong J, Erdman D, McKernan L, Oakley M, Soucie M, Evatt B and Yu M (2005). Parvovirus B19 transmission by a high purity factor VIII concentrate. *Transfusion* 45:1003-1010.

White, DG, Woolf, AD, Mortimer, PP, Cohen, BJ, Blake, DR, and Bacon, PA (1985). Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1, 419-421.

Woolf, AD, Campion, GV, Chishick, A, Wise, S, Cohen, BJ, Klouda, PT, Caul, O and Dieppe PA (1989). Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch. Intern. Med.* 149:1153–1156.

Weiller, GF (1998). Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Mol Biol Evol* 15, 326-335.

Y

Yoto, Y, Qiu, J, and Pintel, DJ (2006). Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA. *J. Virol.* 80, 1604-1609.

Z

Zadori, Z, Szelei, J, Lacoste, MC, Li, Y, Gariépy, S, Raymond, P, Allaire, M, Nabi, IR, and Tijssen, P (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell.* 1, 291-302.

Zhi, N, Zadori, Z, Brown, KE, and Tijssen, P (2004). Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19. *Virology* 318, 142-152.

Zhi, N, Mills, IP, Lu, J, Wong, S, Filippone, C, and Brown, KE (2006). Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J. Virol.* 80, 5941-5950.

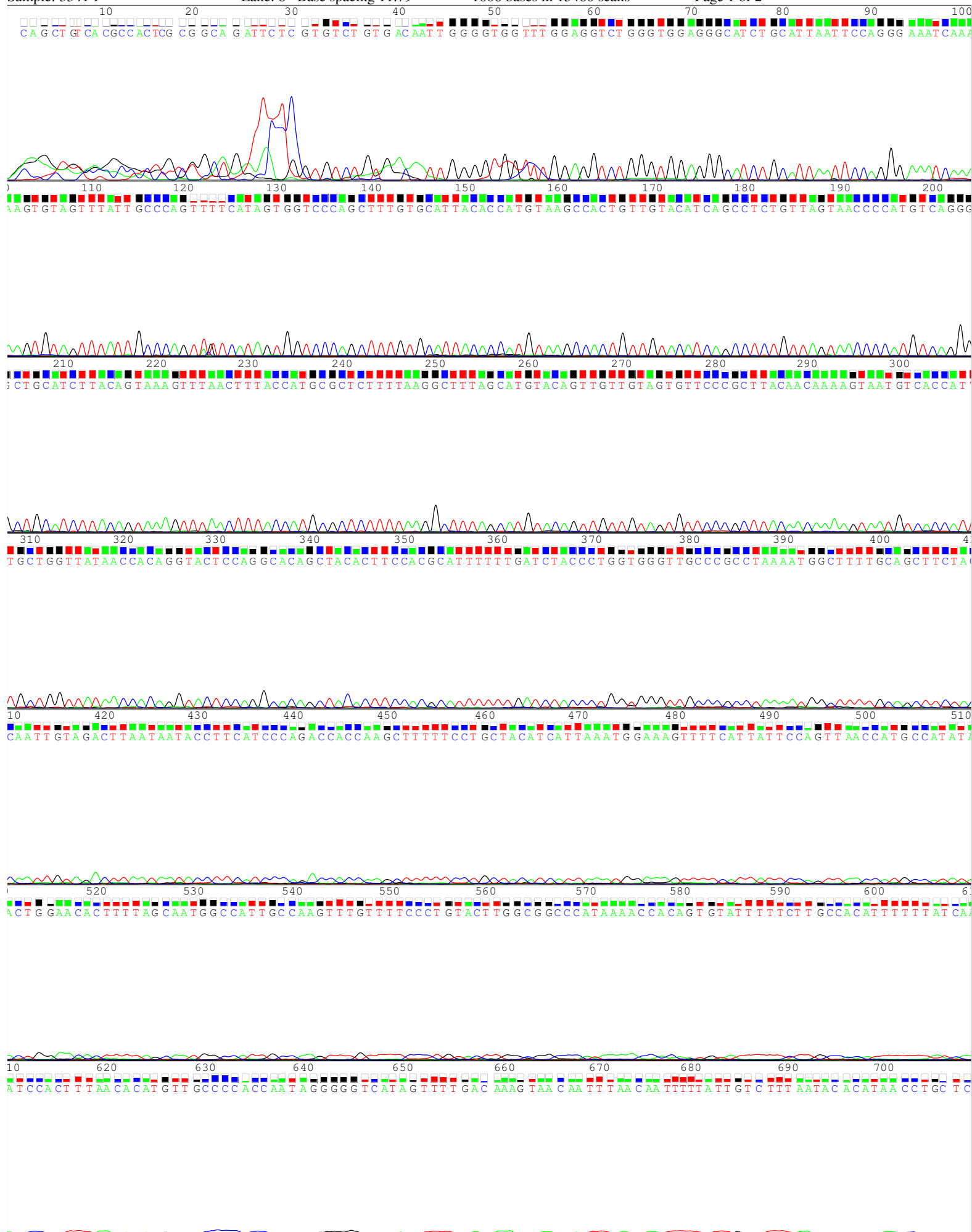
Zimmermann K, Rieger M, Gross P, Turecek PL, Schwarz HP (2000). Sensitive single-stage PCR using custom-synthesized internal controls. *Biotechniques.* 2000 Apr;28(4):694-6, 698, 700 passim.

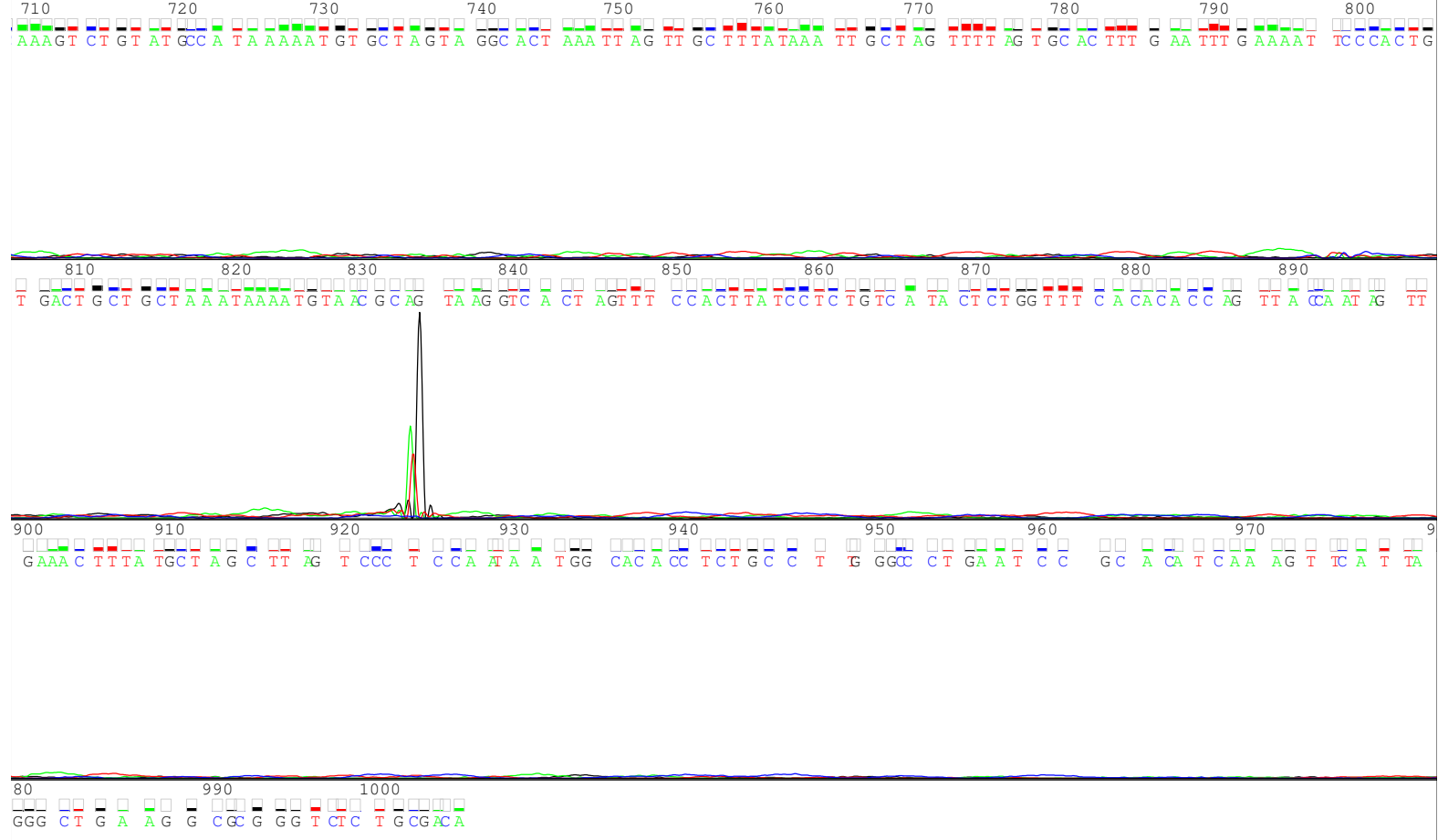
Zharkikh A (1994). Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1994 Sep;39(3):315-29.

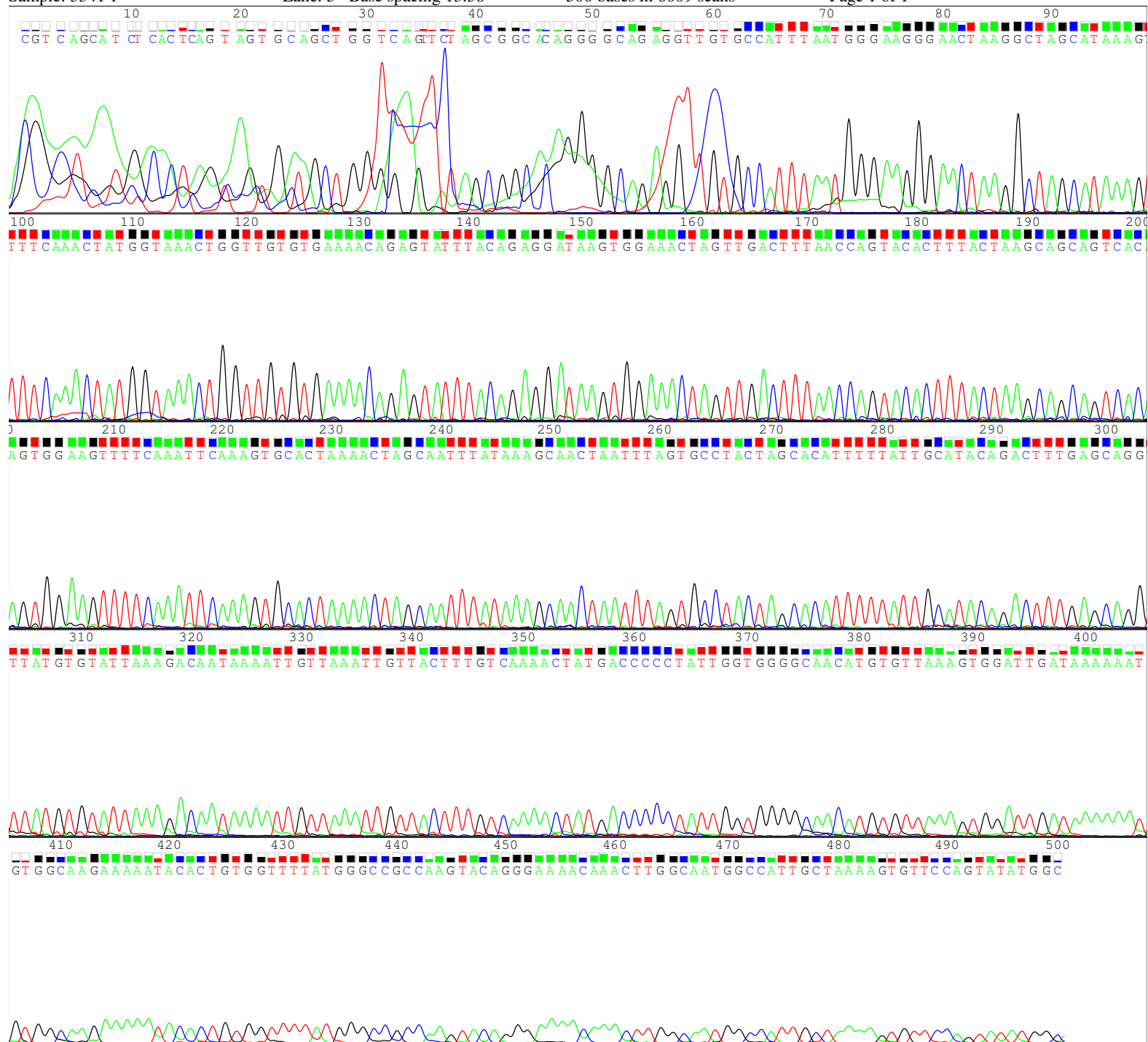
8 Prilozi

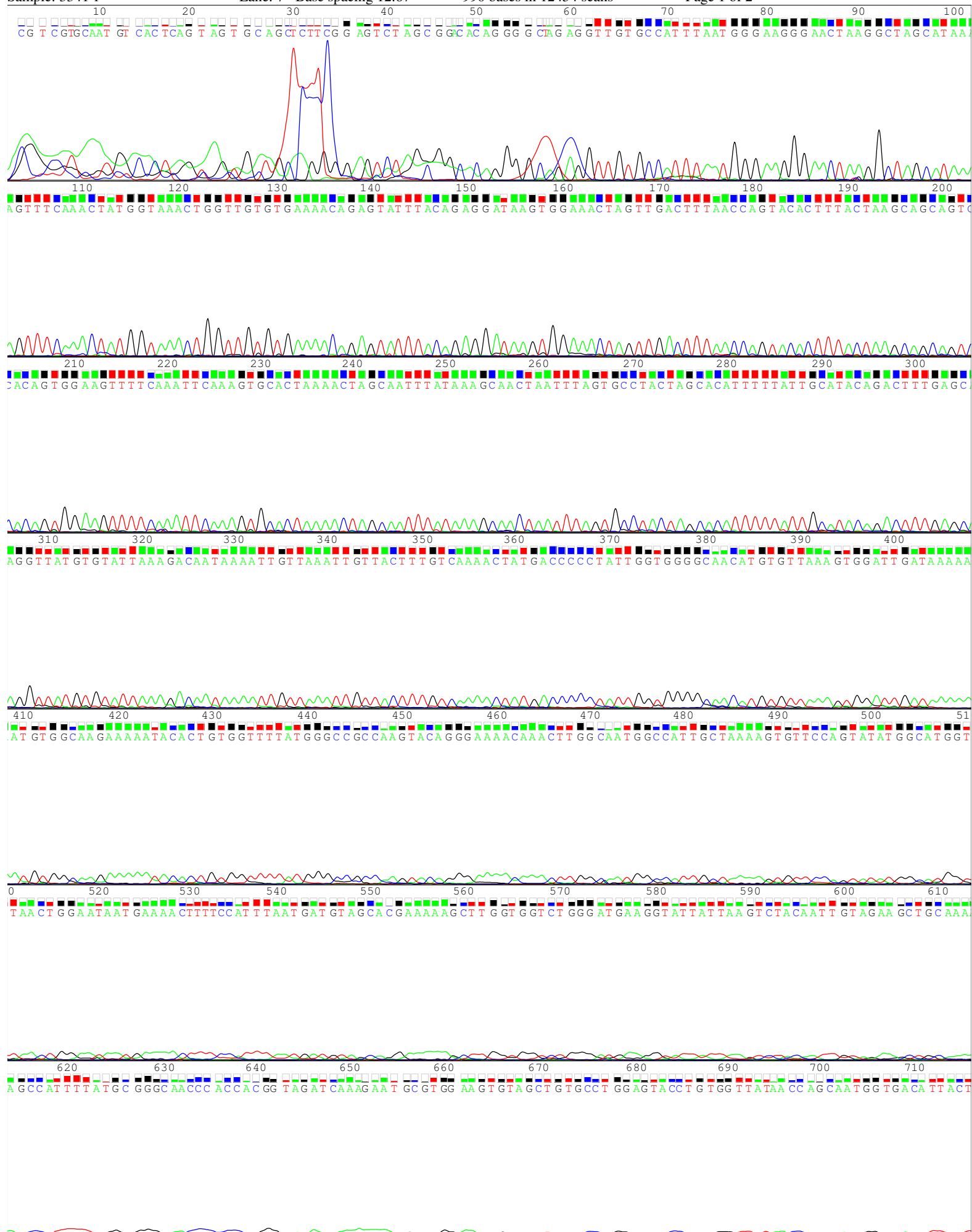
Prilog 1.

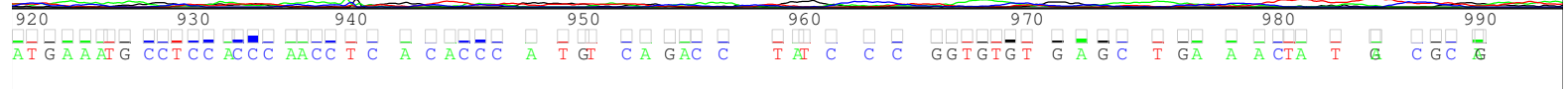
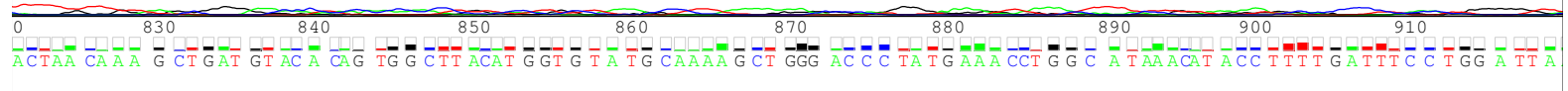
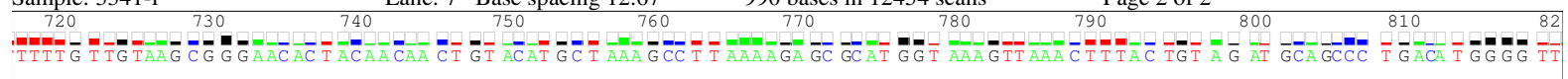
Pregled hromatograma u zapisu Finch.tv programa (izolat RS-4)

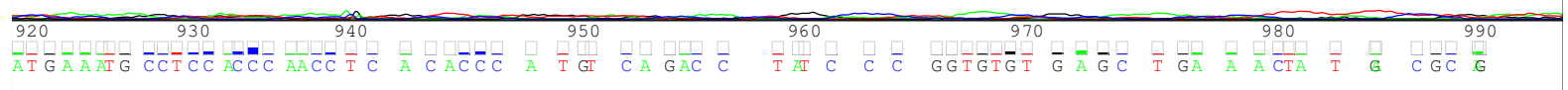
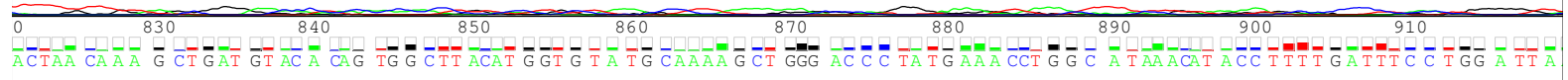
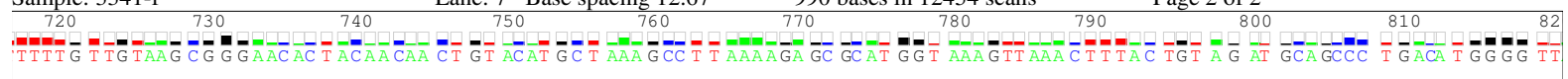


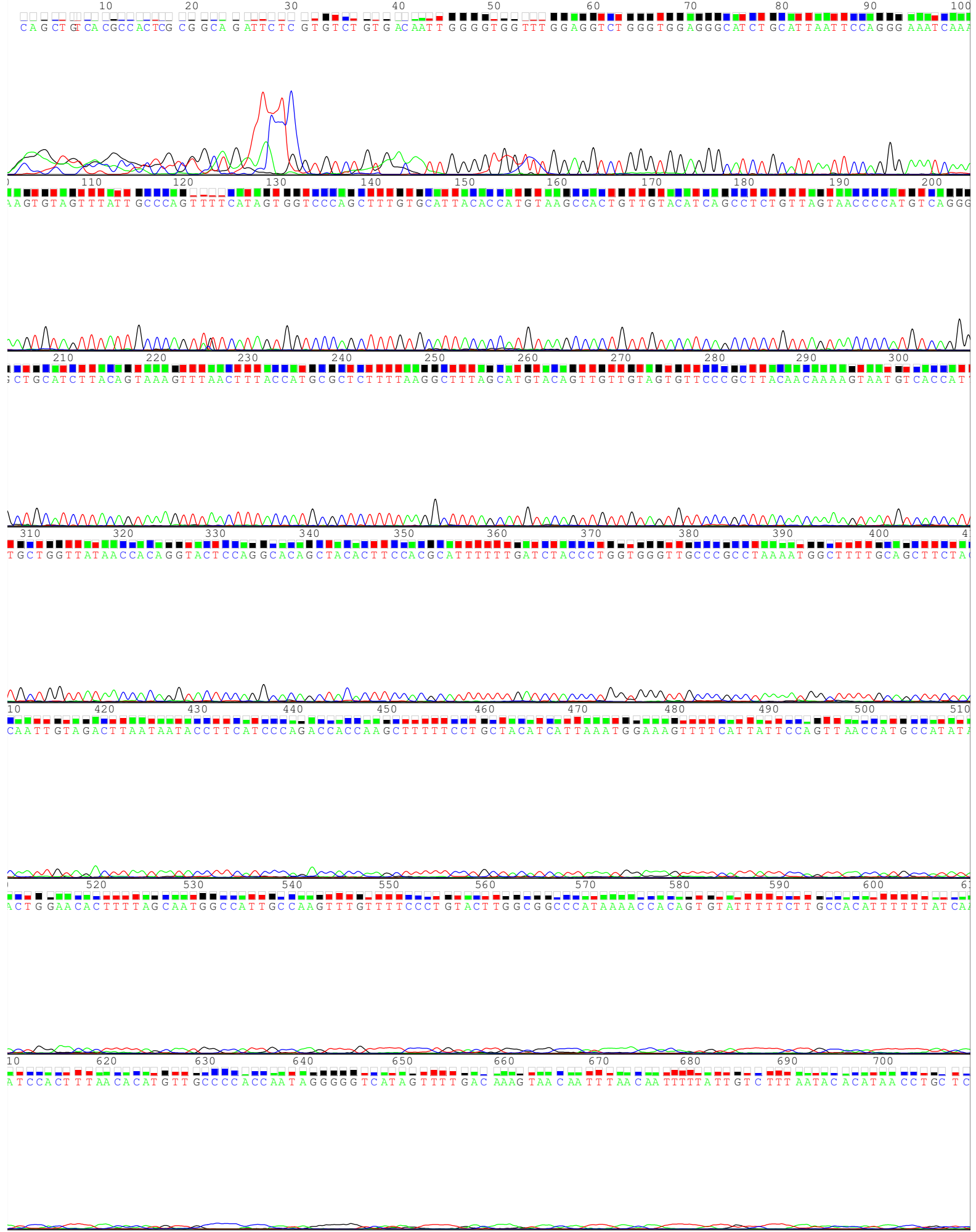


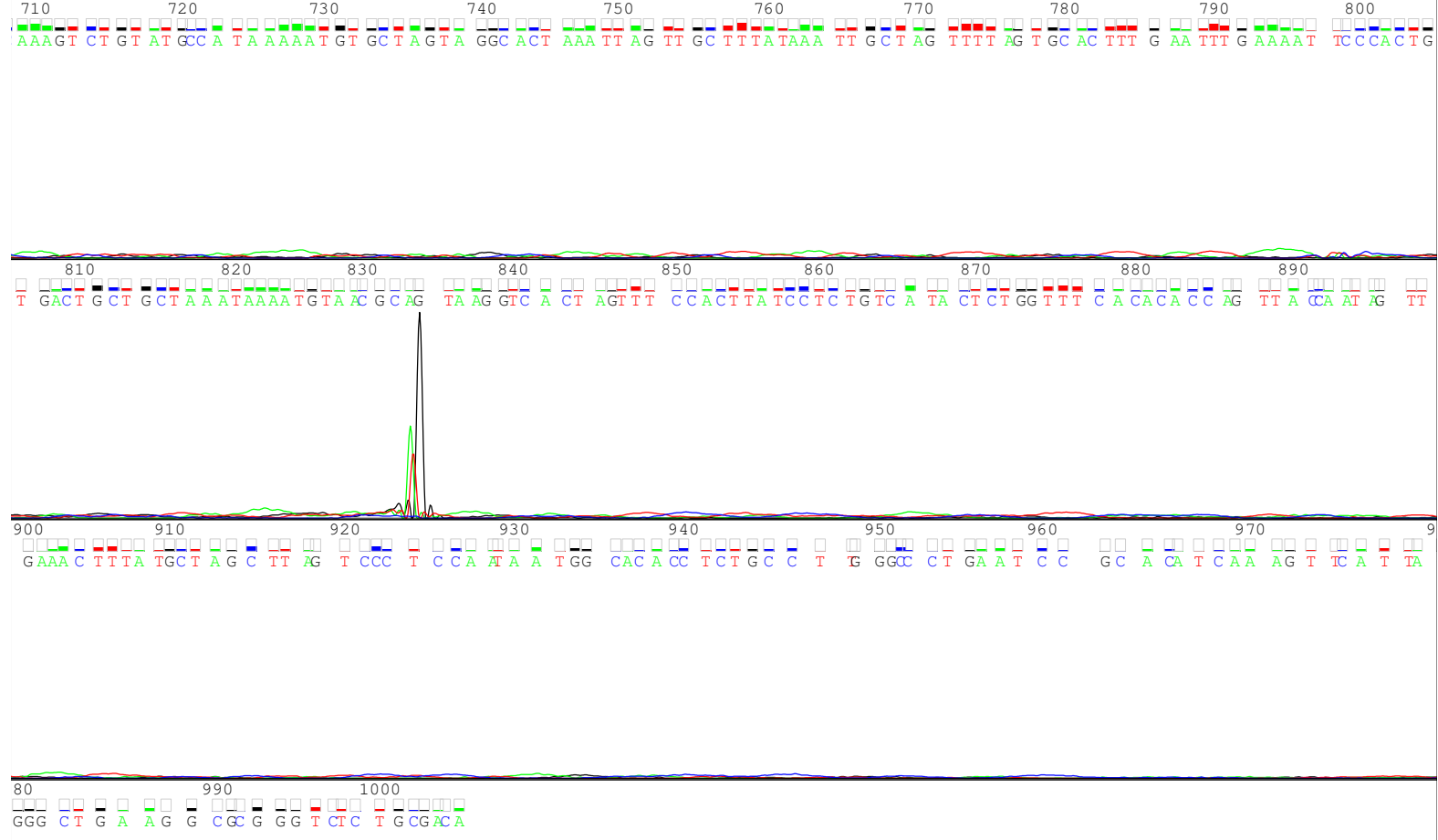


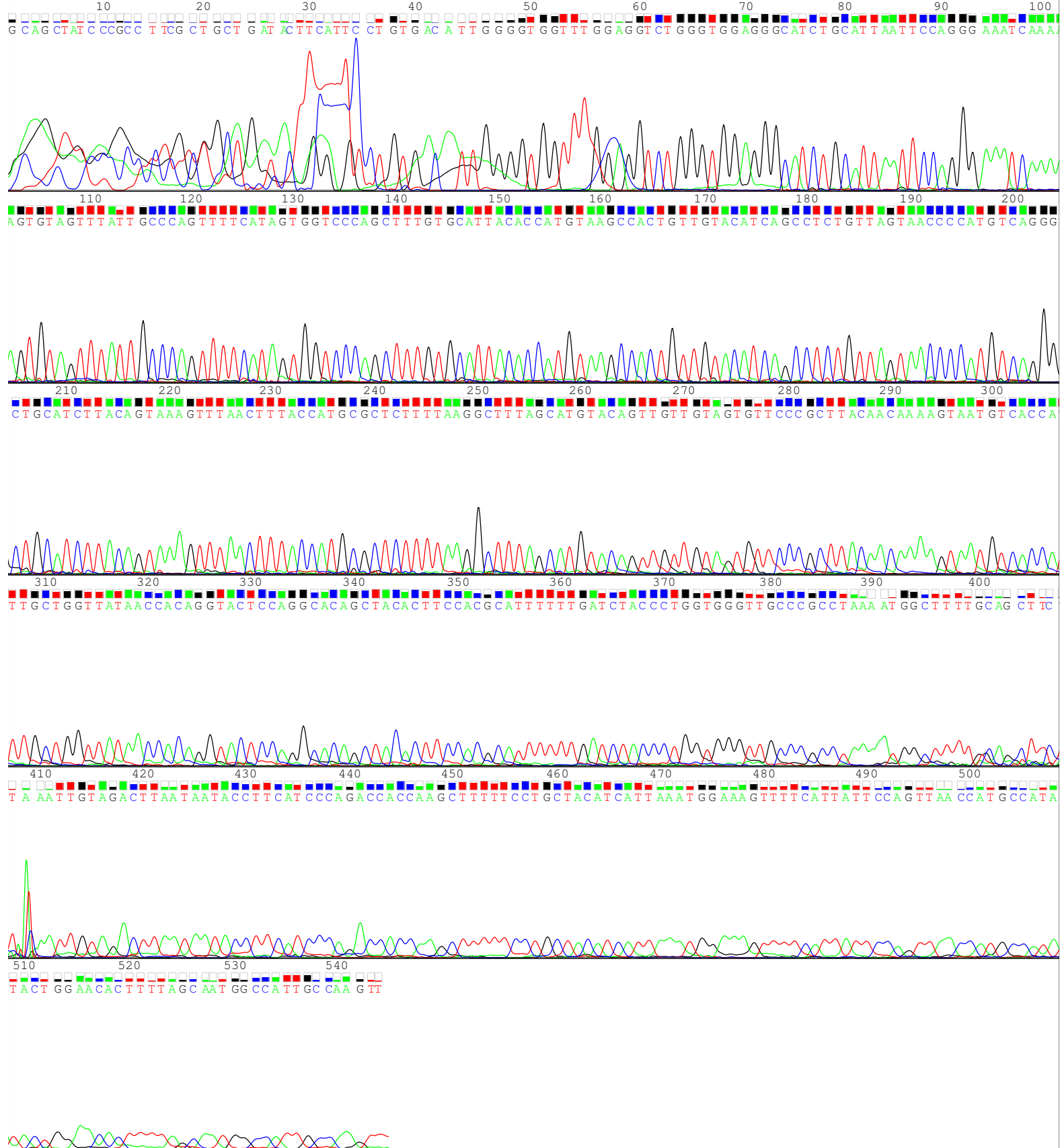


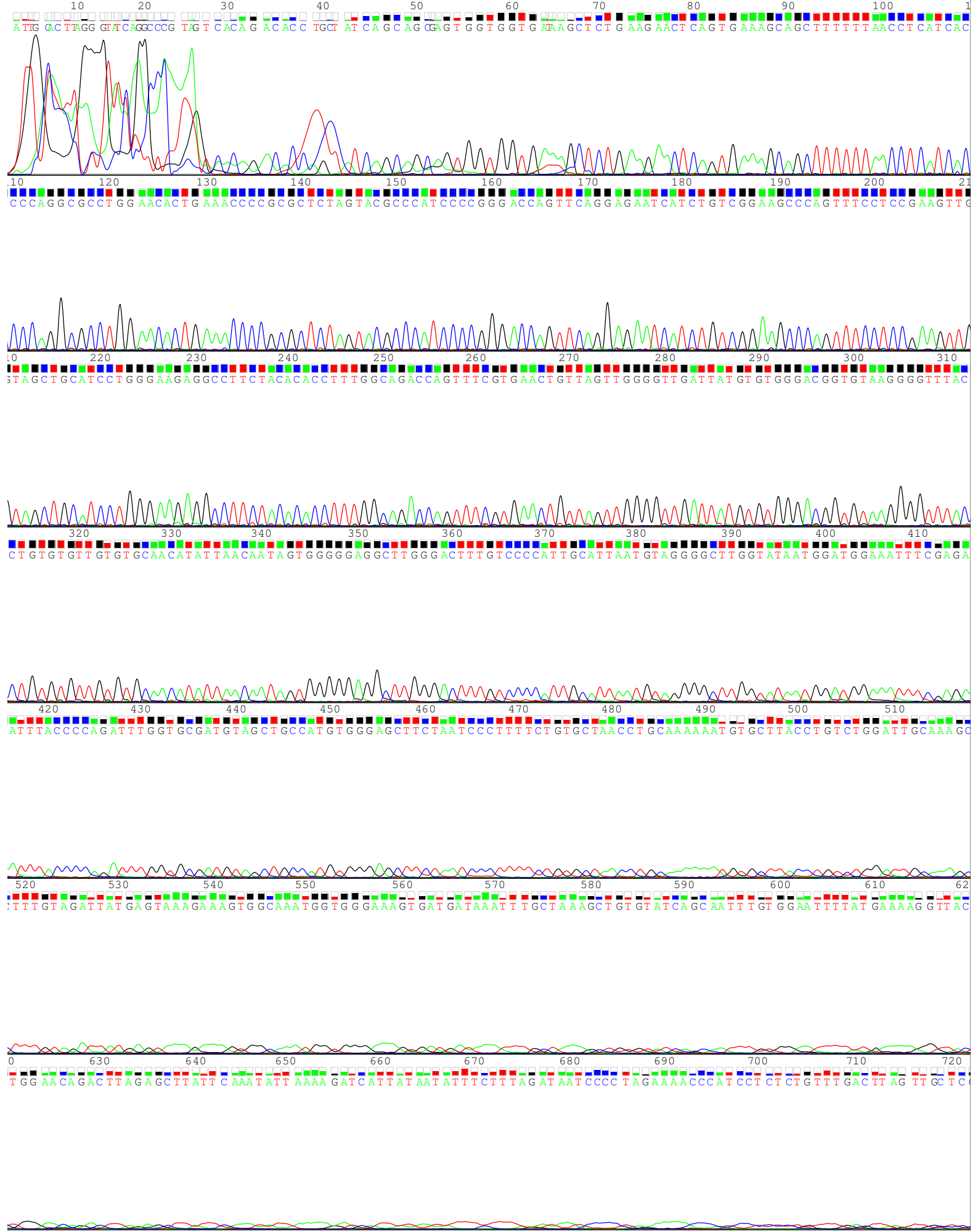


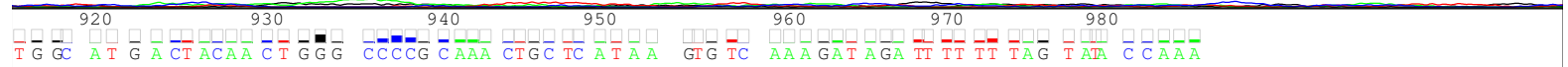
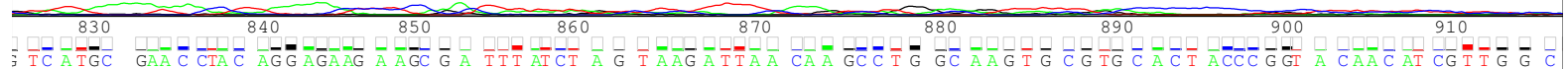
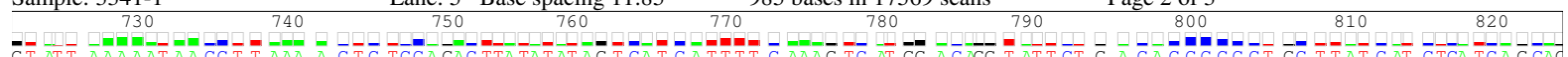


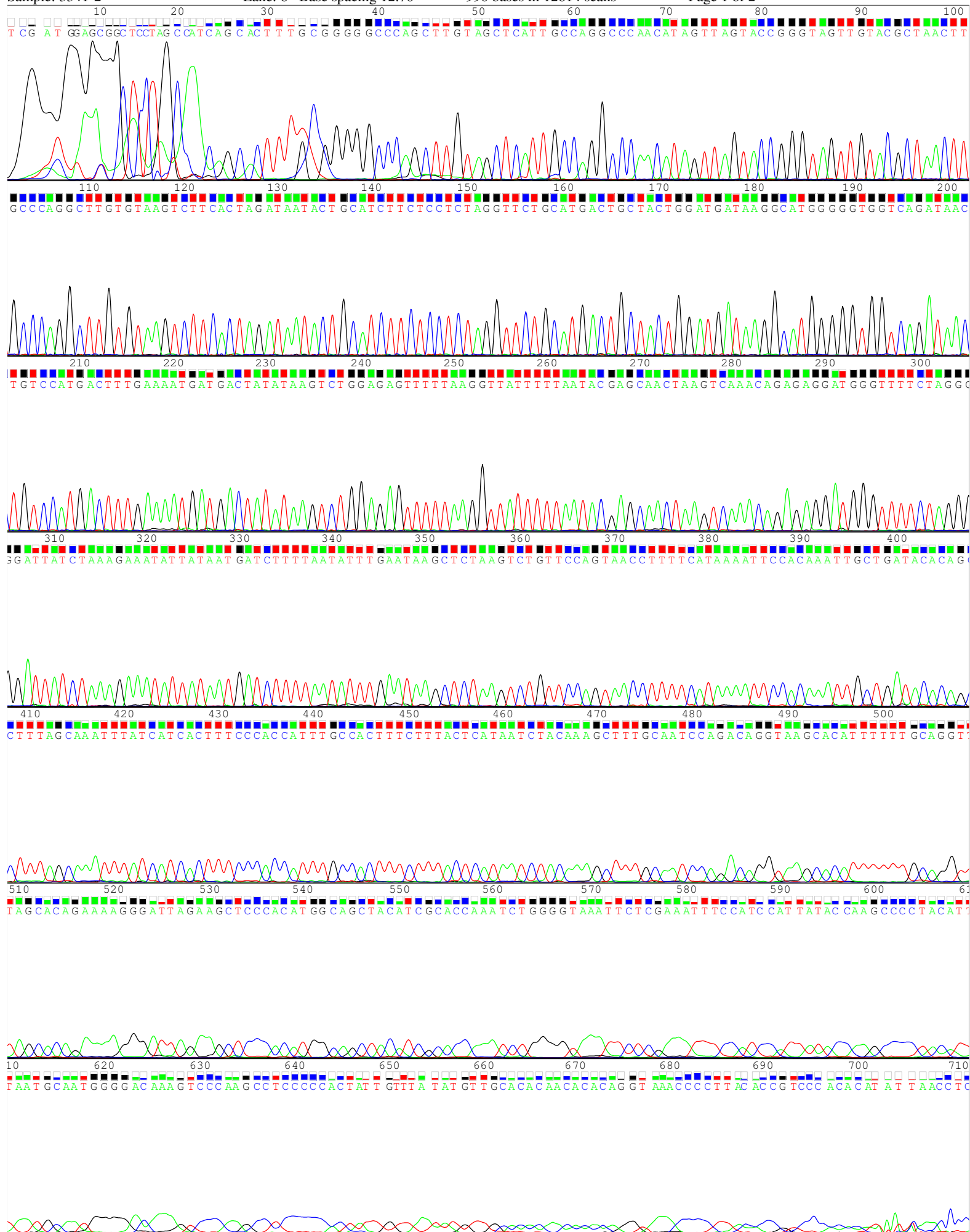


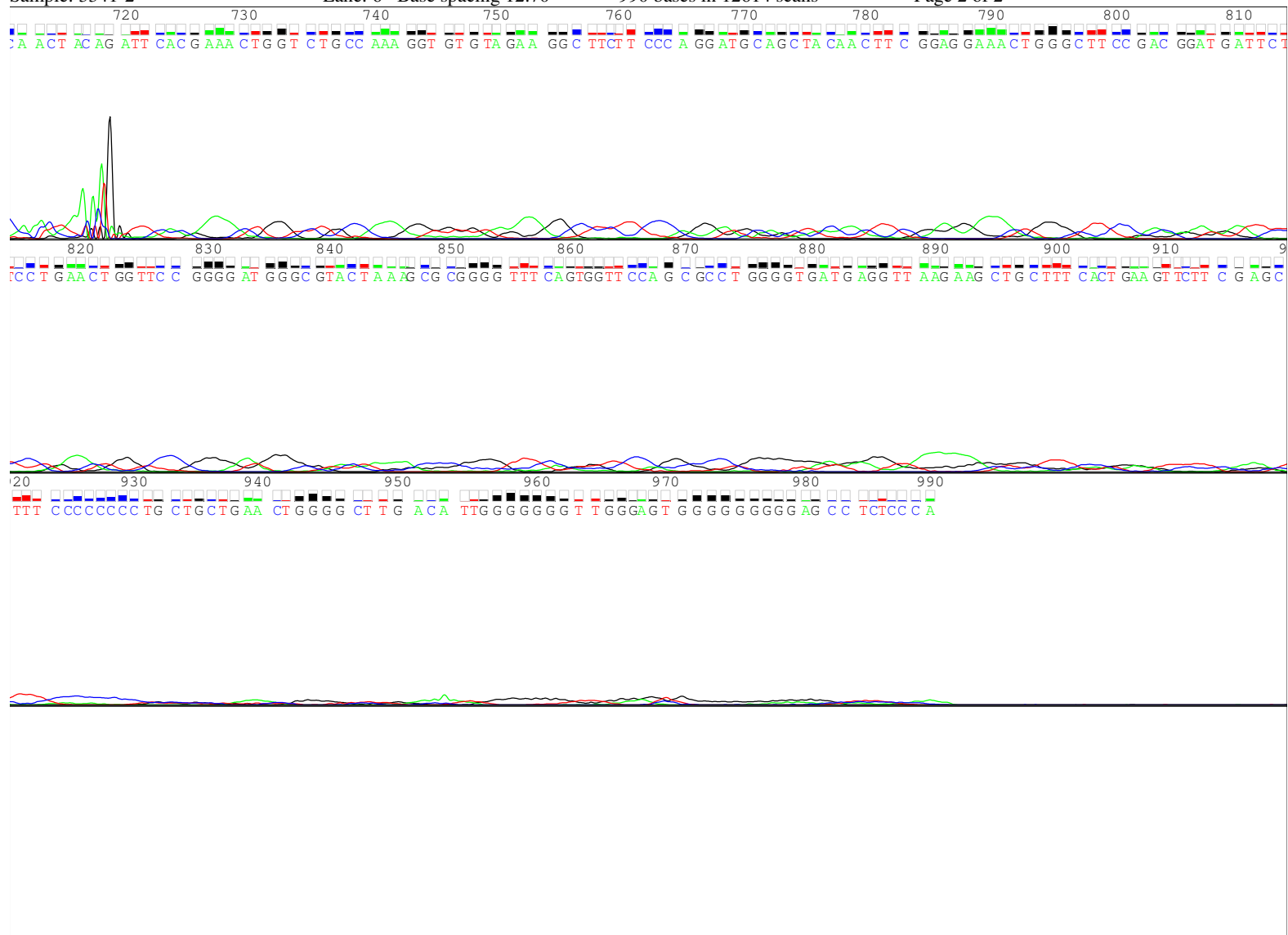




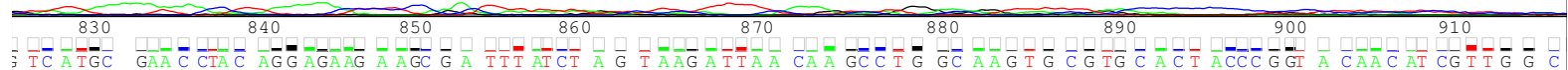






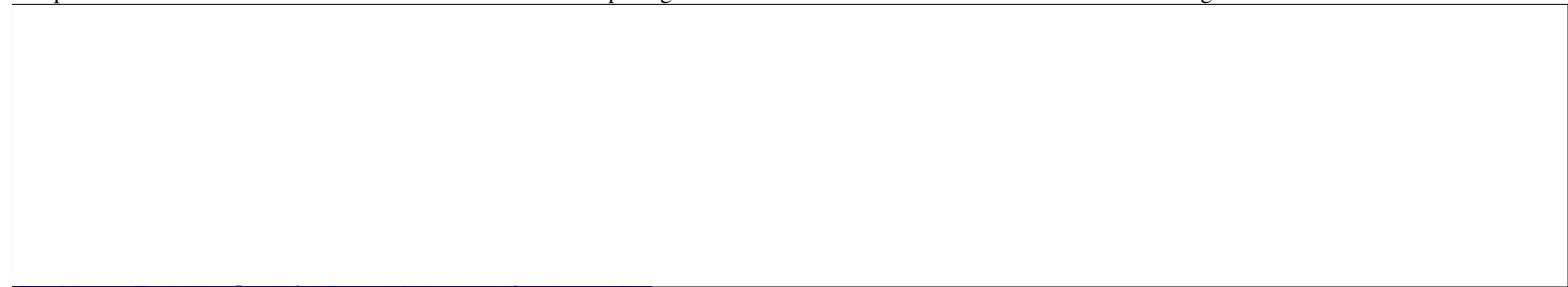


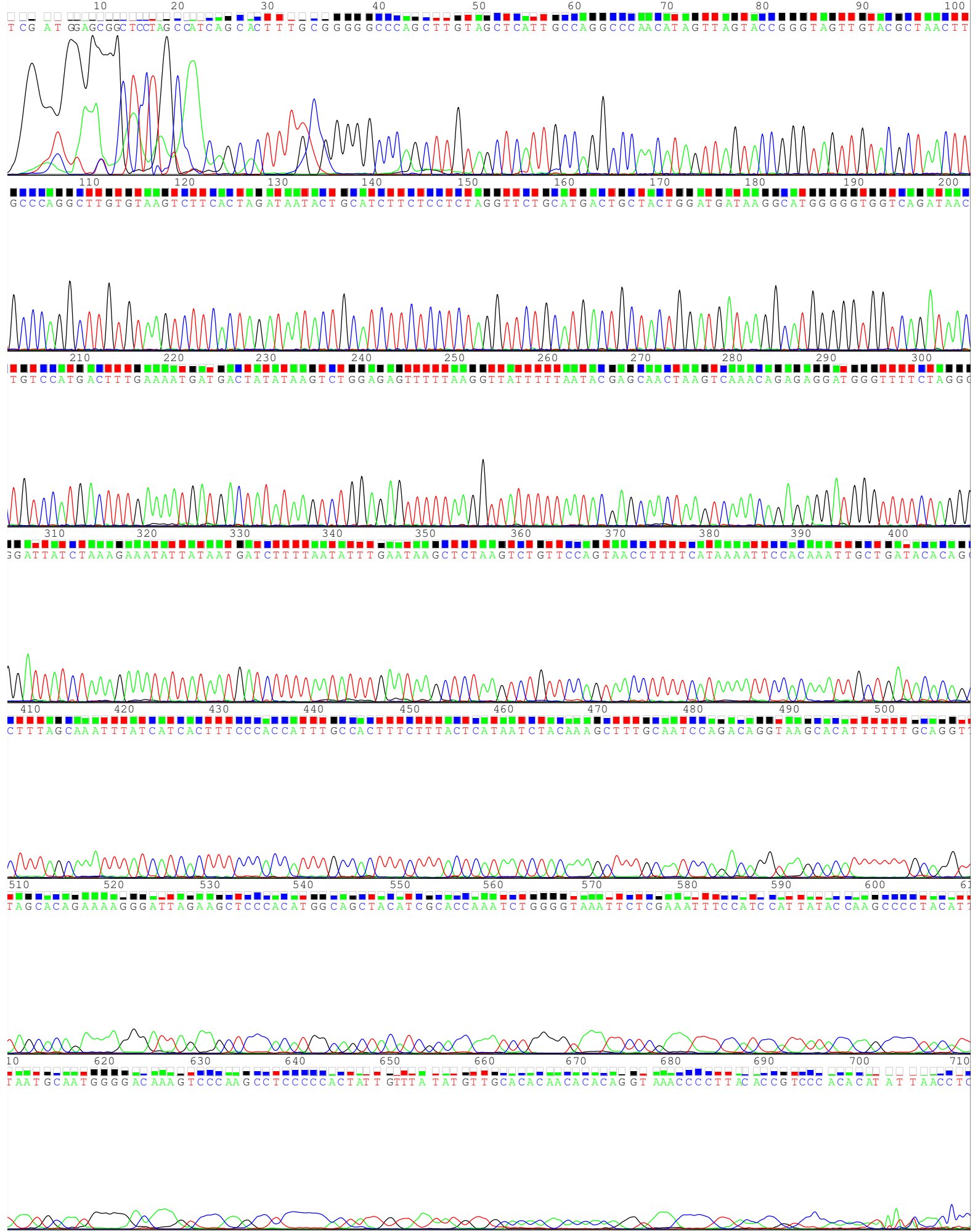
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820
GT AT T AAAAAT AA CC T T AAA A C TC TCCA GAC TTATATATAG T CAT C A T T T T C AAA G TC AT GG ACAGG T AT T CT G A CA C C C C C C T GC T T AT C AT CTCA TCA G CAG



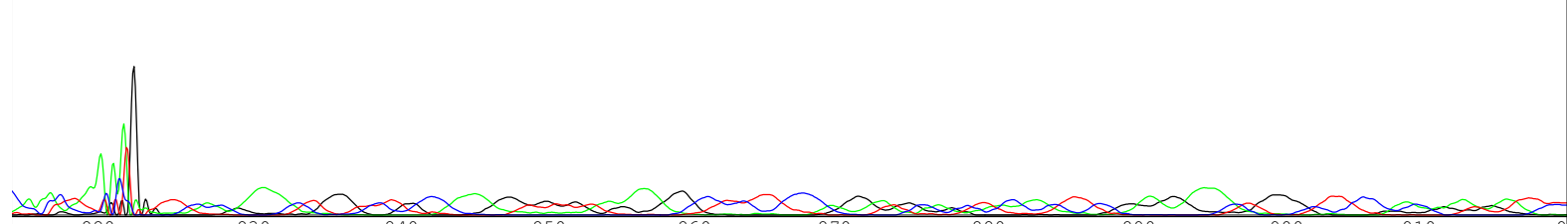
T C A T GC GAA C CTA C AGG AGAAG A AGC G A T T T AT CT A G T AAG A T T A A CA A GC C T G GC AA G T G C G TG C A C T ACCC G GT A CAA C AT CG T T G C

920 930 940 950 960 970 980
T G GC A T G A CTACAA CT G G G C C C C G C A A A CTGC TC A T A A GTG TC A A A G A T A G A T T T T T A G T A T A C C A A A

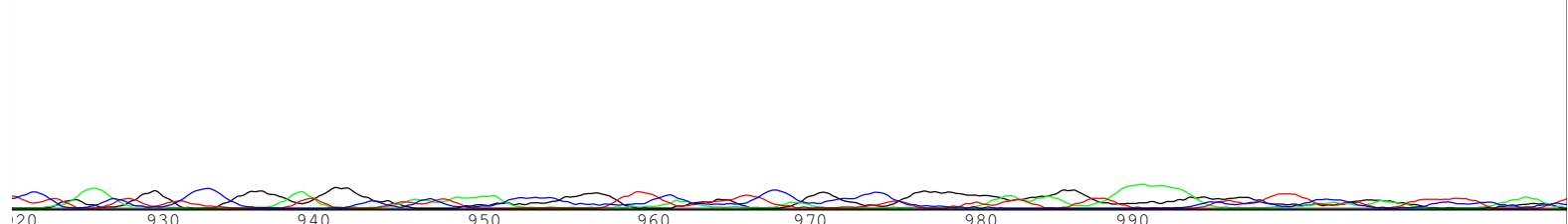




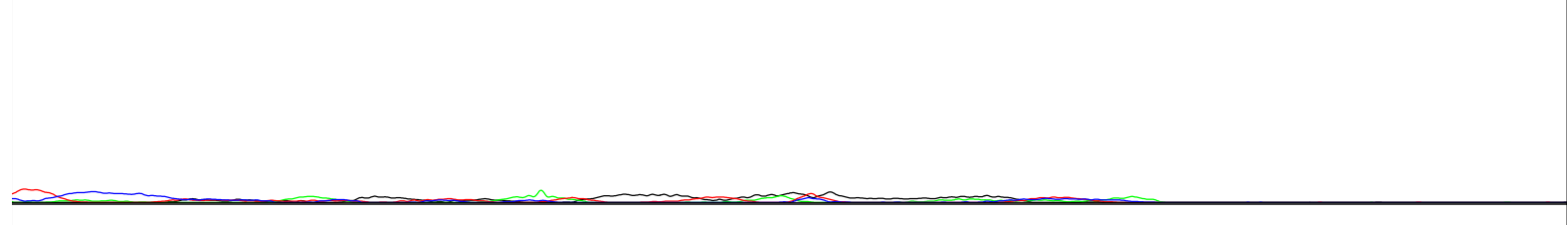
720 730 740 750 760 770 780 790 800 810
A A C T A C A G A T T C A C G A A A C T G G T C T G C C A A A G G T G T G T A G A A G G C T T C T C C C A G G A T G C A G C T A C A A C T T C G G A G A A A C T G G G C T T C C G A C G G A T G A T T C T

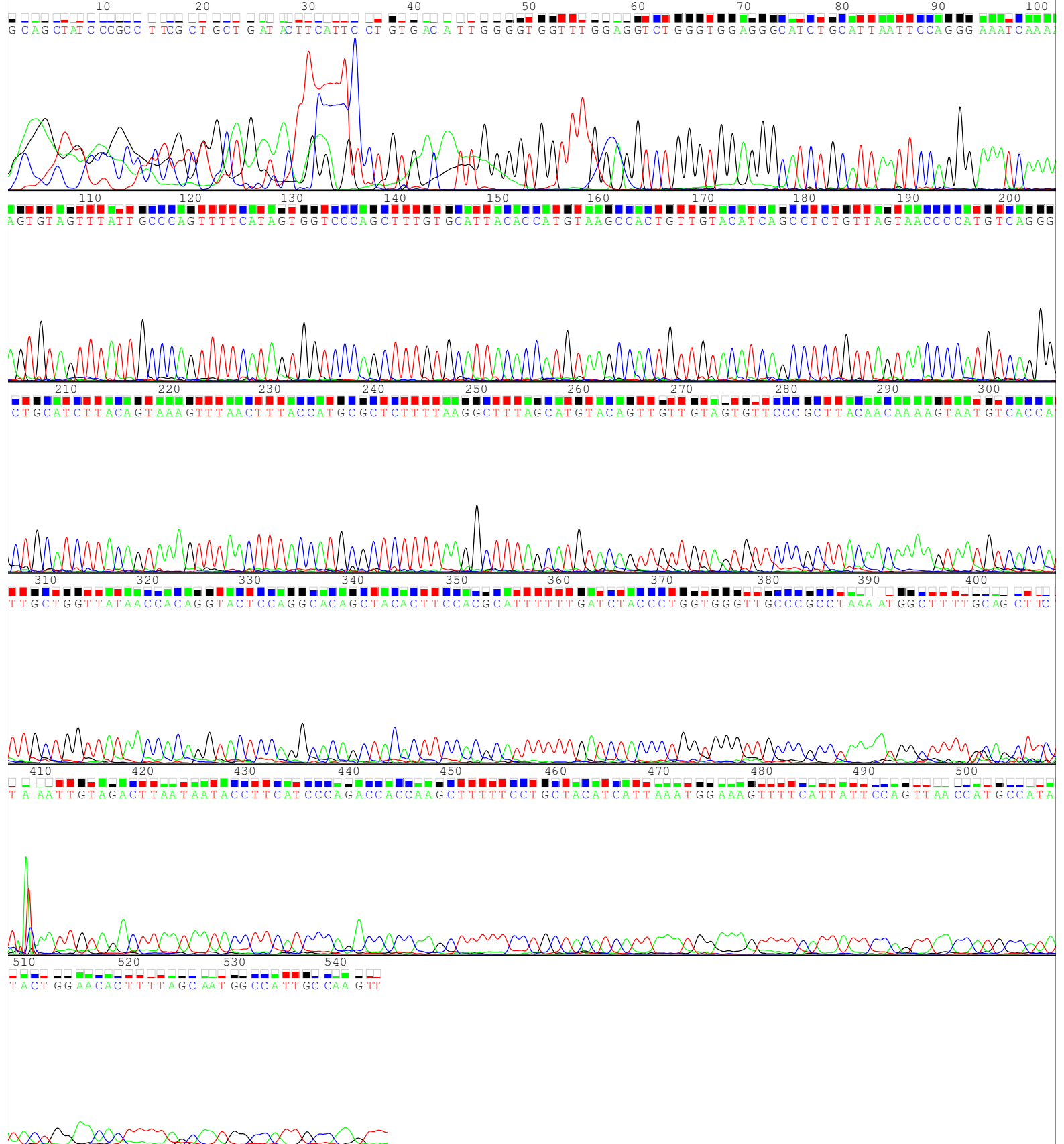


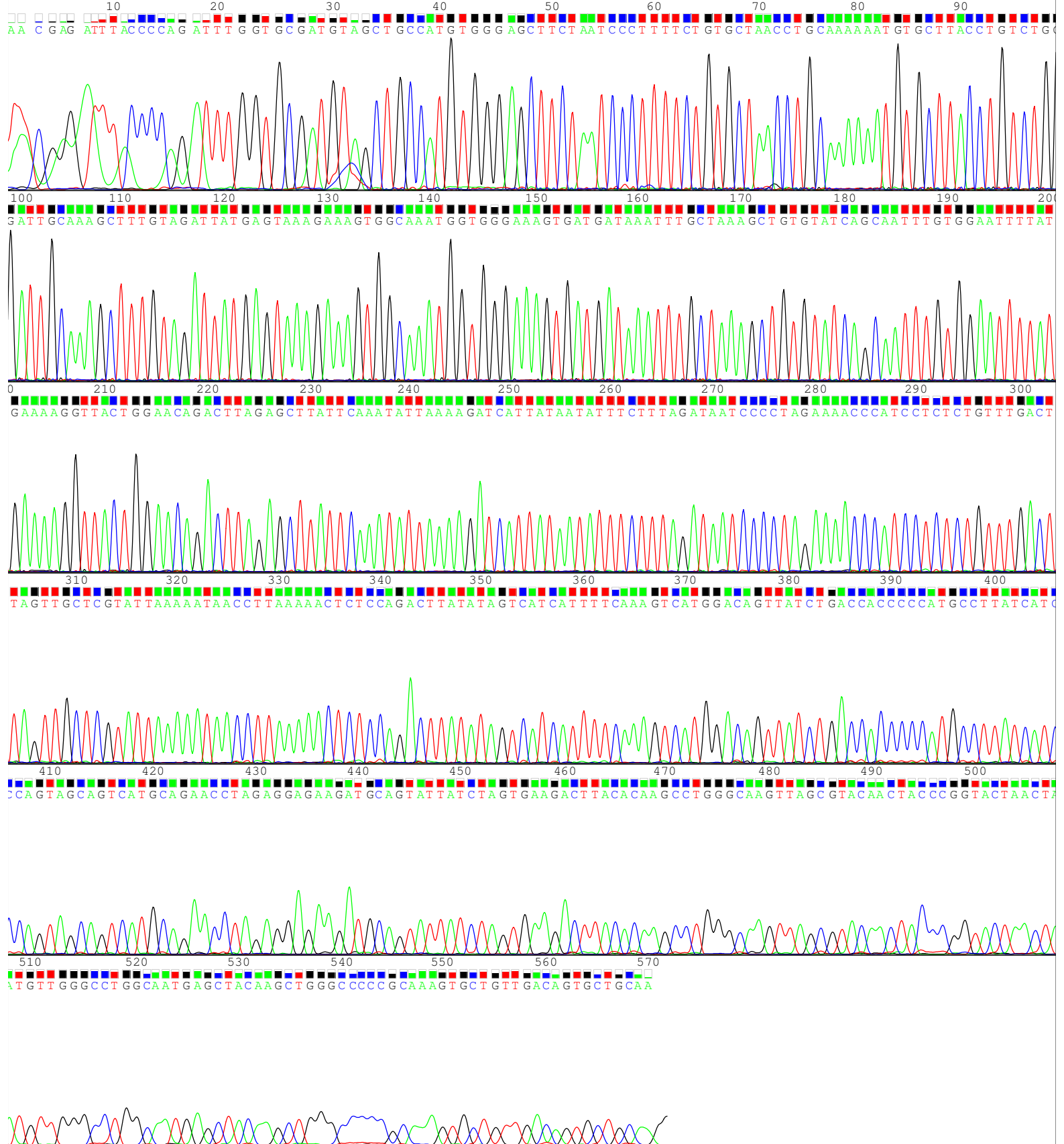
820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 9
C C T G A A C T G G T T C C G G G G A T G G G C G T A C T A A A G C G C G G G G T T T C A G T G G T T C C A G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A G A A G C T G C T T T C A C T G A A G T T C T T C G A G C

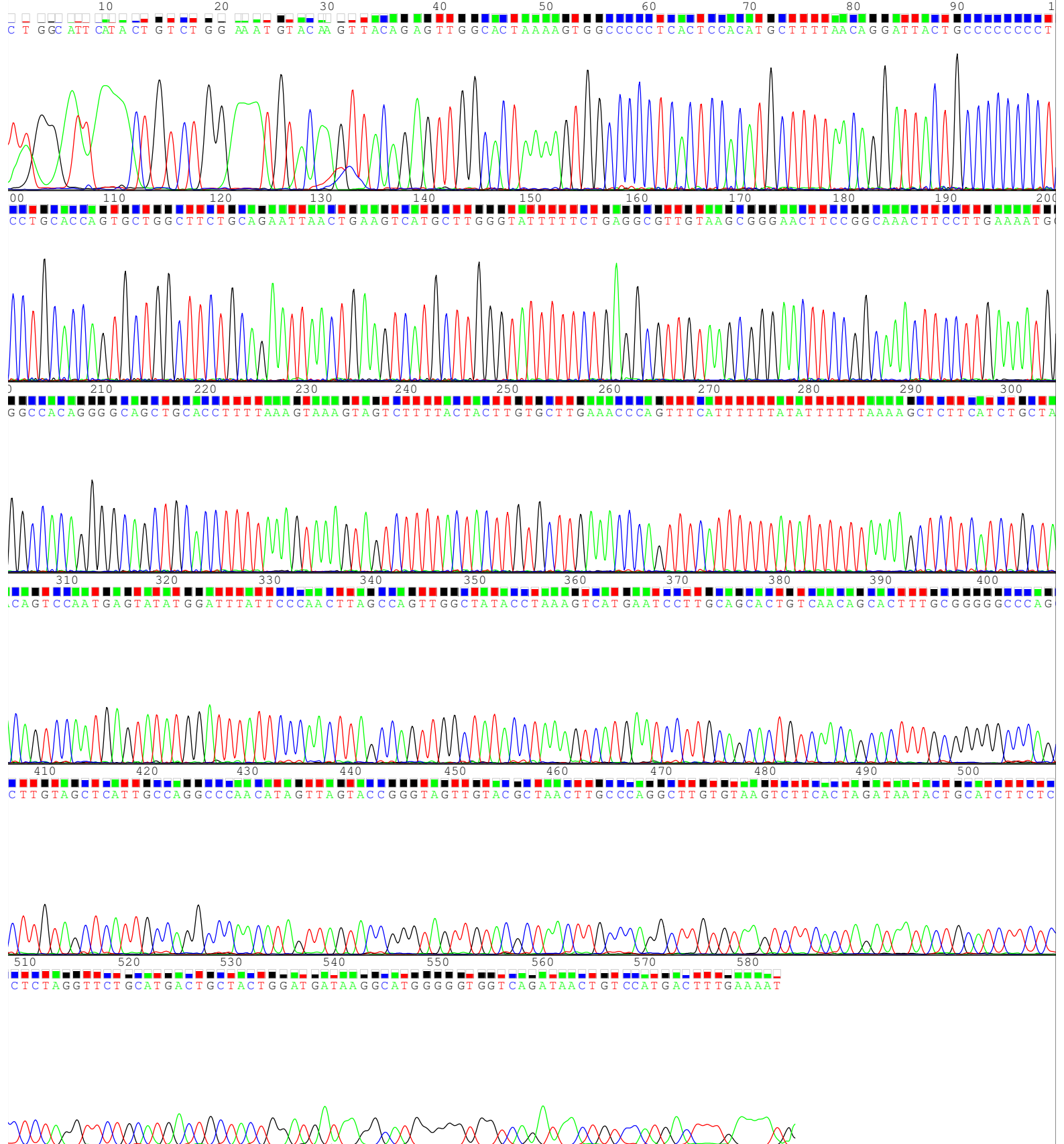


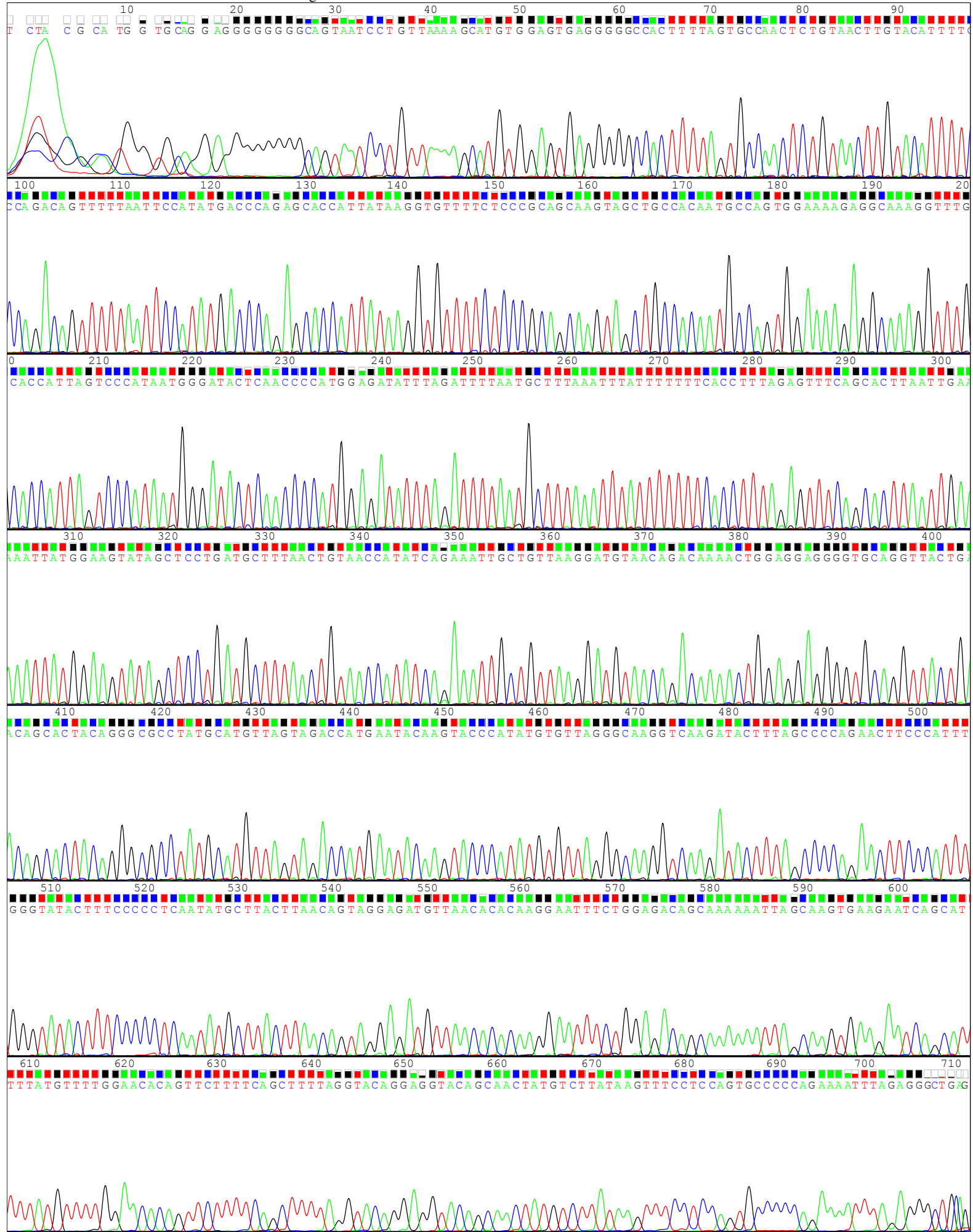
920 930 940 950 960 970 980 990
T T T C C C C C C C C T G C T G C T G A A C T G G G G C T T G A C A T T G G G G G G G T T G G G A G T G G G G G G G G G A G C C T C T C C C A

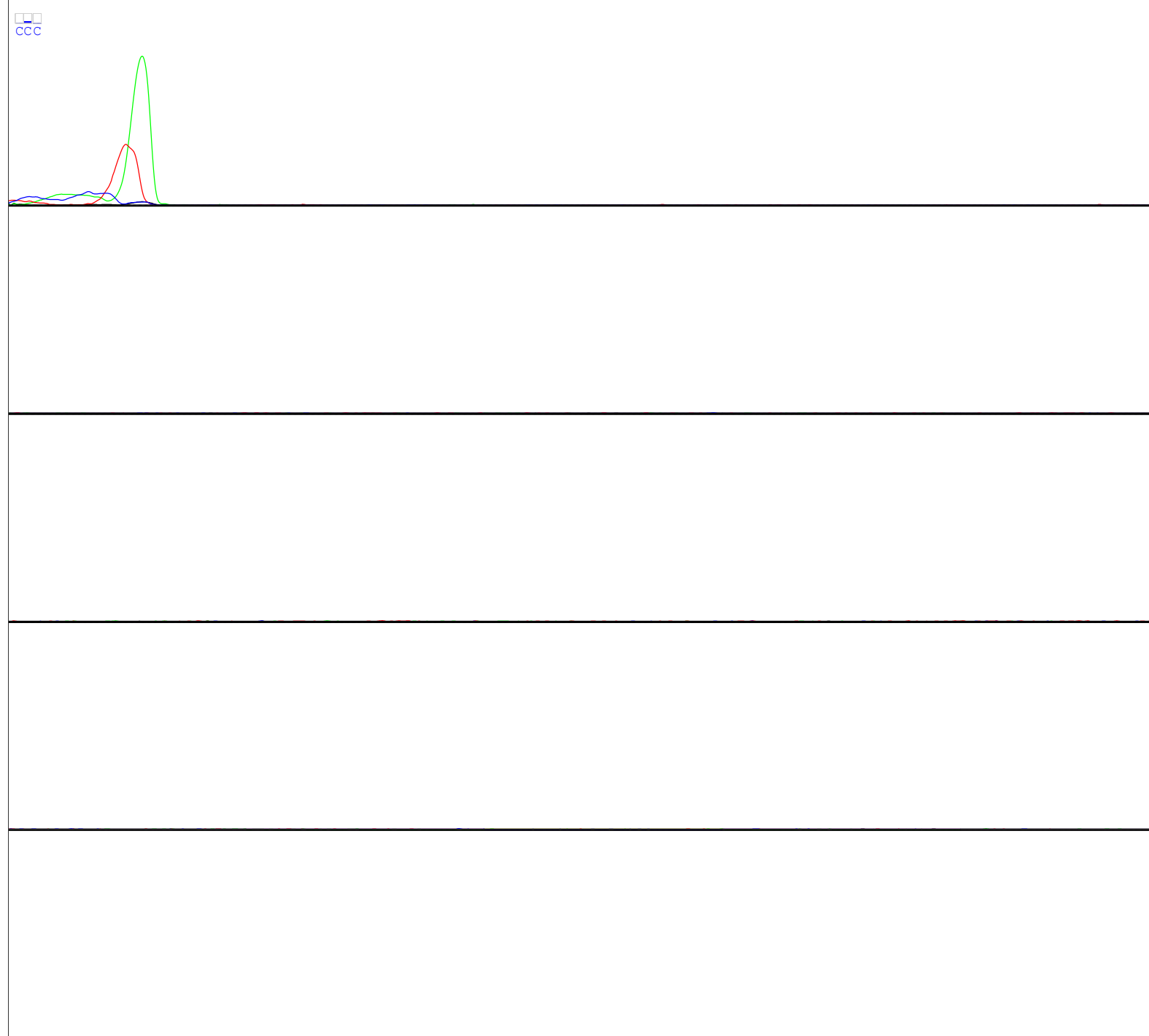


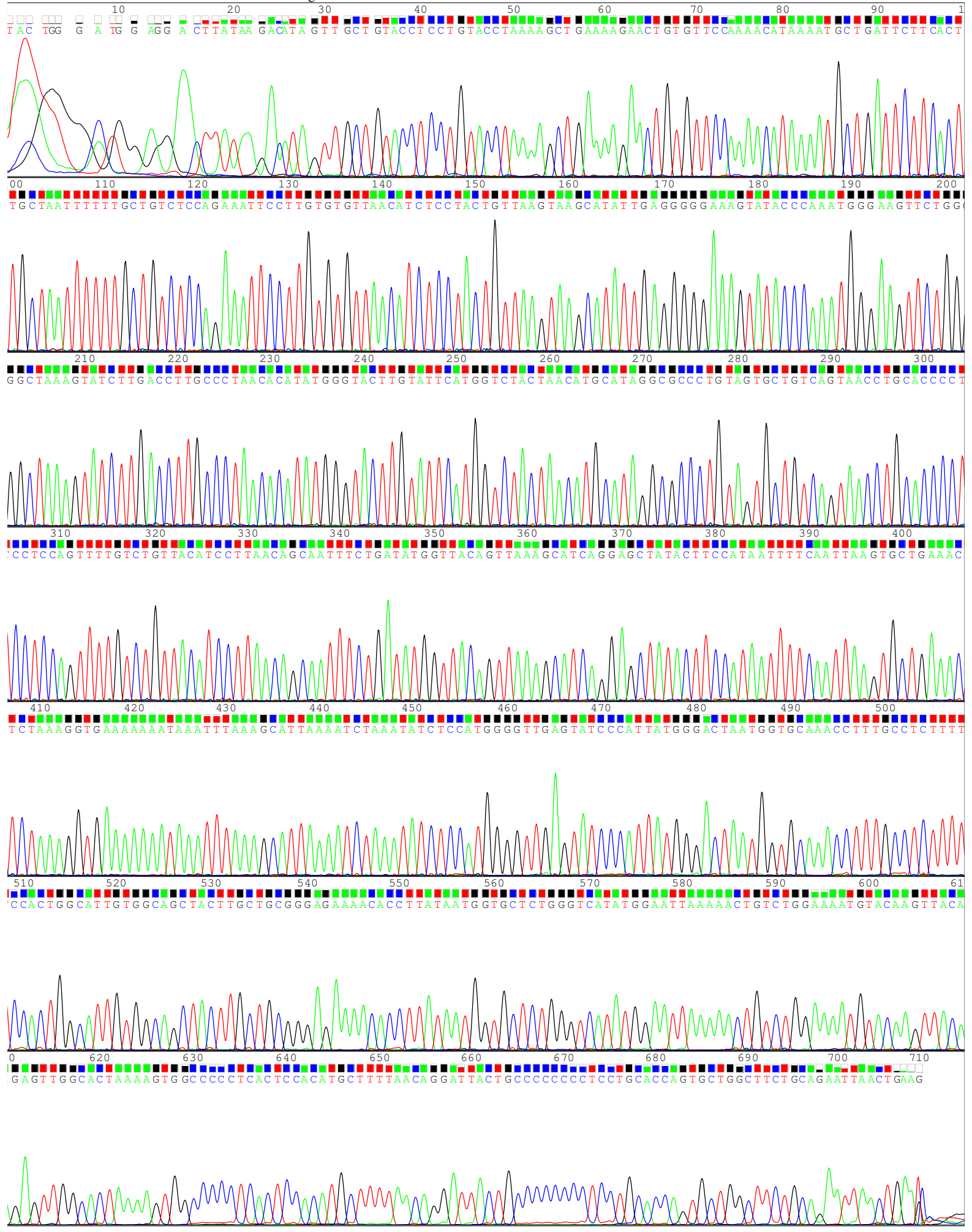














Prilog 2.

Nukleotidne sekvence B19 pozitivnih izolata

Prilog 2: Nukleotidne sekvence B19 pozitivnih izolata

Uzorak RS-B1/M1

Uspešno sekvenciran segment genoma: **380-5311 bp**

#RSB1_SERBIA_09

TTTTAGCGGGCTTTTnnCCCGCGGTATGCAAATGGGCAGCCATTTTAAAGTGTTAACTATAATTTTATTGGTT
AGTTTTGTAACGGTTAAAATGGGCGGAGCGTAGGCGGGGACTACAGTATATATAGCACGGCGCTGCCGCAGCT
CTTTCTTTCTGGGCTGCTTTTTCCTGGACTTCTTGTGCTTTTTTGTGAGCTAACTAACAGGTATTTATACTAC
TTGTTAACATACTAACATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAGTTTCTTCTAATGTTCTGGACTGTGCTAAC
GATAACTGGTGGTGCTCTTTACTGGATTTAGACACCTCTGACTGGGAACCTAACTCATACTAACAGACTAA
WGGCAATATACTTAAGCAGTGTGGCYTCTAAGCTTGACTTTACCGGGGGCCACTAGCAGGGTGTGTACTT
TTTTCAAGTAGAATGTAACAAATTTGAAGAAGGCTATCATATTCATGTGGTTATTGGGGGGCCAGGGTTAAA
CCCCAGAAATCTAACAGTGTGTGTAGAGGGGTATTTAACAATGTACTTTATCACCTTGTAAGTGGAAATGTA
AAGCTAAAATTTTTGCCAGGAATGACTACAAAAGGCAAATACTTTAGAGATGGAGAGCAGTTTATAGAAAAC
TATTTAATGAAAAAATACCTTTAAATGTTGTATGGTGTGTTACTAATATTGATGGATATATAGATACCTGT
ATTTCTGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGCCATGCCAAAAACCCCGCATGACCACAGCTATAAATGATACTA
GTAGTGATGCTGGGGAGCCTAGCGGCACAGGGGAGTGGTGTGCCATTTAATGAAAAGGAACTAAGGCTAG
CATAAAGTTTTAGACTATGGTAACTGGTGTGTGAAAATAGAGTGTTCACAGAGGATAAGTGGAAACTAGT
TGACTTTAACCAGTACACTTTACTAAGCAGTAGTCACAGTGGAAAGTTTCAAATTCAAAGTGCCTAAAATA
GCAATTTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACTAGCACATTTTACTGCATGCAGACTTTGAGCAGGTTATGT
GTATTAAGACAATAAAAATGTTAAATGTTACTTTGTCAAACTATGACCCCTATTGGTGGGGCAGCATGT
GTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTATGGGCCCGCAAGTACAGGAAA
AACAACTTGGAATGGCCATTGCTAAAAGTGTTCAGTATATGGCATGGTTAACTGGAATAATGAAAATTT
CCATTTAATGATGTGGCAGGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGGTATTATTAAGTCCACAATTGTAGAA
GCTGCAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCTACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGTGGAAGTGTAGCTGTGCCCTG
GAGTACCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTGTGTAAGCGGGAACACTACAACAAGTGTACA
TGCTAAAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAAGTAAAATTTACTGTAAGATGCAGCCCTGACATGGGGTTACTA
ACAGAGGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGAATGCACAAAGCTGGGACCACTATGAAAATGGGCAA
TAACTACACTTTTGATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCAAACCACCCCAATTGTC
ACAGACACCAGTATCAGCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAGCTCAGTGAAGCAGCTTTTTTAACCTCA
TCACCCAGGCGCTGGAACACTGAAACCCCGCGCTCTAGTACGCCCATCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCA
CTTGTGGAAGCCAGTTTCCCTCCGAAGTGTAGCTGCATCGTGGGAAGAAGCCTTCTACACACCTTTGGCAG
ACCAGTTTCGTGAAGTGTAGTTGGGGTTGATTATGTGTGGGACGGTGAAGGGTTTTACCGGTGTGTGTGT
TCAGCATATTAACAATAGTGGGGGAGGCTTGGGACTTTGTCCCATTCATTAATGTAGGGGCTTGGTATAAT
GGATGGAATTTTCGAGAATTTACCCAGATTTGGTGGGCTGTAGTGCATGTGGGAGCTTCTAATCCCTTTT
CTGTGCTAACCTGCAAAAAATGTGCTTACCTATCTGGATTGCAAAGCTTTGTAGATTATGAGTAAAGAAAGT
GCAAATGGTGGGAAGTGTGATAAAATTTGCTAAAGCTGTGTATCAGCAATTTGTGGAATTTTATGAAAAGC
TTACTGGAACAGACTTAGAGCTTATTCAAATATTTAAAAGATCATTACAATATTTCTTTAGATAATCCCTAGA
AAACCCATCCTCTCTGTTTACTTAGTTGCTCGTATTTAAAATAACCTTAAAAACTCTCCAGACTTATATAGT
CATCATTTTCAAAGTCATGGACAGTTATCTGACCACCCCATGCCTTATCATCCAGTAACAGTCATGCAGAAC
CTAGAGGAGAAAATGCAGTATTATCTAGTGAAGACTTACACAAGCCTGGGCAAGTTAGCGTACAACCTACCCGG
TACTAACTATGTTGGGCTGGCAATGAGCTACAAGCTGGGCCCCGCAAAGTGTGTTGACAGTGTGCAAGG
ATTCATGACTTTAGGTATAGCCAAGTGGCTAAGTTGGGAATAAAATCCATATACTCATTGGACTGTAGCAGATG
AAGAGCTTTTAAAAAATATAAAAAATGAACTGGGTTTCAAGCACAAGTAGTAAAAGACTACTTTACTTTAA
AAGGTGCAGCTGCCCTGTGGCCATTTTCAAGGAAGTTTCCCGAAGTTCCCGCTTACAACGCCTCAGAAAA
ATACCCAAGCATGACTTCAAGTTAATCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAATCCTGTT
AAAAGCATGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTACTGCAATTTCTGTAAGTGTACATTTTCCAGACAGTTTTTAA
TTCCATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCGGCAGCAAGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAA
GGAAGCAAAGTTTGCACCATTAGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAAATGCT
TTAAATTTGTTTTTTTACCTTTAGAGTTTTCAGCATTTAATTTGAAAATATGGAAGTATAGCTCCTGATGCTT
TAACTGTAACCATATCAGAAATTTGCTATTAAGGATGTTACAGACAAAATGGAGGGGGAGTACAAGTTACTG
ACAGCACTACCGGGCGCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCA
GGATACTTTAGCCCCAGAATTTCTATTTGGGTATACTTTCCCTCAATATGCTTACTTGCAGTAGGAGAT
ATTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTTAGCAAGTGAAGAATCAGCATTTTATGTTTTGGAA
CACAGTTCTTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGCACAGCAACTATGTCTATAAGTTTCTCCAGTGCCTCCAG
AAAATTTAGAGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTATAATCCCTTATACGGATCTCGCTTAGGGG
TCCCTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGACCATGCAATTCAGCCCCAAAA
CTTTATGCCAGGGCCACTAGTAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGGAGACAGCTCTAGTACTGGAGCTGAAAA

GCCTTAACAGGCCTTAGCACAGGTACCTCCCAGAACACTAGAATATCCTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCC
ATATCACCAGTGGGACACAGATAAATATGTCACAGGAATAAATGCCATTTCTCATGGTCAGACCACATATGGT
AATGCTGAAGATAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCCAAATGAAAAAGAAGCAGCTAAAACAGTTA
CAGGGTTTTAAACATGCACACCTATTTTCCCAATAAAGGAACCCAGCAATATACAGATCAAATGAGCGCCCC
TAATGGTGGGCTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTTACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAATTTCCAAATTT
AGATGACAGTTTTAAAACCTCAGTTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTGCATCAGCCACCCCTCAAATATTT
TTaATAATATTACCACAAAGTGGGCCATTGGAGGTATTAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTCAGTATG
CCGTGGGAATTATGACAGTAACGATGACATTTAAATGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGAATCCTCA
ACCTGGAGTATATCCCCGCACGCAGCAGGTCATTTACCATATGACTATATGACCCACAGCTACAGACGCA
AAACAACACCACAGACATGGATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTGT
AAACTCCCACCGTGCCCTCAGCCAGGATGCGTAACTAAACGCCACCAGTACCACCAGACTGTACCTGCC
CCCTCCTGTACCTATAAGACAGCCTAACACAAAAGATATAGACAATGTAGAATTTAAGTACTTAACTAGATAT
GAACAACATGTTATTAGAATGTTAAGATTGTGTAATATGTATCAAAATTTAGAAAAATAAACATTTGTTGTG
GTTAAAAAATTATGTTGTGGCGCTTTAAAAGTTTAAAAGAAGACACCAAATCAGATGCCGCCGGTCGCCGCCG
GTAGGCGGGACTTCCGGTACAAGATGGCGGACAATTGCGTCACTTCTGTGA

Uzorak RS-M2:

Uspešno sekvenciran segment genoma: **1234-2109 bp**

#RSM2_SERBIA_10

GGGACGGCAACTAAGGCTAGCATAAAAGTTTCAAACCTATGGTAACTGGTTGTGTGAAAACAGAGTATTTACA
GAGGATAAGTGGAACTAGTTGACTTTAACCAGTACACTTTACTAAGCACCATTACAGTGGAAAGTTTTCAA
TTCAAAGTGCCTAAAATTAGTAATTTATAAAGCAACTAATTTACTGCCTACTAGCACTTTTTTATTGCATAC
AGACTTTGAGCAGGTTATGTGTATTAAGACAATAAAATTTGTTAAATTTGTTACTTTGTCAAAACTATGACCC
TTATTGGTGGGGCAACATGTGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTAT
GGGCCGCCAAGTACAGGGAAAAACAACCTTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTTCAGTATATGGCATGGTTA
ACTGGAATAATGAAAACCTTTCCATTTAATGATGTAGCAGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGGTATTA
TTAAGTCTACAATTGTAGAAGCTGCAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCCACCAGGGTAGATCAAAAAATGCC
TGGAAGTGTAGCTGTGCCTGGAGTACCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTGTGTAAAGCGG
AACACTACAACAACCTGTACATGCTAAAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAGTTAACTTTACTGTAAGATGG
AGCCCTGACATGGGGTTACTAACAGAGGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGAATGCACAAAGCTGGG
ACCCTATGAAAACCTGGGCAATAAACTACACTTTTGTATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGA
CCTC

Uzorak RS-4

Uspešno sekvenciran segment genoma: **380 - 5226 bp**

#RS4_SERBIA_11

TTTTAGCGGGCTTTTTTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGCCATTTTAGGTGTTTTACTATAATTTTATTGGTC
AGTTTTGTAAACGGTTAAAATGGGCGGAGCGTAGGTGGGGACTACAGTATATATAGCACAGCACTGCCGCAGCT
CTTTCTTTTTGGGCTGCTTTTTCTGGACTTTCTTGTGTTTTCTGTGAGCTAACTAACAGGTATTTATACTAC
TTGTTAACATACTAACATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAGGTTTCTTCTAATGTTCTGGACTGCGCTAAC
GATAACTGGTGGTGTCTTTACTGGATTTAGACACTTCTGACTGGGAACCACTAACTCATACTAACAGACTAA
TGGCAATATACTTAAGCAGTGTGGCCTCTAAGCTTACTTTACCGGGGGGCCACTAGCAGGGTGTGTACTTT
TTTTCAGGTAGAATGTAACAAATTTGAAGAAGGCTATCATATTCATGTGGTTATTGGGGGGCCAGGGTTAAA
CCCCAGAAACCTCACAGTGTGTAGAGGGGTTATTTAATAATGTACTTTATCACCTTGTAACTGAAAATGTA
AAGCTAAAATTTTTGCCAGGAATGACTACAAAAGGCAAATACTTTAGAGATGGAGAACAGTTTTATAGAAAAC
TATTTAATGAAAAAATACCTTTGAATGTTGTATGGTGTGTTACTAATATTGATGGATATATAGATACCTGT
ATTTCTGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGGCATGCCAAGAAACCCCGCATTACTACAGCCATAAATGACACTA
GTAGTGATGCTGGGGAGTCTAGCGGCACAGGGGAGAGTTGTGCCATTTAATGGGAAGGGAACCTAAGGCTA
GCATAAAGTTTCAAACCTATGGTAACTGGTTGTGTGAAAACAGAGTATTTACAGAGGATAAGTGGAAAACCTAG
TTGACTTTAACAGTACACTTTACTAAGCAGCAGTACAGTGGAAAGTTTTCAAATTCAAAAGTGCCTAAAACCT
AGCAATTTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACTAGCACATTTTTATTGCATACAGACTTTGAGCAGGTTATG
TGTATTAAGACAATAAAATTTGTTAAATTTGTTACTTTGTCAAAACTATGACCCCTATTGGTGGGGCAACATG
TGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTATGGGCCGCCAAGTACAGGGA
AAACAACCTTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTTCAGTATATGGCATGGTTAACTGGAATAATGAAAACCT
TTCCATTTAATGATGTAGCAGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGGTATTTAAGTCTACAATTGTAG
AAGCTGCAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCCACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGTGGAAAGTGTAGCTGTGCC
TGGAGTACCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTGTGTAAAGCGGGAACACTACAACAACCTGTA
CATGCTAAAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAGTTAACTTTACTGTAAGATGCAGCCCTGACATGGGGTTAC

TAACAGAGGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGTAAATGCACAAAGCTGGGACCACTATGAAAACCTGGGC
AATAAACTACACTTTTTGATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCCAAACCACCCCAATTG
TCACAGACACCAGTATCAGCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGCTTTTTTAACT
CATCACCCAGGCGCTGGAACACTGAAACCCCGCTCTAGTACGCCATCCCCGGGACCACTTACAGGAGAAT
CATCTGTCGGAAGCCAGTTTCCCTCCGAAGTTGTAGCTGCATCCTGGGAAGAGGCCTTCTACACACCTTTGGCA
GACCAGTTTCGTGAAGTGTAGTTGGGGTTGATTATGTGTGGGACGGTGAAGGGTTTACCTGTGTGTGTG
TGCAACATATTAACAATAGTGGGGGAGGCTTGGGACTTTGTCCCATTCATTAAATGTAGGGGCTTGGTATAA
TGGATGGAAATTTCCGAGAATTTACCCAGATTTGGTGGCATGTAGCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATCCCTTT
TCTGTGCTAACCTGCAAAAATGTGCTTACCTGTCTGGATTGCAAAGCTTTGTAGATTATGAGTAAAGAAAGT
GGCAAATGGTGGGAAAAGTGTATGATAAATTTGCTAAAGCTGTGTATCAGCAATTTGTGGAATTTTATGAAAAG
GTTACTGGAACAGACTTAGAGCTTATTCAAATATTAAGATCATTATAATATTTCTTTAGATAATCCCCTAG
AAAACCCATCCTCTCTGTTTACTTAGTTGCTCGTATTAATAAATAACCTTAAAAACTCTCCAGACTTATATAG
TCATCATTTTCAAAGTCATGGACAGTTATCTGACCACCCCATGCCTTATCATCCAGTAGCAGTCATGCAGAA
CCTAGAGGAGAAGATGCAGTATTATCTAGTGAAGACTTACACAAGCCTGGGCAAGTTAGCGTACAACCTACCCG
GTACTAACTATGTTGGGCCTGGCAATGAGCTACAAGCTGGGCCCCCGCAAAGTGTGTTGACAGTGTGCAAG
GATTCATGACTTTAGGTATAGCCAACCTGGCTAAGTTGGGAATAAATCCATATACTCATTGGACTGTAGCAGAT
GAAGAGCTTTTAAAAAATATAAAAAATGAACTGGGTTTCAAGCACAAGTAGTAAAAGACTACTTTACTTTA
AAAGGTGCAGCTGCCCTGTGGCCATTTTCAAGGAAGTTTCCGGAAGTTCCCGCTTACAACGCCTCAGAAA
AATACCAAGCATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAATCCTGT
TAAAAGCATGTGGAGTGAAGGGGCCACTTTTGTGCAACTCTGTAACCTGTACATTTTCCAGACAGTTTTA
ATTCATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCAAGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAA
AAGAGGCAAAGGTTTGCACCATTAGTCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAAATGC
TTTAAATTTATTTTTTACCTTTAGAGTTTACAGCACTTAAATGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGTAGCT
TTAACTGTAACCATATCAGAAATTTGCTGTTAAGGATGTAACAGACAAAACCTGGAGGAGGGGTGCAGTTACT
GACAGCACTACAGGGCGCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTC
AAGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTTAAACAGTAGGAGA
TGTTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAATTTAGCAAGTGAAGAATCAGCATTATGTTTTGGGA
ACACAGTTCTTTTACGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCTCCAGTGGCCCCA
GAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATACGGATCCCGCTTAGGGGTTT
CTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGACCATGCAATTCAGCCCCAAAACCTT
CATGCCAGGGCCACTAGTAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACAGCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCC
TTAACAGGCCTTAGTACAGGTACCTCTCAAAACACTAGAATATCCTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCCGT
ACCACCACTGGGACACAGATAAATATGTCACTGGAATAAATGCCATTTCTCATGGTCAAACCACTTATGGTAA
CGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCAAATGAAAAGAACAGCTAAAACAGTTACA
GGGTTTTAACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGGAACCCAGCAATATACAGATCAAATGAGCGCCCCCTA
ATGGTGGGTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTTACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAATTTCAAATTTGG
ATGACAGTTTTTAAACTCAGTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAATATTTTT
AAAAATATTACCACAAAGTGGGCCAATTGGAGGTATTAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTCAGTATGCT
GTGGGAATTATGACAGTAACCATGACATTTAAATTTGGGTCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGAAATCCTCAAC
CTGGAGTATATCCCCGCACGCAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAA
ACAACACCACAGACATGGATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTGTAA
ACACTCCCCACCGTCCCTCAGCCAGGATGCGTAACTAAACGCCACCAGTACCACCAGACTGTACCTGCCCC
CTCCTATACCTATAAGACAGCCTAACACAAAAGATATAGACAATGTAGAATTTAAGTACTTAAACCAGATATGA
ACAACATGTTATTAGAATGTTAAGATTGTGTAATATGTATCAAATTTAGAAAATAAACATTTGTTGTGGC
TAAAAAATTATGTTGTTGCGCTTTAAAAATTTAAAAGA

Uzorak RS-7

Uspešno sekvenciran segment genoma: **1224-2106**

#RS7_SERBIA_11

GCCATTTAATGGGAAGGGAACCTAAGGCTAGCATAAAGTTTCAAACCTATGGTAAACTGGTTGTGTGAAAACAG
AGTATTTACAGAGGATAAGTGGAACTAGTTGACTTTAACCACTACACTTTACTAAGCAGCAGTCACAGTGGAA
AGTTTTCAAATTCAAAGTGCCTAAAACCTAGCAATTTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACTAGCACATTTT
TATTGCATACAGACTTTGAGCAGGTTATGTGTATTAAGACAATAAAAATTTGTTAAATTTGTTACTTTGTCAAA
ACTATGACCCCTATTGGTGGGGCAACATGTGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACAC
TGTGGTTTTTATGGGCCGCAAGTACAGGAAAAACAACTTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTTCAGTATA
TGGCATGGTTAACTGGAATAATGAAAACCTTCCATTTAATGATGTAGCAGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGA
TGAAGGTATTATTAAGTCTACAATTGTAGAAGCTGCAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCCACCAGGGTAGAT
CAAAAATGCGTGGAAAGTGTAGCTGTGCCTGGAGTACCTGTGTTATAACCAGCAATGGTGCATTACTTTTGT
TTGTAAGCGGGAACACTACAACAACTGTACATGCTAAAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAGTTAACTTTAC

TGTAAGATGCAGCCCTGACATGGGGTTACTAACAGAGGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGTAAATGCA
CAAAGCTGGGACCACTATGAAAACCTGGGCAATAAACTACACTTTTGATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCC
TCCACCCAGAC

Uzorak RS-8

Uspešno sekvenciran segment genoma: **384-5226 bp**

#RS8_SERBIA_11

AGCGGGCTTTTTTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGCCATTTTAGGTGTTTTACTATAATTTTATTGGTCAGTT
TTGTAACGGTTAAAATGGGCGGAGCGTAGGCGGGGACTACAGTATATATAGCACAGCACTGCCGCAGCTCTTT
CTTTCTGGGCTGCTTTTTCTGGACTTTCTTGCTGTTTTCTGTGAGCTAACTAACAGGTATTTATACTACTTGT
TAACATACTAACATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAGGTTTCTTCTAATGTTCTGGACTGTGCTAACGATA
ACTGGTGGTGTCTTTACTGGATTTAGACACTTCTGACTGGGAACCACTAACTCATACTAACAGACTAATGGC
AATATACTTAAGCAGTGTGGCCTCTAAGCTTGACTTTACCGGGGGGCCACTAGCAGGGTGCTTGTACTTTTTT
CAGGTAGAATGTAACAAATTTGAAGAAGGCTATCATATTCATGTGGTTATTGGGGGGCCAGGGTTAAACCCCA
GAAACCTCACAGTGTGTGTAGAGGGGTTATTTAATAATGTACTTTATCACCTTGTAACGAAAATGTAAAGCT
AAAATTTTTGCCAGGAATGACTACAAAAGGCAAATACTTTAGAGATGGAGAACAGTTTATAGAAAACATTTT
AATGAAAAAATACTTTGAATGTTGTATGGTGTGTTACTAATATTGATGGATATATAGATACCTGTATTTTC
TGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGCCATGCCAAGAAACCCCGCATTACTACAGCCATAAATGACACTAGTAGT
GATGCTGGGGAGTCTAGCGGCACAGGGGCAGATGTTCTGCCATTTAATGGGAAGGGAACCTAAGGCTAGCATAA
AGTTTCAAACCTATGGTAAACTGGTTGTGTGAAAACAGAGTATTTACAGAGGATAAGTGGAAACTAGTTGACT
TTAACAGTACACTTTACTAAGCAGCAGTCACAGTGGAAAGTTTTCAAATTCAAAAGTGCCTAAAACCTAGCAAT
TTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACTAGCACATTTTTATTGCATACAGACTTTGAGCAGGTTATGTGTATT
AAAGACAATAAGATTGTTAAATTTGTTACTTTGTCAAACCTATGACCCCTATTGGTGGGGCAACATGTGTAA
AGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTATGGGCCGCAAGTACAGGGAAAAACAA
ACTTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTCCAGTATATGGCATGGTTAACTGGAATAATGAAAACCTTTCCATT
TAATGATGTAGCAGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGTATTATTAAGTCTACAATTGTAGAAGCTGC
AAAAGCCATTTTAGCGGGCAACCCACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGTGGAAAGTGTAGCTGTGCCTGGAGTA
CCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTTGTTGTAAGCGGGAACACTACAACAACCTGTACATGCTA
AAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAGTTAACTTTACTGTAAGATGCAGCCCTGACATGGGGTTACTAACAGA
GGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGAATGCACAAAGCTGGGACCACTATGAAAACCTGGGCAATAAAC
TACACTTTTGATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCCAAACCACCCCAATTTGCACAGA
CACCAGTATCAGCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAAGCTCAGTGAAAGCAGCTTTTTTAACCTCATCACC
CCAGGCGCCTGGAACACTGAAACCCCGCCTCTAGTACGCCATCCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATCTGT
CGGAAGCCAGTTTTCTCCGAAGTTGTAGCTGCATCCTGGGAAGAGGCCTTCTACACACCTTTGGCAGACCAG
TTTTCGTGAACATGTTAGTTGGGGTTGATTATGTGTGGGACGGTGTAAAGGGTTTACCTGTGTGTTGTGTGAC
ATATTAACAAGTGGGGGAGGCTTGGGACTTTGTCCCAATTGCATTAATGTAGGGCTTGGTATAATGGATG
GAAATTTGAGAAATTTACCCAGATTTGGTGGCAGTGTAGCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATCCCTTTCTGTG
CTAACCTGCAAAAAATGTGCTTACCTGTCTGGATTGCAAGCTTTGTAGATTATGAGTAAAGAAAGTGGCAA
ATGGTGGGAAAGTATGATAAATTTGCTAAAGCTGTGTATCAGCAATTTGTGGAATTTTATGAAAAGGTTAC
TGGAACAGACTTAGAGCTTATTTCAAATATTTAAAGATCATTATAATATTTCTTTAGATAATCCCTAGAAAAC
CCATCCTCTCTGTTTACTTAGTTGCTCGTATTAATAAATAACCTTAAAAACTCTCCAGACTTATATAGTCATC
ATTTTCAAAGTCATGGACAGTTATCTGACCACCCCATGCCTTATCATCCAGTAGCAGTCATGCAGAACCTAG
AGGAGAAGATGCAGTATTATCTAGTGAAGACTTACACAAGCCTGGGCAAGTTAGCGTACAACCTACCCGGTACT
AACTATGTTGGGCTGGCAATGAGCTACAAGCTGGGCCCCGCAAAGTGTGTTGACAGTGTGCAAGGATTC
ATGACTTTAGGTATAGCCAACCTGGCTAAGTTGGGAATAAATCCATATACTCATTGGACTGTAGCAGATGAAGA
GCTTTTTAAAAAATATAAAAAATGAACTGGGTTTCAAGCACAAAGTAGTAAAAGACTACTTTACTTTAAAAGG
TGCAGCTGCCCTGTGGCCATTTTCAAGGAAGTTTCCCGAAGTTCCCGCTTACAACGCCTCAGAAAAATACC
CAAGCATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGCGAGTAATCCTGTTAAAAG
CATGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTAGTGCCAACCTCTGTAACCTGTACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCCA
TATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCAAGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAAAGAGG
CAAAGGTTTGCACCATTAGTCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCTTTAAA
TTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTCCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGATGCTTTAACT
GTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTAACAGACAAAACCTGGAGGAGGGGTGCAGGTTACTGACAGC
ACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAAGATA
CTTTAGCCCCAGAACTTCCATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTTAACAGTAGGAGATGTTAA
CACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTAGCAAGTGAAGAATCAGCATTATGTTTTGGAACACAG
TTCTTTTTCAGTTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCTCCAGTGGCCCCAGAAAAT
TTAGAGGGTCTCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATACGGATCCCGCTTAGGGGTTCTGACA
CATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGACCATGCAATTCAGCCCCAAAACCTTCATGCC

AGGGCCACTAGTAAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACAGCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTAACA
GGCCTTAGTACAGGTACCTCTCAAACACTAGAATATCCTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCCGTACCACCA
CTGGGACACAGATAAATATGTCACTGGAATAAATGCCATTTCTCATGGTCAAACCACTTATGGTAAACGCTGAA
GACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAACAGTTACAGGGTTTA
AACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGGAACCCAGCAATATACAGATCAAATTTAGCGCCCCCTAATGGTGG
GTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTTCACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAATTTCCAAATTTGGATGACAG
TTTTAAACTCAGTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAATATTTTTAAAAATA
TTACCACAAAGTGGGCCAATTGGAGGAATTAATCAATGGGAATTACTIONACTTACCTTAGTTCAGTATGCTGTGGGAA
TTATGTCAGTAACCATGACATTTAAATTTGGGTCCCCGTAAGCTACGGGACGGTGGAACTCCTCAACCTGGAGT
ATATCCCCCGCACGCAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAAAACAACAC
CACAGACATGGATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTGTAAACACTCC
CCACCGTGCCTCAGCCAGGATGCGTAACTAAACGCCACCAGTACCACCCAGACTGTACCTGCCCTCCTAT
ACCTATAAGACAGCCTAACACAAAAGATATAGACAATGTAGAATTTAAGTACTTAACCAGATATGAACAGCA
TGTTATTAGAATGTTAAGATTGTGTAATATGTATCAAATTTAGAAAAATAAACATTTGTTGTGGTTAAAAA
ATTATGTTGTTGCGCTTTAAAAATTTAAAnGA

Uzorak RS-9:

Uspešno sekvenciran segment genoma: **384 – 5226 bp**

#RS9_SERBIA_11

AGCGGGCTTTTTTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGCCATTTTAGGTGTTTTACTATAATTTTATTGGTCAGTT
TTGTAACGGTTAAAATGGGCGGAGCGTAGGCGGGGACTACAGTATATATAGCACAGCACTGCCGCAGCTCTT
CTTTCTGGGCTGCTTTTTCTGGACTTTCTTGTGCTTTTTCTGTGAGCTAACTAACAGGTATTTATACTACTTGT
TAACATACTAACATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAGGTTTCTTCTAATGTTCTGGACTGTGCTAACGATA
ACTGGTGGTGTCTTTACTGGATTTAGACACTTCTGACTGGGAACCACTAACTCATACTAACAGACTAATGGC
AATATACTTAAGCAGTGTGGCCTCTAAGCTTGACTTTACCGGGGGGCCACTAGCAGGGTGCTTGTACTTTTTT
CAGGTAGAATGTAACAAATTTGAAGAAGGCTATCATATTCATGTGGTTATTGGGGGGCCAGGGTTAAACCCCA
GAAACCTCACAGTGTGTGTAGAGGGGTTATTTAATAATGTACTTTATCACCTTGTAAGTAAAATGTAAGCT
AAAATTTTTGCCAGGAATGACTACAAAAGGCAATACTTTAGAGATGGAGAACAGTTTATAGAAAACATTTT
AATGAAAAAATACTTTGAATGTTGTATGGTGTGTTACTAATATTGATGGATATATAGATACCTGTATTTT
TGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGCCATGCCAAGAAACCCCGCATTACTACAGCCATAAATGACACTAGTAGT
GATGCTGGGAGTCTAGCGGCACAGGGGCAGAGGTTGTGCCATTTAATGGGAAGGGAECTAAGGCTAGCATA
AAGTTTCAAACACTATGGTAACCTGGTTGTGTGAAAACAGAGTATTTACAGAGGATAAGTGGAAACTAGTTGAC
TTTAACCACTACTTTACTAAGCAGCAGTACAGAGTGGAAAGTTTCAAATTCAAAGTGCATAAAAACACTAGCAA
TTTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACTAGCAGATTTTATTGATACAGACTTTTGAGCAGTTTATGTGTAT
TAAAGACAATAAAATTTGTTAAATTTACTTTGTCAAACACTATGACCCCTATTGGTGGGGCAACATGTGTTA
AAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTATGGGCCCGCAAGTACAGGGAAAAACA
AACTTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTTCAGTATATGGCATGGTTAACTGGAATAATGAAAACCTTCCAT
TTAATGATGTAGCAGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGGTATTATTAAGTCTACAATTGTAGAAGCTG
CAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCCACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGTGGAAAGTGTAGCTGTGCCTGGAGT
ACCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTGTGTAAGCGGGAACACTACAACAACCTGTACATGCT
AAAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAGTTAAACTTTACTGTAAGATGCAGCCCTGACATGGGGTTACTAACAG
AGGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGAATGCACAAAAGCTGGGACCACTATGAAAACCTGGGCAATAAA
CTACACTTTTGATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCCAAACCACCCCAATTGTCACAG
ACACCAGTATCAGCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAAGTCAAGTGAAGCAGCTTTTTTAACTCATCAC
CCCAGGCGCTGGAACACTGAAACCCCGCGCTCTAGTACGCCATCCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCATCTG
TCGGAAGCCCAGTTTCCCTCCGAAGTTGTAGCTGCATCCTGGGAAGAGGCCTTCTACACACCTTTGGCAGACCA
GTTTTCGTGAAGTGTAGTTGGGGTTGATTATGTGTGGGACGGTGAAGGGGTTTACCTGTGTGTGTGTGCAA
CATATTAACAATAGTGGGGGAGGCTTGGGACTTTGTCCCATTGCATTAATGTAGGGGCTTGGTATAATGGAT
GGAAATTTGAGAATTTACCCAGATTTGGTGCATGTAGCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATCCCTTTTCTGT
GCTAACCTGCAAAAAATGTGCTTACCTGTCTGGATTGCAAAGCTTTGTAGATTATGAGTAAAGAAAGTGGCAA
ATGGTGGGAAAGTATGATAAATTTGCTAAAGCTGTGTATCAGCAATTTGTGGAATTTTATGAAAAGGTTAC
TGGAACAGACTTAGAGCTTATTCAAATATTAAGATCATTATAATATTTCTTTAGATAATCCCTAGAAAAAC
CCATCCTCTCTGTTTACTTAGTTGCTCGTATTAATAAATAACCTTAAAAACTCTCCAGACTTATATAGTCATC
ATTTTCAAAGTCATGAACAGTTATCTGACCACCCCATGCCTTATCATCCAGTAGCAGTCATGCAGAACCTAG
AGGAGAAGATGCAGTATTATCTAGTGAAGACTTACACAAGCCTGGGCAAGTTAGCGTACAACCTACCCGGTACT
AACTATGTTGGGCTGGCAATGAGCTACAAGCTGGGCCCCGCAAAGTGTGTTGACAGTGTGCAAGGATTC
ATGACTTTAGGTATAGCCAACTGGCTAAGTTGGGAATAAATCCATATACTCATTGGACTGTAGCAGATGAAGA
GCTTTTTAAAAAATATAAAAAATGAAACTGGGTTTCAAGCACAAAGTAGTAAAAGACTACTTTACTTTAAAAGG
TGCAGCTGCCCTGTGGCCATTTTCAAGGAAGTTTCCCGAAGTTCCCGCTTACAACGCCTCAGAAAAATACC

CAAGCATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAATCCTGTTAAAAAG
CATGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTGTGCAACTCTGTAACTTGTACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCCA
TATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCAAGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAAAGAGG
CAAAGGTTTGCACCATTAGTCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCTTTAAA
TTTTTTTTTTTACCTTTAGAGTTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGATGCTTTAACT
GTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTAACAGACAAAACCTGGAGGAGGGGTGCAGGTTACTGACAGC
ACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAAGATA
CTTTAGCCCCAGAACTTCCCATTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTTAACAGTAGGAGATGTTAA
CACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTAGCAAGTGAAGAATCAGCATTATGTTTTGGAACACAG
TTCTTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCTCCAGTGCCCCCAGAAAAT
TTAGAGGGCTTCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATACGGATCCCGCTTAGGGGTTCTGACA
CATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGACCATGCAATTCAGCCCCAAAACCTTCATGCC
AGGGCCACTAGTAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACAGCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTAACA
GGCCTTAGTACAGGTACCTCTCAAACACTAGAATATCCTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCCGTACCACCA
CTGGGACACAGATAAATATGTCACTGGAATAAATGCCATTTCTCATGGTCAAACCACTTATGGTAACGCTGAA
GACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAACAGTTACAGGGTTTA
AACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGGAACCCAGCAATATACAGATCAAATTCAGCGCCCCCTAATGGTGG
GTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTTCACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAAATCCAAATTTGGATGACAG
TTTTAAAACCTCAGTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAATATTTTTAAAAATA
TTACCACAAAGTGGGCAATTTGGAGGTATTAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTCAGTATGCTGTGGGAA
TTATGACAGTAACCATGACATTTAAATTTGGGTCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGAAATCCTCAACCTGGAGT
ATATCCCCCGCAGCAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAAAACAACAC
CACAGACATGGATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTGTAACACTCC
CCACCGTGCCTCAGCCAGGATGCGTAACATAACGCCACCAGTACCACCCAGACTGTACCTGCCCTCCTAT
ACCTATAAGACAGCCTAACACAAAAGATATAGACAATGTAGAATTTAAGTACTTAACAGATATGAACAGCA
TGTTATTAGAATGTTAAGATTGTGTAATATGTATCAAAATTTAGAAAAATAAACATTTGTTGTGGTTAAAAA
ATTATGTTGTTGCGCTTTAAAAATTTAAAAAGA

Uzorak RS-10A

Uspešno sekvenciran segment genoma: 380 – 5230 bp

#RS10_SERBIA_12

TTTTAGCGGGCTTTTTTCCCGCCTTATGCAAAATGGGCAGCCATTTTAGGTGTTTTACTATAATTTTATTGGTC
AGTTTTGTAAACGGTTAAAATGGGCGGAGCGTAGGCGGGGACTACAGTATATATAGCACAGCACTGCCGCAGCT
TTTTCTTTCTGGGCTGCTTTTTCTGGACTTTCTTGTGTTTTCTGTGAGCTAACTAACAGGTATTTATACTAC
TTGTTAACATACTAACATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAGGTTTCTTCTAATGTTCTGGACTGCTAAC
GATAACTGGTGGTGTCTTTTACTGGATTTAGACACTTCTGACTGGGAACCATAACTCATACTAACAGACTAA
TGGCAATATACTTAAGCAGTGTGGCCTCTAAGCTTGACTTTACCGGGGGGCCACTAGCAGGTGCTTGTACTT
TTTTCAGGTAGAATGTAACAAAATTTGAAGAAGGCTATCATATTCATGTGGTTATTGGGGGGCCAGGGTTAAA
CCCCAGAAACCTCACAGTGTGTGTAGAGGGTTATTTAATAATGTACTTTATCACCTTGTAACTGAAAATGTA
AAGCTAAAATTTTTACCAGGAATGACTACAAAAGGCAAATACTTTAGAGATGGAGAACAGTTTATAGAAAAC
TTTTAATGAAAAAATACCTTTGAATGTTGTATGGTGTGTTACTAATATTGATGGATATATAGATACCTGT
ATTTCTGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGCCATGCCAAGAAAACCCCGCATTACTACAGCCATAAATGACACTA
GTAGTGATGCTGGGGAGTCTAGCGGCACAGGGCAGAGGTTGTGCCATTTAATGGGAAGGGAACCTAAGGCTA
GCATAAAGTTTCAAACCTATGGTAACTGGTTGTGTGAAAACAGAGTATTTACAGAGGATAAGTGGAAAACCTAG
TTGACTTTAACAGTACACTTTACTAAGCAGCAGTCACAGTGGAAAGTTTTCAAATTCAAAAGTGCCTAAAACCT
AGCAATTTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACTAGCACATTTTTATTGCATACAGACTTTGAGCAGGTTATG
TGTATTAAGACAATAAAATGTTAAATGTTACTTTGTCAAACCTATGACCCCTATTGGTGGGGCAACATG
TGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTATGGGCCGCCAAGTACAGGGA
AAACAACTTTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTTCAGTATATGGCATGGTTAACTGGAATAATGAAAACCT
TTCCATTTAATGATGTAGCAGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGGTATTATTAAGTCTACAATTGTAG
AAGCTGCAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCCACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGTGGAAAGTGTAGCTGTGCC
TGGAGTACCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTGTGTAAGCGGGAACACTACAACAACCTGTA
CATGCTAAAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAGTTAACTTTACTGTAAGATGCAGCCCTGACATGGGGTTAC
TAACAGAGGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGAATGCACAAAGCTGGGACCCTATGAAAACCTGGGC
AATAAACTACACTTTTGTATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCAAACCACCCCAATTG
TCACAGACACCAGTATCAGCAGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAATCAGTGAAGCAGCTTTTTTAACTT
CATCACCCAGGCGCTGGAACACTGAAACCCCGCTCTAGTACGCCATCCCGGGACCAGTTCAGAGAAAT
CATCTGTGGAAGCCAGTTTCTCCGAAGTTGTAGCTGCATCCTGGGAAGAGGCCTTCCACACACCTTTGGCA

GACCAGTTTCGTGAACTGTTAGTTGGGGTTGATTATGTGTGGGACGGTGTAAGGGGTTTACCTGTGTGTTGTG
TGCAACATATTAACAATAGTGGGGGAGGCTTGGGACTTTGTCCCCATTGCATTAATGTAGGGGCTTGGTATAA
TGGATGGAAATTTTCGAGAATTTACCCAGATTTGGTGCATGTAGCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATCCCTTT
TCTGTGCTAACCTGCAAAAAATGTGCTTACCTGTCTGGATTGCAAAGCTTTGTAGATTATGAGTAAAGAAAGT
GGCAAATGGTGGGAAAGTGATGATAAAATTTGCTAAAGCTGTGTATCAGCAATTTGTGGAATTTTATGAAAAG
GTTACTGGAACAGACTTAGAGCTTATTCAAATATTAAGATCATTATAATATTTCTTTAGATAATCCCCTAG
AAAACCCATCCTCTCTGTTTGGACTTAGTTGCTCGTATTAATAAATAACCTTAAAAACTCTCCAGACTTATATAG
TCATCATTTTCAAAGTCATGGACAGTTATCTGACCACCCCATGCCTTATCATCCAGTAGCAGTCATGCAGAA
CCTAGAGGAGAAGATGCAGTATTATCTAGTGAAGACTTACACAAGCCTGGGCAAGTTAGCGTACAACCTACCCG
GTACTAACTATGTTGGGCCTGGCAATGAGCTACAAGCTGGGCCCCGCAAAGTGCTGTTGACAGTGCTGCAAG
GATTCATGACTTTAGGTATAGCCAACCTGGCTAAGTTGGGAATAAATCCATATACTCATTGGACTGTAGCAGAT
GAAGAGCTTTTAAAAAATATAAAAAATGAAACTGGGTTTCAAGCACAAGTAGTAAAAGACTACTTTACTTTA
AAAGGTGCAGCTGCCCTGTGGCCATTTTCAAGGAAGTTTCCCGAAGTTCCCGCTTACAACGCCTCAGAAA
AATACCCAAGCATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAATCCCTGT
TAAAAGCATGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTAGTGCCAACCTCTGTAACCTTGTACATTTTCCAGACAGTTTTA
ATTCCATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCAAGTAGCTGCCACAATGCCAGTGAA
AAGAGGCAAAGGTTTGCACCATTAGTCCATAATGGGATACTCAACCCATGGAGATATTTAGATTTTAAATGC
TTTAAATTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTTCAGCACTTAATTGAAAATTTATGGAAGTATAGCGCTGATGCT
TTAACTGTAACCATATCAGAAATTTGCTGTTAAGGATGTAACAGACAAAACCTGGAGGAGGGGTGCAGGTTACT
GACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTC
AAGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTTAAACAGTAGGAGA
TGTTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTAGCAAGTGAAGAATCAGCATTATGTTTTGGA
ACACAGTTCTTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCTCCAGTGCCCCA
GAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATACGGATCCCGCTTAGGGGTTT
CTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGACCATGCAATTCAGCCCCAAAACCT
CATGCCAGGGCCACTAGTAAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACAGCTTAATACTGGAGCTGAAAAGCC
TTAACAGGCCTTAGTACAGGTACTCTCAAACACTAGAATATCCTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCCGT
ACCACCCTGGGACACAGATAAATATGTCACTGGAATAAATGCCATTTCTCATGGTCAAACCACTTATGGTAA
CGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAAACAGTTACA
GGGTTTAAACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGGAACCCAGCAATATACAGATCAAATGAGCGCCCCCTA
ATGGTGGGTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTTCACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAATTTCCAAATTTGG
ATGACAGTTTTTAAACTCAGTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAATATTTTT
AAAAATATTACCACAAAGTGGGCCAATTTGGAGGTATTAATCAATGGGAATTAACCTTAGTTTCAAGTATGCT
GTGGGAATTTATGACAGTAACCATGACATTTAAATTTGGGTCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGAAATCCTCAAC
CTGGAGTATATCCCCGCACGCAGCAGGTCATTTACCATATGACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAA
ACAACACCACAGACATGGATATGAAAAGCCTGAAGAATTTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTGTAA
ACACTCCCCACCGTGCCCTCAGCCAGGATGCGTAACTAAACGCCACCAGTACCACCAGACTGTACCTGCCCC
CTCCTATACCTATAAGACAGCCTAACACAAAAGATATAGACAATGTAGAATTTAAGTACTTAAACCAGATATGA
ACAGCATGTTATTAGAATGTTAAGATTGTGTAATATGTATCAAAATTTAGAAAAATAAACATTTGTTGTGGT
TAAAAAATTATGTTGTTGCGCTTTAAAAATTTAAAAAGAAGAC

Uzorak RS-10B

Uspešno sekvencirani segmenti genoma: **657-2121 bp i 4526-5232 bp**

#RS11_SERBIA_12

TCTGGACTGKGCTAACGATAACTGGTGGTGCTCTTTACTGGATTTAGACWCTTCTGACTGGGAACCACTAACT
CATACTAACAGACTAATGGCAATATACTTAAAGCAGTGTGGCCTTAAGCTTGACTTTACCGGGGGGCCACTAG
CAGGGTGCTTGTACTTTTTTTCAGGTAGAATGTAACAAATTTGAAGAAGGCTATCATATTCATGTGGTTATTGG
GGGGCCAGGGTTAAACCCAGAAACCTCACAGTGTGTGTAGAGGGGTTATTTAATAATGTACTTTATCACCTT
GTAACCTGAAAATGTAAAGCTAAAAATTTTACCAGGAATGACTACAAAAGGCAAATACTTTAGAGATGGAGAA
CAGTTTATAGAAAATTTAATGAAAAAATACCTTTGAATGTTGTATGGTGTGTTACTAATATTGATGGA
TATATAGATACCTGTATTTCTGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGCCATGCCAAGAAACCCCGCATTACTACAG
CCATAAATGACACTAGTAGTGTGCTGGGGAGTCTAGCGGCACAGGGGCAGAGGTTGTGCCATTTAATGGGAA
GGGAATAAGGCTAGCATAAAGTTTCAAACATGTTAACTGGTTGTGTGAAAACAGAGTATTTACAGAGGA
TAAGTGGAAACTAGTTGACTTTAACCAGTACACTTTACTAAGCAGCAGTCACAGTGGAAAGTTTCAAATTCAA
AGTGCATAAACTAGCAATTTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACTAGCACATTTTATTGCATACAGACT
TTGAGCAGGTTATGTGTATTAAGACAATAAAATTTGTTAAATTTGTTACTTTGTCAAACCTATGACCCCTATT
GGTGGGGCAACATGTGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTATGGGCC
GCCAAGTACAGGGAAAAACAACTTTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTCCAGTATATGGCATGGTTAACTGG

AATAATGAAAAC TTTCCATTTAATGATGTAGCAGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGGTATTATTAAG
TCTACAATTGTAGAAGCTGCAAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCCACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGTGGAA
GTGTAGCTGTGCCTGGAGTACCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTGTGTAAGCGGGAACAC
TACAACAAC TGTACATGCTAAAGCCTTAAAAGAGCGCATGGTAAAGTTAACTTTACTGTAAGATGCAGCCCT
GACATGGGGTTACTAACAGAGGCTGATGTACAACAGTGGCTTACATGGTGAATGCACAAAGCTGGGACCACT
ATGAAAAC TGGGCAATAAACTACACTTTTGATTTCCCTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCCA
AACCACCCA

CCCTAATGCGTGGGTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTTCACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAAATCCAA
ATTTGGATGACAGTTTTAAAACTCAGTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAAT
ATTTTTAAAAATATTACCACAAAAGTGGGCCAATTGGAGGTATTAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTCA
GTATGCTGTGGGAATTATGACAGTAACCATGACATTTAAATTTGGGTCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGAAAT
CCTCAACCTGGAGTATATCCCCGCACGCAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGA
TGCAAAACAACACCACAGACATGGATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCA
TTGTAAACACTCCCCACCGTGCCCTCAGCCAGGATGCGTAACTAAACGCCACCAGTACCACCCAGACTGTACC
TGCCCCCTCCTATACCTATAAGACAGCCTAACACAAAAGATATAGACAATGTAGAATTTAAGTACTTAACCAG
ATATGAACAGCATGTTATTAGAATGTTAAGATTGTGTAATATGTATCAAAATTTAGAAAAATAAACATTTGT
TGTGGTTAAAAAATTATGTTGTTGCGCTTTAAAAATTTAAAAGAAGACAC

Uzorak RS-10C

Neuspešno sekvenciranje

Prilog 3.

Oznake za izolate genotipa 1 u GenBank bazi podataka korišćene u određenim analizama

Prilog 3. Oznake za izolate genotipa 1 u GenBank bazi podataka korišćene u određenim analizama.

DATA MONKEY ANALIZA
<p>616-2631 bp (kodirajuća sekvenca za NS1 protein)</p> <p>47 izolata:</p> <p>RSB1, RS4, RS8, RS9, RS10, AB030673, AB030693, AB030694, AB126263, AB126266, AB126267, AB126269, AB126262, AB126264, AB126265, AB126268, AB126270, AB126271, Z70560, Z70528, Z70599, AF113323, AJ781038, DQ408301, AY028237, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146, FN669502, FN669503, FN669504, FN669506, FN669507, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, DQ357064, DQ357065</p>
<p>2084-2308 bp (kodirajuća sekvenca za 7.5 kDa protein)</p> <p>2624-3305 bp (kodirajuća sekvenca za VP1unique)</p> <p>2874-3119 bp (kodirajuća sekvenca za protein X)</p> <p>122 izolata:</p> <p>RSB1/M1, RS4, RS8, RS9, RS10, AB030673, AB030693, AB030694, AB126263, AB126266, AB126267, AB126269, AB126262, AB126264, AB126265, AB126268, AB126270, AB126271, AF161223, AF161224, AF161225, AF161226, Z70560, Z70528, Z70599, AF113323, AJ781031, AJ781032, AJ781033, AJ781034, AJ781035, AJ781036, AJ781037, AJ781038, DQ408301, AY028237, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146, FN669502, FN669503, FN669504, FN669506, FN669507, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, DQ357064, DQ357065, JN211130, JN211125, JN211127, JN211138, JN211139, JN211154, JN211155, JN211170, JN211157, JN211167, JN211163, JN211180, JN211183, JN211185, JN211123, JN211149, JN211150, JN211151, JN211153, JN211160, JN211162, JN211129, JN211144, JN211176, JN211177, JN211181, JN211182, JN211184, JN211128, JN211131, JN211132, JN211141, JN211121, JN211143, JN211145, JN211147, JN211164, JN211161, JN211166, JN211169, JN211173, JN211179, JN211135, JN211136, JN211168, JN211148, JN211171, JN211172, JN211175, JN211178, JN211124, JN211126, JN211122, JN211133, JN211134, JN211137, JN211140, JN211142, JN211146, JN211156, JN211158, JN211152, JN211159, JN211165, JN211174</p>
<p>3305-4969bp(kodirajuća sekvenca za VP2 protein)</p> <p>48 izolata:</p> <p>RSB1, RS4, RS8, RS9, RS10, AB030673, AB030693, AB030694, AB126263, AB126266, AB126267, AB126269, AB126262, AB126264, AB126265, AB126268, AB126270, AB126271, Z70560, Z70528, Z70599, AF113323, AJ781031, AJ781032, AJ781033, AJ781034, AJ781035, AJ781036, AJ781037, AJ781038, DQ408301, AY028237, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, DQ357064, DQ357065</p>
<p>4890-5174 bp (kodirajuća sekvenca za 11 kDa protein)</p> <p>18 izolata:</p> <p>RSB1, RS4, RS8, RS9, RS10, RS11, Z70560, DQ408301, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146</p>

Prilog 3. Oznake za izolate genotipa 1 u GenBank bazi podataka korišćene u određenim analizama - nastavak

MEGA ANALIZA

Prvi segment (1234 do 2104 bp), 125 izolata:

RS-B1/M1, RS-M2, RS-4, RS-7, RS-8, RS-9, RS-10 i RS-11, AB030673, AB030693, AB030694, AB126263, AB126266, AB126267, AB126269, AB126262, AB126264, AB126265, AB126268, AB126270, AB126271, AF161223, AF161224, AF161225, AF161226, Z70560, Z70528, Z70599, AF113323, AJ781031, AJ781032, AJ781033, AJ781034, AJ781035, AJ781036, AJ781037, AJ781038, DQ408301, AY028237, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146, FN669502, FN669503, FN669504, FN669506, FN669507, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, DQ357064, DQ357065, JN211130, JN211125, JN211127, JN211138, JN211139, JN211154, JN211155, JN211170, JN211157, JN211167, JN211163, JN211180, JN211183, JN211185, JN211123, JN211149, JN211150, JN211151, JN211153, JN211160, JN211162, JN211129, JN211144, JN211176, JN211177, JN211181, JN211182, JN211184, JN211128, JN211131, JN211132, JN211141, JN211121, JN211143, JN211145, JN211147, JN211164, JN211161, JN211166, JN211169, JN211173, JN211179, JN211135, JN211136, JN211168, JN211148, JN211171, JN211172, JN211175, JN211178, JN211124, JN211126, JN211122, JN211133, JN211134, JN211137, JN211140, JN211142, JN211146, JN211156, JN211158, JN211152, JN211159, JN211165, JN211174

Drugi segment (2118 do 3110 bp), 128 izolata:

RSB1/M1, RS4, RS8, RS9, RS10, AB030673, AB030693, AB030694, AB126263, AB126266, AB126267, AB126269, AB126262, AB126264, AB126265, AB126268, AB126270, AB126271, AF161223, AF161224, AF161225, AF161226, Z70560, Z70528, Z70599, AF113323, AJ781031, AJ781032, AJ781033, AJ781034, AJ781035, AJ781036, AJ781037, AJ781038, DQ408301, AY028237, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146, FN669502, FN669503, FN669504, FN669506, FN669507, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, DQ357064, DQ357065, JN211130, JN211125, JN211127, JN211138, JN211139, JN211154, JN211155, JN211170, JN211157, JN211167, JN211163, JN211180, JN211183, JN211185, JN211123, JN211149, JN211150, JN211151, JN211153, JN211160, JN211162, JN211129, JN211144, JN211176, JN211177, JN211181, JN211182, JN211184, JN211128, JN211131, JN211132, JN211141, JN211121, JN211143, JN211145, JN211147, JN211164, JN211161, JN211166, JN211169, JN211173, JN211179, JN211135, JN211136, JN211168, JN211148, JN211171, JN211172, JN211175, JN211178, JN211124, JN211126, JN211122, JN211133, JN211134, JN211137, JN211140, JN211142, JN211146, JN211156, JN211158, JN211152, JN211159, JN211165, JN211174, FN295732, FN295733, FN295734, FN295735, FN295736, FN295737

Skoro cela cDNK, 665 do 4851 bp, 122 izolata:

RSB1/M1, RS4, RS8, RS9, RS10, AB030673, AB030693, AB030694, AB126263, AB126266, AB126267, AB126269, AB126262, AB126264, AB126265, AB126268, AB126270, AB126271, AF161223, AF161224, AF161225, AF161226, Z70560, Z70528, Z70599, AF113323, AJ781031, AJ781032, AJ781033, AJ781034, AJ781035, AJ781036, AJ781037, AJ781038, DQ408301, AY028237, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146, FN669502, FN669503, FN669504, FN669506, FN669507, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, DQ357064, DQ357065, JN211130, JN211125, JN211127, JN211138, JN211139, JN211154, JN211155, JN211170, JN211157, JN211167, JN211163, JN211180, JN211183, JN211185, JN211123, JN211149, JN211150, JN211151, JN211153, JN211160, JN211162, JN211129, JN211144, JN211176, JN211177, JN211181, JN211182, JN211184, JN211128, JN211131, JN211132, JN211141, JN211121, JN211143, JN211145, JN211147, JN211164, JN211161, JN211166, JN211169, JN211173, JN211179, JN211135, JN211136, JN211168, JN211148, JN211171, JN211172, JN211175, JN211178, JN211124, JN211126, JN211122, JN211133, JN211134, JN211137, JN211140, JN211142, JN211146, JN211156, JN211158, JN211152, JN211159, JN211165, JN211174

Prilog 3. Oznake za izolate genotipa 1 u GenBank bazi podataka korišćene u određenim analizama - nastavak

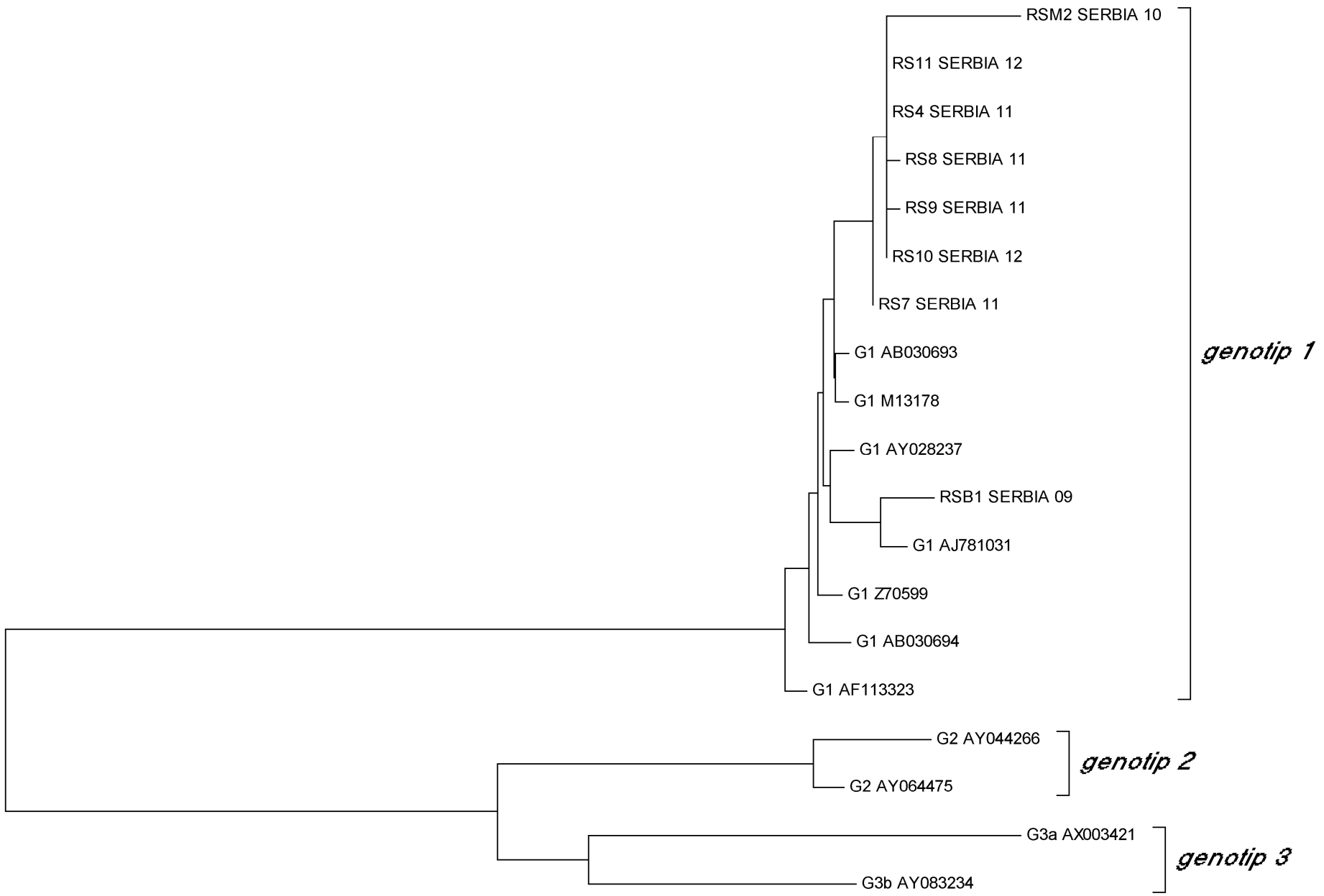
GARD i RDP4 analiza

Skoro cela cDNK, 665 do 4851 bp, 122 izolata – za GARD i RDP4 analizu:

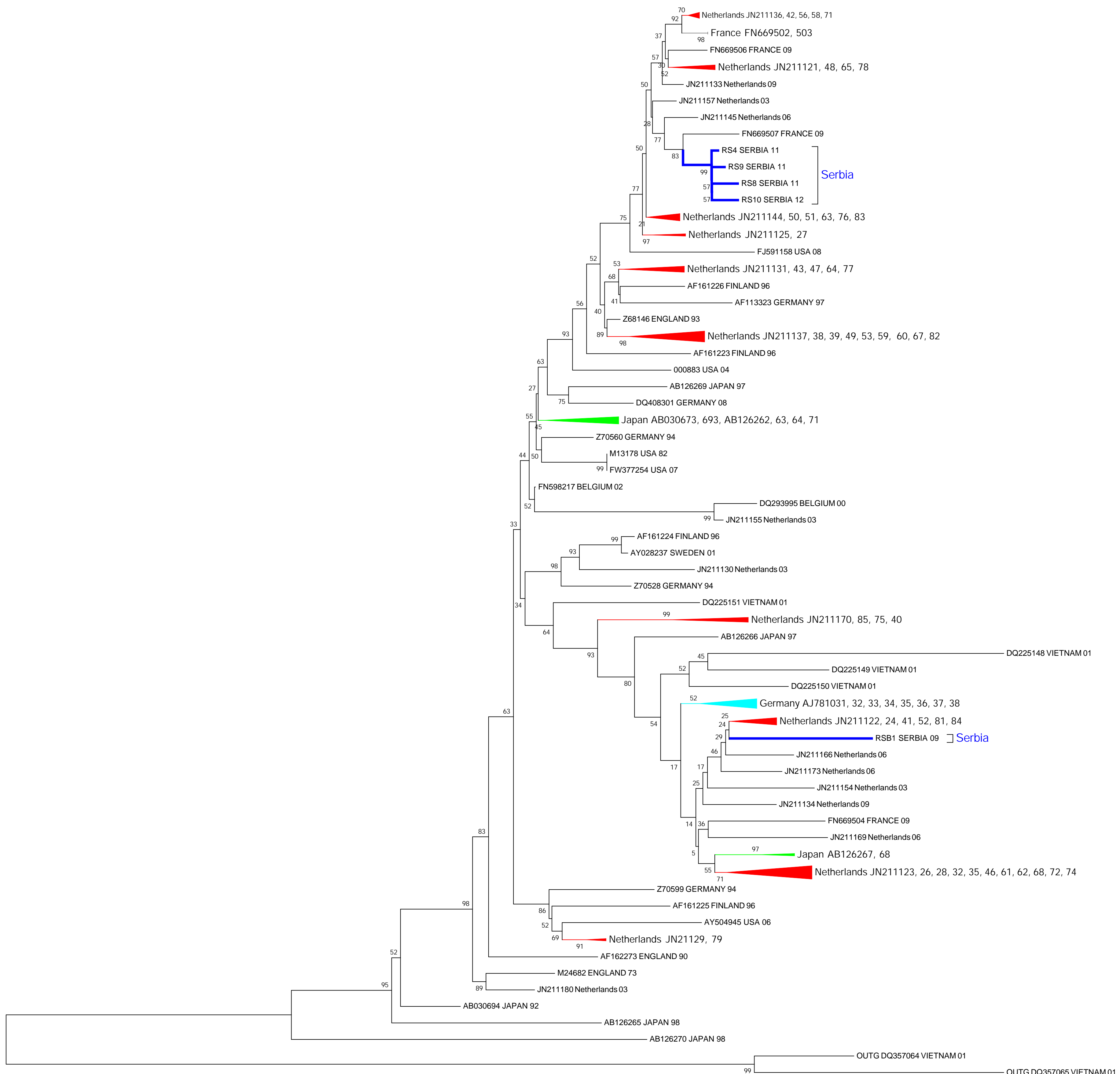
RSB1/M1, RS4, RS8, RS9, RS10, AB030673, AB030693, AB030694, AB126263, AB126266, AB126267, AB126269, AB126262, AB126264, AB126265, AB126268, AB126270, AB126271, AF161223, AF161224, AF161225, AF161226, Z70560, Z70528, Z70599, AF113323, AJ781031, AJ781032, AJ781033, AJ781034, AJ781035, AJ781036, AJ781037, AJ781038, DQ408301, AY028237, M13178, NC-000883, AY504945, FW377254, FJ591158, DQ293995, FN598217, M24682, AF162273, Z68146, FN669502, FN669503, FN669504, FN669506, FN669507, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, DQ357064, DQ357065, JN211130, JN211125, JN211127, JN211138, JN211139, JN211154, JN211155, JN211170, JN211157, JN211167, JN211163, JN211180, JN211183, JN211185, JN211123, JN211149, JN211150, JN211151, JN211153, JN211160, JN211162, JN211129, JN211144, JN211176, JN211177, JN211181, JN211182, JN211184, JN211128, JN211131, JN211132, JN211141, JN211121, JN211143, JN211145, JN211147, JN211164, JN211161, JN211166, JN211169, JN211173, JN211179, JN211135, JN211136, JN211168, JN211148, JN211171, JN211172, JN211175, JN211178, JN211124, JN211126, JN211122, JN211133, JN211134, JN211137, JN211140, JN211142, JN211146, JN211156, JN211158, JN211152, JN211159, JN211165, JN211174

Prilog 4.

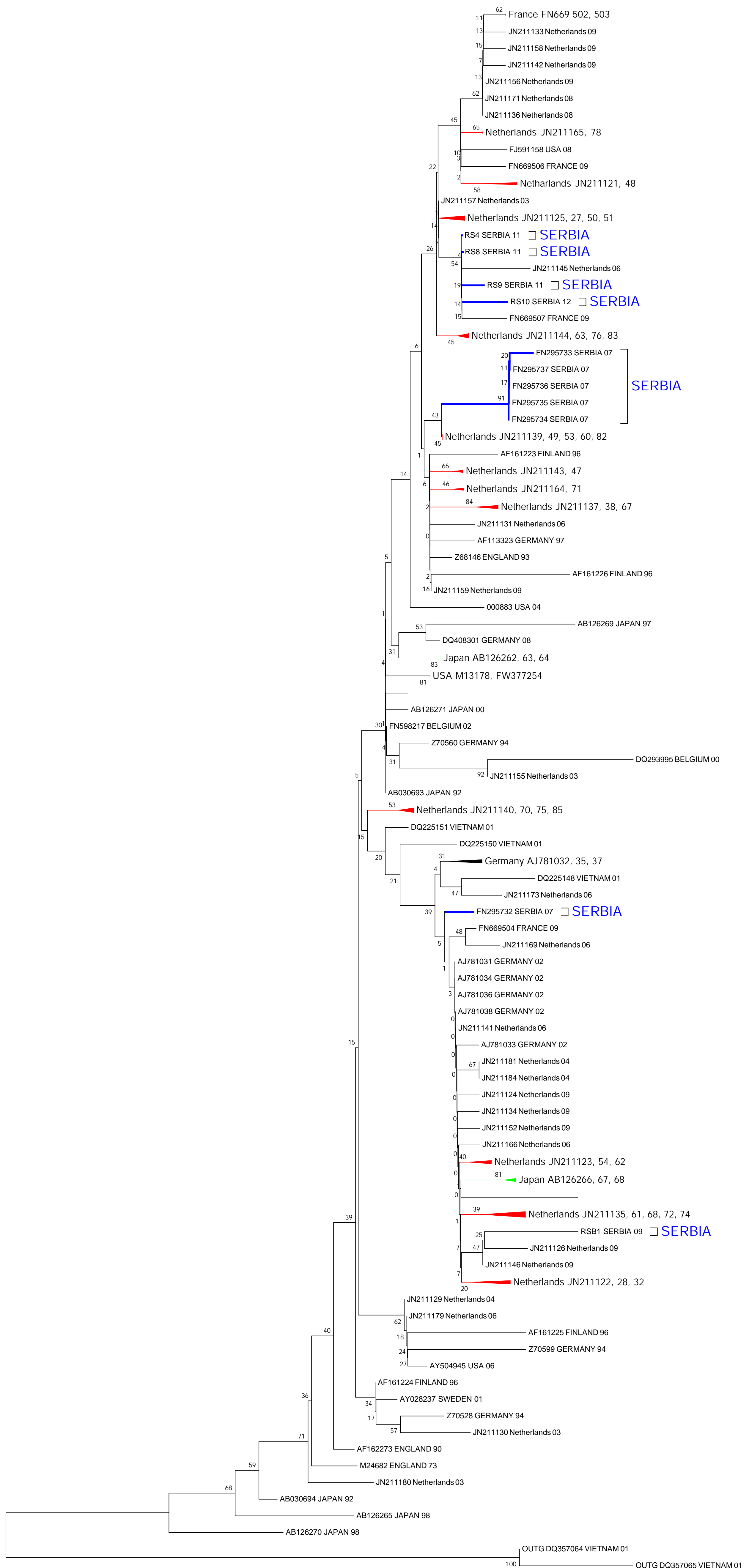
Filogenetska stabla u većem formatu



0.02



0.005



0.005

100

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

SERBIA

DQ293995 BELGIUM 00

RSB1 SERBIA 09 SERBIA

OUTG DQ357064 VIETNAM 01
OUTG DQ357065 VIETNAM 01

Prilog 5.

Deo procedure prijave i razvoja interne metode za kvantifikaciju B19 genoma kao potencijalnog patenta u Centru za transfer tehnologija, Univerziteta u Beogradu



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ЦЕНТАР ЗА ТРАНСФЕР ТЕХНОЛОГИЈЕ
Студентски трг 1, 11000 Београд, Република Србија
Тел.: +381-11 3207496;
Факс: +381-11 2638818;
Ел.пошта: ctt@rect.bg.ac.rs



012-18040/2-R

Пројекат „Од идеје до лиценце“

Поштована др Стаменковић,

Овом приликом Вас обавештавамо да је Ваш проналазак „Метода за анализу генома парво Б19 вируса у крви и крвним производим“ ушао међу седам најбољих пројеката за које ће Центар за трансфер технологије иницирати комерцијализацију путем лиценцирања или оснивања *spin-out* компаније.

Пројекат „Од идеје до лиценце“ покренуо је Центар за трансфер технологије Универзитета у Београду у сарадњи са *ISIS Innovation* компанијом за трансфер технологије Универзитета у Оксфорду, Министарством просвете, науке и технолошког развоја, Заводом за интелектуалну својину републике Србије и Европским заводом за патенте. Овом приликом разматрани су најбоље ранжирани пројекти које је предложило Министарство просвете и науке Републике Србије.

Након детаљног разматрања Вашег проналазак од стране експерата из *ISIS Innovation*-а као и од стране запослених у Центру за трансфер технологије Универзитета у Београду, његовог комерцијалног потенцијала, могуће примене и корисника, Ваша технологија је одабрана међу седам најбољих за комерцијализацију. Комерцијализација је планирана путем лиценцирања.

С поштовањем,



Проф. др Бранко Ковачевић
Ректор Универзитета у Београду

Stručna biografija

Milica Nešić rođena je 01.04.1975. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 1998. godine sa prosečnom ocenom 9.83, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Diplomski rad pod mentorstvom prof. dr Stanke Romac pod naslovom "Analiza broja CAG ponovaka DRPLA gena kod šizofrenih pacijenata i u zdravoj jugoslovenskoj populaciji" odbranila je 25.12.1998. sa ocenom 10.

Poslediplomske studije upisala je 1999. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju, a školovanje nastavlja prelaskom na drugu godinu doktorskih studija školske 2007/2008 godine na istom fakultetu, u okviru studijskog programa Molekularna biologija.

Od 2000. godine zaposlena je u Zavodu za farmaciju Srbije, koji usvajanjem novog Zakona o lekovima 2004. godine postaje Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije. U okviru Nacionalne kontrolne laboratorije Agencije radila je na poslovima kontrole kvaliteta lekova i to na unapređenju i razvoju bioloških testova za kontrolu farmaceutskih proizvoda, kao i na posebnim aspektima kontrole kvaliteta u vezi bioloških lekova, uključujući biotehnoške lekove i krvne derivate.

Trenutno je angažovana na poslovima procene dokumentacije o kvalitetu leka za biotehnoške lekove u Farmaceutskom sektoru Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije.

Do sada je publikovala 2 naučna rada iz uže naučne oblasti, 5 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova i u pripremi je jedno tehničko rešenje - patent.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Нешић

број индекса ИО070005

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

„Варијабилност генома хуманог вируса *Parvovirus B19* (Parvoviridae, *Erythrovirus*)“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.06.2013.


Milica Nešić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Нешић

Број индекса
ИО070005

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Варијабилност генома хуманог вируса Parvovirus B19 (Parvoviridae, Erythrovirus)

Ментори

Др Горана Стаменковић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду,
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор, Универзитет у Београду,
Биолошки факултет

Потписани/а Милица Нешић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.06.2013.

Милица Нешић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Варијабилност генома хуманог вируса Parvovirus B19

(Parvoviridae, Erythrovirus)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____ 25.06.2013. _____

Милица Решет

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.