



Erzurum Yöresinde Sığır Akciğerlerinde Parainfluenza-3 Viral Antijenlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi

Selim ÇOMAKLI¹, Yavuz Selim SAĞLAM¹, Mustafa ÖZKARACA¹, Serdar ALTUN¹

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.12.2017	30.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Çomaklı S, Sağlam YS, Özkaraca M, Altun S: Erzurum Yöresinde Sığır Akciğerlerinde Parainfluenza-3 Viral Antijenlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 309-316, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.364602

Öz: Bu çalışmada, Erzurum yöresinde yetiştirilen sığırların akciğerlerinde *Parainfluenza-3* (PI-3) etkeninin immunohistokimyasal olarak varlığının ve yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Erzurum ilinde faaliyet gösteren kesimhanelerde kesimi yapılan 600 sığıra ait akciğer örneği toplanarak incelendi ve makroskopik olarak 75 (%12.5) akciğer örneğinde pnömoni bulgusuna rastlandı. Makroskopik olarak incelenen bu akciğerlerin histopatolojik incelemesinde 58 interstisyel pnömoni, 10 bronkointerstisyel pnömoni, 2 kataral bronkopnömoni, 2 fibrinli pnömoni ve 3 granümatöz pnömoni olgusu gözlemlendi. Pnömoni saptanan akciğer kesitlerine PI-3 virüsü yönünden immunohistokimyasal boyama yapıldı ve 7 (%9.33) akciğer örneğinde immunpozitiflikler belirlendi. İmmünpozitifliklere interstisyel pnömoni gözlenen 6 (%10.34), bronkointerstisyel pnömoni gözlenen 1 (%10) akciğer örneğinde rastlandı. PI-3 viral antijeni pozitif olan akciğerlerde immunpozitifliklere bronş ve bronşiyol epitellerinin sitoplazmasında, bronşiyol çevresindeki bronşyoalveolar lenfoid dokudaki (BALT) yangı hücrelerinde, alveollerde, interstisyel alandaki makrofajlarda rastlandı. Ayrıca bu pozitiflikler bronkointerstisyel pnömoni gözlenen akciğer örneklerinde bronşiyol lümenindeki yangısal eksudatta gözlemlendi. Sonuç olarak; Erzurum yöresindeki sığırlarda pnömoni oluşturan etkenler içerisinde PI-3 viral antijen varlığının önemli bir yere sahip olduğu belirlenmiş ve sığırlardaki solunum sistemi hastalık kompleksine karşı yapılan koruma ve tedavi yöntemlerinde bu etkenin göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İmmunohistokimya, *Parainfluenza-3*, Pnömoni, Sığır.

The Determination of Parainfluenza-3 Viral Antigens Using Immunohistochemical Methods in Cattle Lungs in Erzurum Region

Abstract: The aim of this study was to investigate immunohistochemically the presence and the prevalence of *Parainfluenza-3* (PI-3) in the lungs of cattle breeding in the Erzurum region. For this aim, the lung samples of 600 cattle slaughtered in abattoirs in Erzurum province were examined by collecting and pneumonia was macroscopically observed in 75 (12.5%) lung samples. 58 interstitial pneumonia, 10 broncho-interstitial pneumonia, 2 catarrhal pneumonia, 2 fibrinous pneumonia, and 3 granulomatous pneumonia were observed in the histopathological evaluation of these lungs examined macroscopically. Immunohistochemical staining was performed to pneumonia detected lung sections in terms of PI-3 virus and immunopositivity was detected in 7 (9.33%) lung samples. Immunopositivity was observed in 6 (10.34%) interstitial pneumonia and 1 (10%) broncho-interstitial pneumonia in lung samples. Immunopositivity in the lungs which were positive for PI-3 viral antigens was found in the cytoplasm of bronchi and bronchioles epithelium, in inflammation cells in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) around bronchioles, in the alveoli, in the macrophages in the interstitial area. Furthermore, these positivities were observed in the inflammatory exudate in the bronchial lumen in the broncho-interstitial pneumonia lung samples. In conclusion, it was determined that the presence of PI-3 viral antigens has an important place in agents which occur pneumonia in cattle in Erzurum region and it is thought that this agent should not be ignored in the protection and treatment methods against the bovine respiratory disease complex.

Keywords: Cattle, Immunohistochemistry, *Parainfluenza-3*, Pneumonia.

✉ Selim ÇOMAKLI

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: selim.comakli@atauni.edu.tr

GİRİŞ

PnömoniLER sığırlarda ekonomik kayıplara neden olan en önemli hastalıklar arasında yer alır (1-3). Bakteriyel, paraziter, mikoplazmal gibi etkenlerin yanında, viral etkenler de pnömoniye neden olabilmektedirler (4,5). *Bovine respiratory syncytial virus (BRSV)*, *bovine herpesvirus-1 (BoHV-1)*, *bovine viral diarrhoea virus (BVDV)*, *bovine coronavirus (BoCV)*, *bovine adenovirus*, *bovine enterovirus 1, 2, 3*, *bovine rinovirus 1 ve 2*, *bovine reovirus*'a ilave olarak *bovine parainfluenza-3 (PI-3)* virusta sığırlarda pnömoni sebebi olarak bildirilmiştir (6-10).

Paramyxoviridae ailesinde *Paramyxovirinae* alt ailesinin *Respirovirus* genusuna ait olan *PI-3* genç ve erişkin sığırlarda bilinen viral solunum sistemi patojenlerinin en önemlilerinden birisi olarak kabul edilir (11-15). Enfeksiyonun kaynağını sekresyonları ile çevreye virüs saçan *PI-3* ile enfekte hasta hayvanlar oluşturmaktadır. Bazı şiddetli olgularda intersitisyel pnömoni gözlenebilir (16). Sığırlarda primer viral enfeksiyonu sekonder bakteriyel enfeksiyonlar takip eder ve sonucunda ölüm şekillenebilir (17).

Parainfluenza-3 virus varlığının saptanmasında altın standart virüs izolasyon yöntemidir. Bunun yanında hemagglutinasyon testi (HA test), hemagglutinasyon inhibisyon testi (HI test), enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA) testi ve direkt yada indirekt immunfloresan boyama, immunohistokimyasal boyama gibi bazı yöntemlerde virusun tespit edilmesinde kullanılmaktadır (18,19). Pnömoni akciğerlerde hematoksilen eozin boyama yöntemi ile *PI-3*'ün teşhisi yapılamadığından dolayı enfeksiyonun doğrulayıcı teşhisinin yapılabilmesi için enfekte hayvanların serum örneklerinden viral antijenlere karşı antikorların belirlenmesi ya da alt solunum yollarından immunohistokimyasal yöntemle etkenin belirlenmesi gereklidir (20-22).

Bu çalışmada; Erzurum yöresinde pnömoni sığır akciğerlerinde *Parainfluenza-3* viral antijen varlığının ve yaygınlığının immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Bu çalışmada materyal olarak, 2014-2016 yılları arasında Erzurum ilinde kesimhanelerde kesimi yapılan 600 sığira ait akciğer örneğinin makroskopik muayeneleri sonucunda pnömoni saptanan 75 sığır akciğer örneği incelendi (Etik Kurul Karar No: 2016/2).

Histopatolojik İnceleme

Alınan akciğer örnekleri %10' luk nötral formalin solüsyonunda tespit edilerek rutin alkol-ksilol takip sürecinden sonra parafin bloklara alındı. Dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen-Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (23). Gözlenen mikroskopik bulgulara göre pnömoniler tanımlandı ve sınıflandırıldı (5).

İmmünohistokimyasal İnceleme

Bu amaçla polilisinli lamlara alınan 5 µm' lik kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra %3'lük H₂O₂' de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu ile 2x5 dk 500 watt' da muamele edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan dokular Mouse anti-PI3 (Monoklonal antikor, Biox, Jemelle-Belçika, Bio290) ile 37° C de 1/100 dilüsyon oranında 30 dk. süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda PBS ile yıkanan dokularda sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAP Detection IHC Kit (Abcam, Katalog no. ab80436) üretici firmanın önerdiği şekilde kullanıldı. Kromojen olarak 3,3 diaminobenzidine (DAB) kullanıldı. Yıkama sonunda Mayer's hematoksilen ile zit boyama yapıldı. Kesitler üzerine entellan damlatılarak ışık mikroskopunda (OLYMPUS BX51, OLYMPUS DP72-Kamera Ataçmanı, Japan) incelendi.

BULGULAR**Makroskopik Bulgular**

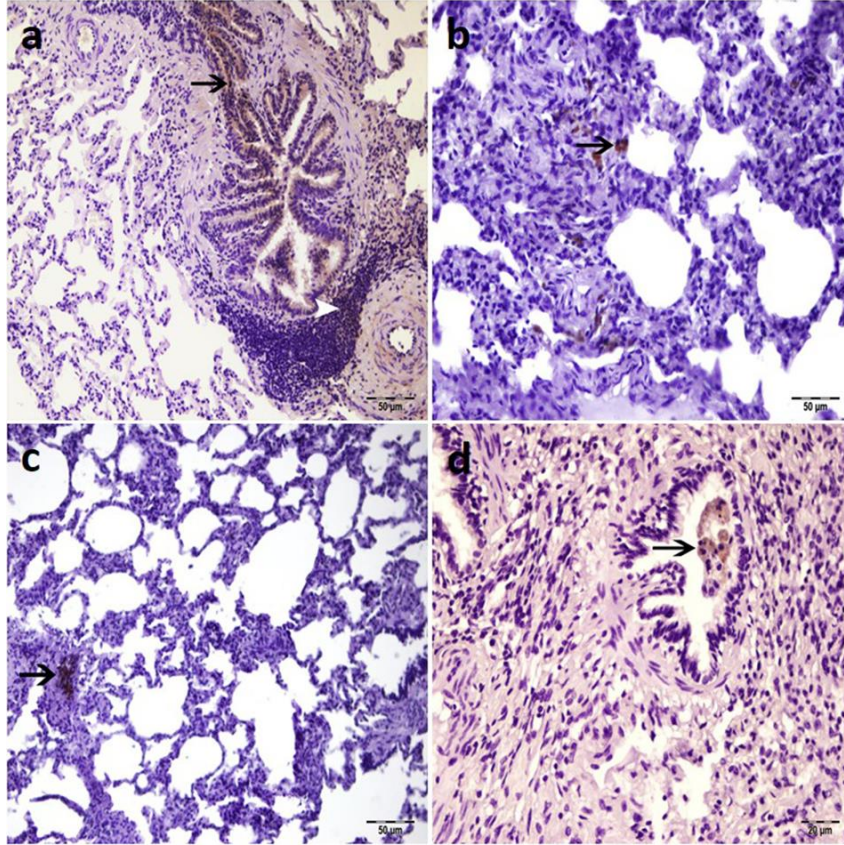
Makroskopik olarak incelenen 600 sığır akciğerinin 75'inde (%12.5) değişik tipte pnömoni bulgusuna rastlandı.

Histopatolojik Bulgular

Makroskopik olarak pnömoni saptanan akciğerlerin mikroskopik incelenmesi ile pnömonilerin tipleri belirlendi. Olguların 58'inde (%77.33) intersitisyel pnömoni, 10'unda (%13.33) bronkointersitisyel pnömoni, 2'sinde (%2.67) kataral bronkopnömoni, 2'sinde (%2.67) fibrinli pnömoni, 3'ünde (%4) granümatöz pnömoni tespit edildi.

İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal boyamada, *PI-3* viral antijenlerine 58 intersitisyel pnömoni özelliği gösteren akciğer örneğinin 6'sında, 10 bronkointersitisyel pnömoni gözlenen akciğer örneğinin 1'inde rastlandı. *PI-3* viral antijenine ilişkin spesifik boyanmalara bronş ve bronşiyol epitellerinin sitoplazmasında, bronşiyol çevresindeki BALT dokusunda (Şekil 1a), alveollerde (Şekil 1b), intersitisyel alanda makrofajlarda (Şekil 1c) ve bronkointersitisyel pnömoni olgusunda ise bronşiyol lümenindeki eksudatta rastlandı (şekil 1d).

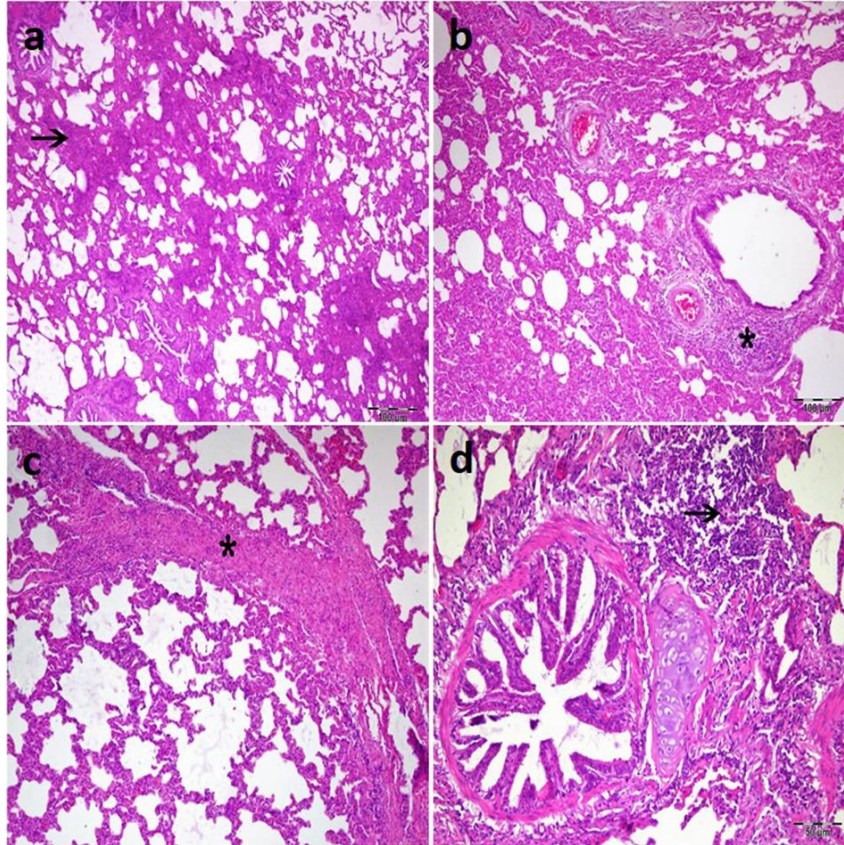


Şekil1: a) Bronşiyol epitelinin sitoplazmasında (ok) ve bronşiyol çevresindeki BALT dokusunda (ok başı) Parainfluenza-3 immunpozitiflikleri, b) Alveol duvarındaki immunpozitiflik (ok), c) İntersitisyel alandaki yangı hücrelerindeki immunpozitiflik (ok), d) Bronşiyol lümenindeki yangısal eksudat hücrelerinde immunpozitiflik (ok) & IHC.

Figure 1: a) Parainfluenza-3 immunopositivity in the cytoplasm of the bronchiolar epithelium (arrow) and in the BALT tissue around the bronchiolar (arrowhead), b) Immunopositivity on alveolar wall (arrow), c) Immunopositivity in inflammatory cells in the interstitial area (arrow), d) Immunopositivity in inflammatory exudate cells in bronchiolar lumen (arrow) & IHC.

Parainfluenza-3 viral antijeni yönünden immunpozitiflik gösteren pnömonili akciğer örneklerinin mikroskopik incelemesinde, interalveoler septumlarda bağ doku artışı ve mononükleer hücre infiltrasyonlarına bağlı olarak kalınlaşmalar (Şekil 2a), peribronşiyal, peribronşiyoler lenfoid dokuda hiperplazi gözlemlendi (Şekil 2b). İnterlobuler septumlarda kalınlaşmalara rastlandı

(Şekil 2c). Bronş ve bronşiyol epitelinde yer yer hiperplazi tablosu gözlemlendi. BALT dokuda nekroz (Şekil 2d), bronş-bronşiyol çevresinde fibromusküler hipertrofi dikkati çekti. Bronkointersitisyel pnömonilerde bronş ve bronşiyol lümenlerinde eksudata rastlandı, bronş ve bronşiyol epitelinde nekroz ve yer yer proliferasyona rastlandı.



Şekil2: a) İnteralveolar septumda kalınlaşma (ok), b) Bronşiyolar lenfoid dokuda hiperplazi (yıldız), c) İnterlobuler septumda kalınlaşma (yıldız), d) Bronş çevresindeki lenfoid doku hücrelerinde nekroz (ok)&HE.

Figure2: a) Thickening in interalveolar septum (arrow), b) Hyperplasia in bronchiolar lymphoid tissue (star), c) thickening of the interlobular septum, d) Necrosis in lymphoid tissue cells around the bronchus (arrow)&HE.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonları sıklıkla şekillenmektedir. Bu enfeksiyonlara neden olan *PI-3* etkeni hayvanlarda oluşturmuş olduğu ağırlık kaybı ve buna bağlı olarak meydana getirdiği verim düşüklüğü ile önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (24). *PI-3*'ün doğal ya da deneysel olarak oluşturulan solunum sistemi enfeksiyonlarında

patojen bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (25). Ancak bazı çalışmalarda *PI-3*'ün immun sistemin baskılanmasına bağlı olarak tek başına oluşturduğu enfeksiyonun şiddetinin, diğer etkenlerle birlikte oluşturduğu miks enfeksiyonlardan daha şiddetli olduğu bildirilmiştir (26). Etkenin teşhisinde histopatolojik olarak patognomonik bir bulgu bulunmamaktadır (27). *PI-3* etkeninin oluşturduğu

intersitisyel karakterdeki pnömonilerde, histopatolojik olarak alveol ve bronş epitellerinde dejenerasyon, alveol epitellerinde asidofilik intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği, bronş ve alveol lümenlerinde lenfosit, nötrofil, makrofajlar ve dökülmüş alveol epitelleri ile sinsityal dev hücrelerine, lenfoid dokuda hiperplaziye ve nekrotik bronşiyolitise neden olduğu ve bronş çevresindeki lenfoid dokuda ise nekrozun bulunduğu ifade edilmiştir (28,29). Bu çalışmada *PI-3* viral antijeni belirlenen intersitisyel tip karakterdeki pnömonilerde önceki çalışmalarla benzer şekilde bronş ve bronşiyol epitellerinde dejenerasyon, deskuamasyon, lenfoid dokuda hiperplazi, bronş çevresindeki lenfoid dokuda nekroz tablosu gözlenmiştir. *PI-3* etkeninin oluşturmuş olduğu bronkointersitisyel pnömoniler histolojik olarak nekrotik bronşitis, bronşiyolit, nötrofilik eksudat, bronşiyoller ve alveolar epitel hücrelerinde proliferasyon, sitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin oluşumu ile karakterizedir (30). Sunulan çalışmada ise bronkointersitisyel pnömoni belirlenen akciğerlerin histopatolojik incelenmesinde, bronş ve bronşiyol lümenlerinde eksudat, bronş ve bronşiyol epitelinde nekroz ve yer yer proliferasyona rastlanmış olup, her iki pnömoni tipinde de inklüzyon cisimciği gözlenmemiştir. Deneysel *PI-3* enfeksiyonundan 7 gün sonra, intrasitoplazmik inklüzyonların seyrek olarak bulunması (4) sunulan çalışmada inklüzyon cisimciğinin gözlenmemesinin, alınan örneklerinin enfeksiyonun ilerleyen döneminde toplanmasından kaynaklanabileceğiyle ilişkilendirilmiştir.

Araştırmanın yapıldığı bölgede etkenin sığırlardaki varlığı ile ilgili daha önce Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan çalışmada, sığırlardan alınan kan örneklerine yapılan nötralizasyon testi sonucunda %55.84 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (31). Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan diğer bir çalışmada da kan serumlarında nötralizasyon testi ile *PI-3* seropozitifliğinin %18 olduğu bildirilmiştir (32). Bu sonuçların ortaya çıkmasında enfeksiyon zamanı, enfeksiyonu oluşturan virusun dozu, çalışmada

kullanılan bireylerin yaşları, bakım ve beslenme koşulları gibi birçok faktör etkili olmaktadır (31).

Parainfluenza-3 ün teşhisinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR), hücre kültürü, direkt immunfloresan boyama, indirek immunfloresan boyama, immunohistokimya gibi tekniklerin önemli olduğu belirtilmiştir (27). Etkenin teşhisinde immunohistokimyasal yöntemin hızlı, güvenilir ve sensitivitesinin yüksek olduğu ifade edilmiştir (33). Sığır akciğerlerinde *PI-3* ün immunohistokimyasal yöntemlerle tanısına yönelik yapılan çalışmaların az sayıda olduğu görülmüştür (29,34).

Garcia ve ark. (35) *PI-3* etkeninin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada intrasitoplazmik immunpozitifliklere %66.66 oranında rastlamışlardır. Aynı çalışmada *PI-3* immunpozitifliklerine 7 (%43.75) fibrinli plöropnömoni olgusunda, 2 (%12,5) suppuratif pnömoni olgusunda, 6 (%37.5) bronkointersitisyel pnömoni olgusunda rastlanmış, ancak lenfoproliferatif özellikteki pnömoni olgularında *PI-3* immunpozitifliklerine rastlamamışlardır. Çeribaşı ve ark. (29) sığır pnömonilerinin IHC yöntemi ile saptanması üzerine Elazığ ve yöresinde yapmış oldukları bir çalışmada %6.88 oranında *PI-3* virus immunpozitifliği bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise IHC yöntemi kullanılarak 58 intersitisyel pnömoni özelliği gösteren 6 (%10.34), bronkointersitisyel pnömoni gözlenen 1 (%10) akciğer örneğinde *PI3* etkenine ait immunpozitifliğe rastlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda ortaya çıkan farklı sonuçlar, kullanılan fiksatifin proteinleri denatüre ederek antijenik belirleyicileri maskeleyebileceği, dolayısıyla zayıf veya yetersiz bir cevaba neden olarak (35,36) immunpozitifliklerde farklı oranların ortaya çıkabileceği ile ilişkilendirilmiştir.

Haines ve ark. (34) frozen kesit ve parafin kesitlerde yaptıkları immunohistokimyasal boyamada bazı sitoplazmik inklüzyon cisimciği gözlenen hücrelerde yoğun boyamaya rastlamışlardır. Yine aynı çalışmada bronşiyol ve alveolar epitelin yüzeyinde sitoplazmik olarak boyanma gözlenmiştir.

Çeribaşı ve ark. (27) yaptıkları immunohistokimyasal bir çalışmada *PI3*'e ait immunpozitifliklere genellikle intrasitoplazmik olarak rastlamışlardır. İmmunpozitifliklerin bronşiyol ile alveol epitel hücrelerinde bulunduğunu ve immunpozitiflik yoğunluğunun bronşiyol epitel hücrelerinde alveol epitel hücrelerine göre daha şiddetli düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada bronş-bronşiyol ve kan damarlarının çevresindeki plazma hücreleri ve lenfositlerde immunpozitiflik gözlemiş, interalveolar septum, alveolar makrofaj, eksudat, ve alveolar epitelde immunpozitifliğe daha hafif rastlamışlardır. Yine bronşiyolle ilgili lenfoid dokuda da pozitiflikler bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da immunpozitifliklere bronşiyol epiteli, intersitisyel alandaki makrofajlarda, BALT dokusundaki makrofajlarda ve bronşiyol lümenindeki eksudatta rastlanmıştır. Bu anlamda etkenlerin dokudaki lokalizasyonu Haines ve ark. (34) ile Çeribaşı ve ark. (27) yapmış olduğu çalışmaya benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak; Erzurum yöresindeki sığır pnömonilerinde *PI-3* etkeninin %9.33 oranında bulunduğu ve sığır pnömonileri için dikkat edilmesi gereken etiolojik etkenlerden birisi olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Brodersen BW., Kelling CL., 1998. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am J Vet Res*, 59, 1423-1430.
2. Carriere PD., Maxie M., Wilkie B., Savan M., Valli V., Johnson J., 1983. Exposure of calves to aerosols of parainfluenza-3 virus and *Pasteurella haemolytica*. *Can J Comp Med*, 47, 422-432.
3. Zhu YM., Yu Z., Cai H., Gao YR., Dong XM., Li ZL., Shi HF., Meng QF., Lu C., Xue F., 2011. Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China. *Virol J*, 8, 557.
4. Maxie M., Jubb K., 2007. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed., 523-629, Saunders Elsevier, Philadelphia.
5. Zachary JF., Donald M., Gavin M., 2006. Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed., 462-558, Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri.
6. Fulton RW., 2009. Bovine respiratory disease research (1983–2009). *Anim Health Res Rev*, 10, 131-139.
7. Mosier D., 2015. Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Anim Health Res Rev*, 15, 166-168.
8. Taylor, J.D., Fulton RW., Lehenbauer TW., Step DL., Confer AW., 2010. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J*, 51, p. 1095-1102.
9. Taylor JD., Holland BP., Step DL., Payton ME., Confer AW., 2015. Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Res Vet Sci*, 99, 41-45.
10. Tuncer P., Yesilbag K., 2015. Serological detection of infection dynamics for respiratory viruses among dairy calves. *Vet Microbiol*, 180, 180-185.
11. Fauquet CM., Mayo MA., Maniloff J., Desselberger U., Ball LA., 2005. Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
12. Fulton RW., Purdy C., Confer AW., Saliki J., Loan RW., Briggs RE., Burge LJ., 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res*, 64, 151-159.
13. Mahony TJ., McCarthy FM., Gravel JL., West L., Young PL., 2002. Construction and manipulation of an infectious clone of the bovine herpesvirus 1 genome maintained as a bacterial artificial chromosome. *J Virol*, 76, 6660-6668.
14. Snowden G., Van Vleck LD., Cundiff L., Bennett G., Koohmaraie M., Dikeman M., 2007. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: phenotypic,

- environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits. *J Anim Sci*, 85, 1885-1892.
15. Fulton RW., Neill JD., Saliki JT., Landis C., Burge LJ., Payton ME., 2017 Genomic and antigenic characterization of bovine parainfluenza-3 viruses in the United States including modified live virus vaccine (MLV) strains and field strains from cattle. *Virus Res*, 235, 77-81.
 16. Maidana SS., Lomonaco PM., Combessies G., Craig MI., Diodati J., Rodriguez D., Parreño V., Zabal O., Konrad JL., Crudelli G., 2012. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC Vet Res*, 8, 83.
 17. Oem JK., Lee EY., Lee KK., Kim SH., Lee MH., Hyun BH., 2013. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. *Vet Microbiol*, 162, 224-227.
 18. Murphy FA., Gibbs EPJ., Horzinek MC., Studdert MJ., 1999. *Veterinary Virology*, 3rd ed., San Diego, Academic Press, Inc.
 19. Yang Y., Wang FX., Sun N., Cao L., Zhang SQ., Zhu HW., Guo L., Cheng SP., Wen YJ., 2015. Development and evaluation of two truncated recombinant NP antigen-based indirect ELISAs for detection of bovine parainfluenza virus type 3 antibodies in cattle. *J Virol Methods*, 222, 47-54.
 20. Gülbahar Y., Çabalar M., Ertürk A., 2002. Detection by immunoperoxidase technique of parainfluenza type-3 virus and respiratory syncytial virus antigens in naturally occurring pneumonia in lambs. *YYU Vet Fak Derg*, 13, 74-77.
 21. Radostits O., Blood D., Gay C., 1994. *Veterinary Medicine Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Goats and Horses*. 8th ed., Balliere Tindall, London.
 22. Yener Z., Sağlam YS., Timurkaan N., İlhan F., 2005. Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52, 268-271.
 23. Presnell JK., Schreibman MP., 1997. *Humason's Animal Tissue Techniques*. 5th ed., Baltimore and London, Johns Hopkins University Press.
 24. Martin W., 1996. Respiratory infections of sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 19, 171-179.
 25. Bryson D., McNulty M., Ball H., Neill S., Connor T., Cush P., 1979. The experimental production of pneumonia in calves by intranasal inoculation of parainfluenza type III virus. *Vet Rec*, 105, 566-573.
 26. Ghram A., Reddy P., Morrill J., Blecha F., Minocha H., 1989. Bovine herpesvirus-1 and parainfluenza-3 virus interactions: clinical and immunological response in calves. *Can J Vet Res*, 53, 62-67.
 27. Çeribası S., Özkaraca M., Özer H., Çeribası AO., 2012. Prevalence of parainfluenza type 3 virus antigens in pneumonic caprine lungs by direct immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *Small Rumin Res*, 108, 127-132.
 28. Aly N., Shehab G., El-Rahim I., 2003. Bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. *Rev Sci Tech*, 22, 879-892.
 29. Ceribası AO., Ozkaraca M., Ceribası S., Ozer H., 2014. Histopathologic, immunoperoxidase and immunofluorescent examinations on natural cattle pneumonia originated from Parainfluenza type 3, Respiratory Syncytial virus, Adenovirus type 3 and Herpesvirus type 1. *Rev Med Vet*, 165, 201-212.
 30. Dungworth DL., 1993. Respiratory system, in *Pathology of Domestic Animals*, Ed. Jubb K., Peter K., Palmer N., 4th ed., 539-698, Academic Press, San Diego, CA.
 31. Yıldırım Y., Yılmaz V., Majarashin ARF., 2009. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi Sınır İllerinde Bulunan Sığırlarda Viral Solunum Sistemi Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 601-606.
 32. Çabalar M., Can-Şahna K., 2000. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde süt sığırlarında Parainfluenza Virus -3, Bovine Herpes Virus -1 ve Respiratory Syncytial Virüs Enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi. *YYU Vet Fak Derg*, 11, 101-105.
 33. Haines DM., Chelack BJ., 1991. Technical considerations for developing enzyme

- immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest*, 3, 101-112.
34. Haines DM., Kendall JC., Remenda BW., Breker-Klassen MM., Clark EG., 1992. Monoclonal and polyclonal antibodies for immunohistochemical detection of bovine parainfluenza type 3 virus in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest*, 4, 393-399.
35. Barranco FJ., Tavera FJT., Gris GC., Garcia REV., 2003. Viral participation in respiratory disease in feedlot cattle, as identified by immunohistochemistry. *Vet Mexico*, 34, 1-12.
36. Vanda CB., Valero EG., 1997. Inmunohistoquímica diagnostica. Memorias del Curso sobre Inmunohistoquímica. 1997 junio 25, Mexico (DF). Mexico (DF), Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios.