

JACQUELINE CAMPALANS-BARNIER

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) ISOLADO
NO BRASIL**

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,
apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em
Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da aluna
JACQUELINE CAMPALANS BARNIER
16/04/02*


Prof. Dra. Clarice Arns Weis
Orientadora

CAMPINAS

2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

200331756

JACQUELINE CAMPALANS-BARNIER

***CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) ISOLADO
NO BRASIL***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF^A. DR^A. CLARICE WEIS ARNS

CO-ORIENTADOR: PROF^A. DR^A. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2002

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B266c

Barnier, Jacqueline Campalans

Caracterização molecular de vírus respiratório sincicial bovino (BRVS) isolado no Brasil / Jacqueline Campalans Barnier. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Clarice Weis Arns, Sandra Cecília Botelho Costa
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bovino. 2. Vírus. 3. Pneumonia. I. Clarice Weis Arns. II. Sandra Cecília Botelho Costa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	48
Nº CHAMADA	UNICAMP
	CISC
V	EX
TOMBO BC/	55960
PROC.	16/124103
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/10/03
Nº CPD	

CM00190370-3

517 id 3020 93

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Aluno: JACQUELINE CAMPALANS BARNIER

Orientador(a): Profa.Dra. Clarice Arns Weis

Membros:

Professor Doutor Antonio Jerez

Professora Doutora Edwiges Maristela Pituco

Professora Doutora Maria Sílvia Vicari

Professor Doutor Jorge Vega

Professora Doutora Clarice Arns Weis

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/07/02

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

David e Lucy

Pelo amor e constante incentivo,

A toda minha família.

Pelo apoio, incentivo e carinho;

dedico este trabalho.

À Prof. Dra. Clarice Weis Arns pela orientação, paciência e constante apoio durante toda a elaboração desta tese e pela oportunidade e confiança a mim depositada.

A Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela confiança, incentivo e as valiosas sugestões oferecidas.

A minha irmã Mariel, pelo constante incentivo amor e amizade, especialmente nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Ramón e Lidia, Cláudia, Lidia Andréa e Evelyn, por terem sido minha família aqui em Campinas.

Aos meus amigos Malva e Rodrigo pela amizade e belos momentos de convívio.

A minha amiga Myriam, por ter-me encaminhado ao Doutorado, pelo inestimável apoio e amizade.

Às minhas amigas Ângela e Roseneide por ter-me dado o apoio necessário nos momentos em que pensei desistir.

Às amigas Lia, Lica, Andréa, Dulcinéia, Paula, Rosana, Renata, Regina, Zizi, Célia e Terezinha pela amizade, companheirismo, alegria de viver e pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de Valparaíso, aos que sempre recorri para me carregar da energia para o ano inteiro e ocupam um lugar especial na minha vida.

Aos colegas de pós-graduação e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, e Clínica Médica, FCM, UNICAMP, que pela amizade e ensinamentos contribuíram para o nascimento desta tese.

Ao funcionário Geneci Davi Fernandes pela valiosa contribuição e colaboração na fase experimental deste trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio prestado, pela concessão de uma bolsa de doutorado para execução deste trabalho.

A todos que sempre acreditaram em mim e criaram as condições para a realização deste trabalho.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xiii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Histórico.....	19
2.2. Estrutura viral.....	19
2.3. Subgrupos de BRSV.....	21
2.4. Epidemiologia.....	21
2.5. Sintomas clínicos.....	23
2.6. Diagnóstico.....	24
2.7. Tratamento e controle da infecção.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Células, vírus e meio de cultura.....	30
4.2. Purificação viral.....	31
4.3. Titulação Viral.....	32
4.4. Microscopia eletrônica.....	32
4.5. RT-PCR Dupla ("nested").....	33
4.5.1. Extração do RNA.....	33
4.5.2. Síntese de cDNA.....	33
4.5.3. Reação da RT-PCR para a proteína F.....	34

4.5.4. Reação da RT-PCR para a Proteína G.....	35
4.6. Clivagem do produto da RT-PCR com enzima de restrição.....	36
4.7. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados das proteínas G e F.....	36
4.7.1. Purificação do produto da RT- PCR.....	36
4.7.2. Eletroforese em Gel Desnaturante. (Seqüenciamento Manual).....	37
4.7.3. Seqüenciamento automático e análise de seqüências.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Purificação e Morfología viral.....	39
5.2. RT-PCR dupla.....	41
5.2.1. Proteína G.....	41
5.2.2. Proteína F.....	42
5.3. Clivagem do produto da RT-PCR com enzima de restrição.....	43
5.4. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados das proteínas G e F.....	43
5.4.1. Proteína F.....	45
5.4.2. Proteína G.....	48
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	64
8. SUMMARY.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
10. APÊNDICE.....	79

	PÁG.
Tabela 1: Descrição dos iniciadores utilizados para a proteína F (VILCEK <i>et al.</i> , 1994).....	35
Tabela 2: Descrição dos iniciadores utilizados para proteína G (VILCEK <i>et al.</i> , 1994).....	35
Tabela 3: Título viral das amostras purificadas (DICT50/ml).....	39
Tabela 4: Origem e classificação da estirpe viral de acordo à resposta aos anticorpos monoclonais e à sequência da proteína G.....	52

	PÁG.
Figura 1: Estrutura do vírus respiratório sincicial (RSV) (HALL, 2001).....	20
Figura 2: Microfotografia eletrônica do vírus BRSV-25-BR, purificado pelo método da dupla centrifugação. Contrastação negativa, aumento 77.500 x 2,5x.....	40
Figura 3: Produto da reação RT-PCR dupla para a proteína G, usando os iniciadores B7A e B8. Região amplificada de 371pb do gene G do vírus respiratório sincicial bovino.....	41
Figura 4: Produto da reação RT-PCR dupla para a proteína F, usando os iniciadores B3 e B4A. Região amplificada de 481pb do gene F do vírus respiratório sincicial bovino.....	42
Figura 5: Produto da Reação RT-PCR dupla para a Proteína F do vírus respiratório sincicial bovino, clivado com enzima <i>Sca I</i>	43
Figura 6: Seqüenciamento manual parcial do fragmento amplificado do gene G em gel de poliacrilamida 6%, usando metodologia de SANGER <i>et al.</i> , 1977.....	44
Figura 7: Eletroferogramas do seqüenciamento do fragmento amplificado da proteína F do isolado BRSV-25-BR com o iniciador B3, direto.....	45
Figura 8: Seqüência do fragmento do genoma da proteína F do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV-25-BR) obtido no sequenciador automático ABI PRISM TM 310 Genetic Analyser.....	46

Figura 9:	Visualização de alinhamentos da sequência de nucleotídeos pesquisada da proteína F do BRSV-25-BR com as sequências armazenadas no GeneBank.....	47
Figura 10:	Alinhamento de sequência entre o fragmento do genoma da proteína F do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe 11246.....	48
Figura 11:	Eletoferogramas do sequenciamento do fragmento amplificado da proteína G do isolado BRSV-25-BR com o iniciador B7, direto.....	49
Figura 12:	Sequência do fragmento do genoma da proteína G do BRSV-25-BR obtido no sequenciador automático ABI PRISM TM 310 Genetic Analyser.....	50
Figura 13:	Visualização de alinhamentos da sequência pesquisada da proteína G do BRSV-25-BR com sequências armazenadas no GeneBank.....	50
Figura 14:	Alinhamento de sequências entre o fragmento do genoma da proteína G em estudo e similar fragmento do BRSV estirpe Bov X.....	51
Figura 15:	Dendrograma das relações entre os isolados de BRSV a partir da sequência de aminoácidos derivados do fragmento do gene da proteína G.....	54
Figura 16:	Visualização de alinhamentos da sequência de aminoácidos derivados da proteína F do BRSV-25-BR com as sequências de similar fragmento armazenadas no GeneBank.....	80
Figura 17:	Alinhamento de sequência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína F do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe RB 94.....	81

Figura 18:	Alinhamento de seqüência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína F do BRSV-25-BR em estudo e similar fragmento do BRSV estirpe AT51908.....	82
Figura 19:	Visualização de alinhamentos da seqüência de aminoácidos derivados da proteína G do BRSV-25-BR com as seqüências armazenadas no GeneBank.....	83
Figura 20:	Alinhamento de seqüência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína G do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe 220-60, representante do subgrupo B.....	84
Figura 21:	Alinhamento de seqüência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína G do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe 4642, representante do subgrupo B.....	85

O vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) causa infecção aguda do trato respiratório em bovinos e está amplamente disseminado no mundo inteiro, provocando grandes perdas econômicas aos produtores. O presente projeto visou realizar a caracterização do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), denominado BRSV-25-BR, isolado de bezerro de dois meses de idade, proveniente de rebanho com sintomas de doença respiratória do Estado do Rio Grande do Sul, comparando o mesmo com isolados de BRSV de outros países. O passo inicial foi adaptar os diferentes isolados virais em sistema celular e, para tanto, foram utilizados cultivos de células CER ("Chicken Embryo Related"). A análise morfológica do isolado brasileiro foi realizada através de microscopia eletrônica por contrastação negativa e o resultado dessa análise indicou que o isolado estudado, BRSV-25-BR, é um vírion arredondado, pleomórfico, de tamanho aproximado de 100 a 300 nm, com numerosas espículas espalhadas na superfície. Foi realizada uma comparação do genoma dos isolados virais utilizando a técnica de RT-PCR dupla. Foram utilizados os iniciadores B1, B2A, B3 e B4A para a proteína F que resultou na amplificação do fragmento no tamanho esperado, 481 pb. A análise desta sequência revelou 97% de identidade de nucleotídeos das sequências da proteína F do isolado BRSV-25-BR com as estirpes de BRSV armazenadas no GeneBank. A RT-PCR dupla utilizando os iniciadores B5A, B6A, B7A e B8 para a proteína G, amplificaram um fragmento do genoma viral do tamanho esperado, 371 pb. A porcentagem de identidade entre a sequência do BRSV-25-BR e o fragmento equivalente das estirpes armazenadas no GeneBank encontrada foram entre 92 e 95%. A sequência dos aminoácidos derivados da proteína G do isolado brasileiro comparado com as sequências dos isolados registrados no GeneBank sugere sua associação ao subgrupo B. A informação obtida nesta pesquisa a partir da sequência da proteína G permite afirmar que o isolado do Brasil é uma estirpe de BRSV diferente daquelas atualmente circulantes nas demais partes do mundo. Esta informação contribui para uma maior compreensão da epidemiologia e para o desenvolvimento de vacinas adequadas para o nosso meio.

O Brasil é um grande produtor de carne e possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, só perdendo para a Índia, país que, por dogma religioso, não explora comercialmente seu rebanho. É esperado que em 5 anos, o Brasil seja o maior exportador de carne do mundo. Atualmente sacrifica 28.483.700 cabeças por ano, 53% da produção da América do Sul (FAO, 1999).

De uma forma geral, o principal obstáculo enfrentado para a exportação de carne são as barreiras sanitárias levantadas pelos governos estrangeiros. Para controlar essa situação tem-se investido mais de 1 bilhão de dólares nos últimos anos, tanto no combate à febre aftosa como à tuberculose e brucelose no gado bovino. O panorama é otimista e prevê-se a erradicação da febre aftosa para o ano 2005. Simultaneamente, espera-se o aumento do consumo, dos atuais 36 quilos por ano até 45 quilos em 2010 (BRASIL, Ministério de Agricultura e Abastecimento, 2000).

Uma vez controladas as infecções que impedem as exportações, a atenção será voltada a outras infecções como a causada pelo vírus respiratório sincicial dos bovinos (Bovine Respiratory Syncytial Virus – BRSV). As doenças, causadas por vírus como o BRSV, estão mundialmente disseminadas causando grandes perdas econômicas na criação comercial do rebanho bovino, tanto por gastos em remédios e vacinas como por perda de peso e, em casos extremos, por morte do animal. Esta doença é considerada o principal problema de saúde em rebanhos de todo o mundo (LARSEN, 2000, VALARCHER *et al.*, 2001).

A situação dos rebanhos no Brasil, em relação ao BRSV, está sendo elucidada por trabalhos recentes, detectando-se uma alta soropositividade nas amostras vindas dos Estados do Sul e Sudeste do país (CAMPALANS & ARNS, 1997), surto da doença no Nordeste (PEIXOTO *et al.*, 2000) e também a presença de antígenos virais em tecidos de animais doentes (DRIEMEIER *et al.*, 1997; GONÇALVES *et al.*, 1993; FLORES *et al.*, 2000), o que sugere uma longa convivência dos rebanhos nacionais com a doença.

O BRSV é caracterizado por alta prevalência nos rebanhos bovinos, pelas sucessivas reinfecções e pela imunidade incompleta conferida pelos anticorpos maternos. As variações antigênicas do vírus também podem contribuir para a sua capacidade de

evasão dos mecanismos de defesa do sistema imune. Estas características sugerem que, similarmente ao vírus respiratório sincicial humano (HRSV), possa co-existir mais de um grupo viral. Desta maneira, o organismo adquiriria imunidade contra o vírus homólogo e imunidade parcial para o vírus heterólogo (LARSEN, 2000, VALARCHER *et al.*, 2001, PROZZI *et al.*, 1997).

Para aumentar o entendimento sobre essas questões é necessária uma análise molecular do BRSV, o que ajudaria para uma maior compreensão da epidemiologia e para o desenvolvimento de vacinas adequadas para o nosso meio.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o vírus isolado de amostras de secreção nasal de bezerros no Brasil, tanto morfológicamente, por microscopia eletrônica, como através de análises moleculares.

2.1. HISTÓRICO

O Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) foi primeiramente isolado na Suíça em 1969, descrito por PACCAUD & JACQUIER (1970), na Bélgica em 1975 por WELLEMANS & LEUNEN, no Japão por INABA *et al.* (1972) e nos Estados Unidos por ROSENQUIST (1974) e ROSSI & KIESEL (1974). No Brasil, GONÇALVES *et al.* (1993) detectaram o BRSV através do teste de imunofluorescência direta a partir de amostras de pulmão e traquéia de bovinos procedentes de matadouros no Rio Grande do Sul. CAMPALANS & ARNS (1994) realizaram estudos sorológicos de bovinos de diferentes Estados brasileiros através dos testes de ELISA e soroneutralização, detectando alta prevalência nas amostras estudadas.

2.2. ESTRUTURA VIRAL

O BRSV é um vírus RNA de fita simples de sentido negativo, pertencente ao gênero *Pneumovirus*, membro da família Paramyxoviridae. Morfologicamente o BRSV é um virion pleomórfico, geralmente filamentosos, medindo 80 a 500 nm com diâmetro médio de 200 nm. Possui uma membrana lipídica de 7 – 15 nm de espessura, derivada da célula hospedeira e coberta de projeções de 7 – 19 nm (Figura 1) (HALL, 2001). A maioria das partículas virais é incompleta e provavelmente não infecciosa (MALLIPEDDI, SAMAL, MOHANTY, 1990).

Quanto à composição genômica do vírus, sabemos que o vírus respiratório sincicial bovino possui 15.140 nucleotídeos no seu genoma e que codificam dez proteínas, oito estruturais e duas não estruturais (BUCHHOLZ, FINKE, CONZELMANN, 1999). Existem duas glicoproteínas maiores (G e F), fosfoproteínas (P), proteínas do nucleocápsideo (N), proteínas matrizes (M e M2), proteínas maiores (L) e proteínas menores (BAKER & VELICER, 1991). Recentemente foi seqüenciada a última das proteínas deste vírus, a proteína L (YUNUS, COLLINS, SAMAL, 1998; BUCHHOLZ *et al.*, 1999) completando assim a seqüência do BRSV.

Todos os peptídeos virais identificados no BRSV são muito similares aos descritos para HRSV (LARSEN, 2000, FURZE *et al*, 1997) e muitas proteínas do BRSV reagem cruzadamente com suas homólogas do HRSV, principalmente as proteínas estruturais F, P, M e N (FURZE *et al*, 1997, LERCH, STOTT, WERTZ, 1989). A proteína G, no entanto, não reage cruzadamente com o antisoro à proteína G do HRSV (LERCH *et al*, 1989).

As quatro proteínas virais que parecem induzir a maior resposta de anticorpos estão associadas com o envelope viral (G, F, M, M2) e são encontradas nas membranas plasmáticas das células durante a infecção. A glicoproteína F (fusão) é mais imunogênica que a glicoproteína G (“attachment”) e os anticorpos encontrados em infecções adquiridas naturalmente são principalmente contra a proteína F. Entretanto a proteína G tem se revelado como a proteína que determina a especificidade ao vírus e existem evidências da existência de subgrupos de BRSV baseados nessa glicoproteína.

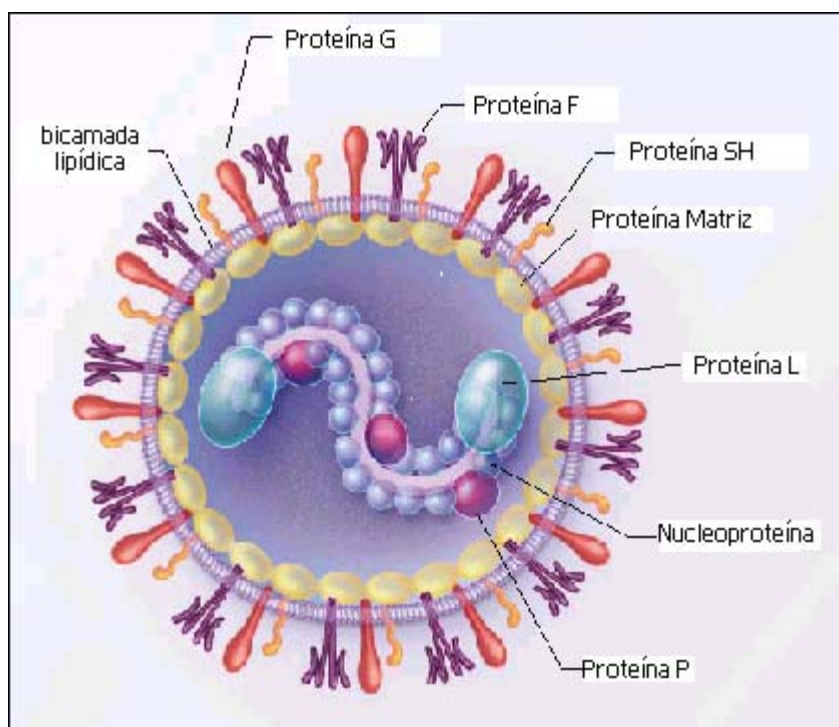


Figura 1: Estrutura do vírus respiratório sincicial (HALL, 2001).

2.3. SUBGRUPOS DE BRSV

O BRSV pode ser dividido em subgrupos antigênicos baseados na reatividade de anticorpos monoclonais (AcM) à proteína G (FURZE *et al*, 1994, FURZE *et al*, 1997, SCHRIJVER *et al*, 1996, LARSEN *et al*, 1998) e por sequenciamento de nucleotídeos da mesma proteína (FURZE *et al*, 1997, MALLIPEDDI & SAMAL, 1993, PROZZI *et al*, 1997, STINE *et al*, 1997, LARSEN *et al*, 1998).

Baseado nessa reatividade antigênica os isolados de BRSV são divididos em três subgrupos, designados A, B e AB. Esses subgrupos exibem consideráveis diferenças na reatividade com AcM, mas uma variabilidade de sequência relativamente pequena (até 15%) (LARSEN, 2000). Mesmo sendo pequena a variação antigênica responsável de determinar a classificação em subgrupos, as diferenças de aminoácidos que existem tem um profundo efeito no reconhecimento antigênico (FURZE *et al*, 1997). Assim, um único aminoácido trocado em certa posição dentro do nó de cisteína (na região entre os aminoácidos 174 e 210) tem consideráveis consequências estruturais e funcionais, determinando o subgrupo (LARSEN, 2000).

O significado biológico dos diferentes subgrupos de BRSV não tem sido determinado, mas é evidente a existência de algum grau de proteção cruzada (LARSEN, 2000).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

O BRSV está distribuído mundialmente, sendo endêmico em alguns países. A infecção é um evento muito comum indicado pela alta prevalência sorológica nos países, a saber: Canadá 79%, Estados Unidos entre 65 a 81% da população bovina, Inglaterra e País de Gales 100%, Uruguai 95% (AMES, 1993, PATON *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000).

O rebanho bovino é o principal hospedeiro do vírus, sendo que anticorpos contra o BRSV têm sido encontrados também em ovelhas, cabras, suínos e cavalos, sendo o papel do vírus nestas espécies ainda pouco claro (ALLAN *et al.*, 1998, FROLICH & FLACH, 1998, LARSEN, 2000).

O BRSV é muito semelhante ao Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) que causa bronqueolite viral e pneumonia em crianças. As proteínas do BRSV estão antigenicamente relacionadas às do HRSV, exceto a proteína “attachment” (G) (MALLIPEDDI, *et al*, 1990, MALLIPEDDI & SAMAL, 1993). Assim como em bezerros, as infecções com o HRSV são comuns na infância, principalmente em menores de um ano de idade, causando doença aguda. Já em adultos, os sintomas são de intensidade média. Repetidas infecções podem ocorrer, mas logo após a infecção inicial os sintomas posteriores que ocorrem nas reinfecções são menos graves (STINE, HOPPE, CLAYTON, 1997). Em ambos vírus, os anticorpos maternos não conseguem prevenir as infecções, além disso, os anticorpos contra BRSV proporcionados pelo colostro têm títulos menores durante os meses de inverno (VAN DER POEL *et al.*, 1999). O HRSV pode reproduzir a doença causada pelo BRSV em bezerros infectados experimentalmente, com sintomas brandos, mas não há relatos de infecção em humanos associada ao BRSV (LARSEN, 2000).

A transmissão ocorre principalmente por contato direto, já que o vírus é muito lábil. A partícula pode dispersar-se em secreções pulverizadas, por distâncias de até 2 metros e entrar nas vias respiratórias superiores de animais susceptíveis. Existem também evidências de transmissão aérea em condições experimentais (MARS *et al.*, 1999). A doença pode ser diagnosticada em qualquer época do ano, mas a ocorrência é maior no outono e inverno (VAN DER POEL, *et al.*, 1993, VALARCHER *et al.*, 2001). A mudança de temperatura parece ser fator que predispõe à infecção por BRSV (LARSEN, 2000).

A morbidade durante o surto é usualmente alta, mas varia dependendo da exposição prévia do rebanho. A forma mais grave de doença respiratória aparece em bezerros de 2 a 5 meses e a maior parte das infecções acontece em bezerros de até 18 meses de idade. O curto período de incubação (3-5 dias) facilita a rápida dispersão do vírus no rebanho. O vírus permanece no organismo de 2 a 11 dias após a infecção, com o ápice de multiplicação entre os dias 4 a 7 (LARSEN, 2000).

O quadro clínico da doença é muitas vezes acompanhado de pneumonias e freqüentemente seguido por infecções bacterianas secundárias (SHARMA & WOLDEHIWET, 1990, 1992, LARSEN, 2000) incluindo *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* e *Haemophilus somnus* (BELKNAP, 1993). Isto ocorre provavelmente, porque a

infecção com o BRSV altera as subpopulações de linfócitos e também a resposta destas células frente a outros antígenos, (VERHOEFF, WIERDA, BOON, 1988, McINNES *et al.*, 1999). Observou-se que o BRSV inoculado altera funções fagocíticas e bactericidas associadas a macrófagos alveolares (OLCHOWY, AMES, MOLITOR, 1994, SCHRIVER, 1998).

As reinfecções são comuns e acometem o gado com menor intensidade que a infecção primária. No entanto, estas reinfecções podem ser assintomáticas e resultar tanto da replicação viral após uma re-exposição ao vírus ou pela reativação de uma infecção persistente (VALARCHER *et al.*, 2001).

Outro ponto importante no combate à doença, é a detecção de animais portadores. A persistência do vírus numa população pode ser baseada na manutenção de um reservatório do vírus com uma baixa taxa de reinfecção durante o ano, ou em vírus alojados em animais portadores. Estudos *in vitro* indicam que BRSV foi capaz de replicar em linhas celulares de linfócitos B até seis meses depois da infecção (VALARCHER *et al.*, 2001). No caso do BRSV e do HRSV, até agora não têm sido encontrados indivíduos naturalmente infectados portadores do vírus. Um estudo prévio mostrou que reinfecções subclínicas ocorrem na primavera e no verão, isto pode ser indicativo que tais infecções são reativadas no outono ou inverno e atuam como fonte de um novo surto. (VAN der POEL *et al.*, 1997). Essa detecção se torna mais fácil com métodos altamente sensíveis.

2.5. SINTOMAS CLÍNICOS

Os sintomas clínicos desta enfermidade são semelhantes aos causados por outras doenças respiratórias, tais como o aumento da temperatura, apatia, inapetência, pneumonia intersticial, podendo evoluir para uma broncopneumonia, rinite e tosse. Devido a esses sintomas é difícil detectar a infecção no início, onde a doença produz uma sintomatologia de forma mais aguda e menos persistente (KIMMAN *et al.*, 1988; JACOBS & EDINGTON, 1975). Na forma aguda, o animal afetado apresenta tosse seca e dispnéia grave devido a edema e enfisema pulmonar, sendo notável a expiração abdominal (BELKNAP, 1993; WOOLUMS *et al.*, 1999).

A infecção pode durar de 3 a 10 dias, dependendo das infecções secundárias. Bezerros com infecção simultânea de BRSV e diarreia viral bovina (BVDV) desenvolvem sintomas mais graves da doença, como leucopenia, mantendo os vírus em maior concentração e por maior tempo nas secreções nasais, o que indica um efeito sinérgico entre esses vírus (BRODERSEN & KELLING, 1999; ELVANDER *et al.*, 1998a). Nos casos acompanhados de broncopneumonia, a mortalidade é elevada (PIRIE *et al.*, 1981). Aos exames de necrópsia, os tecidos se caracterizam por apresentarem áreas com falta de dilatação nos bronquíolos necrosados. As complicações incluem edema intersticial, enfisema intersticial e uma pneumonia catarral ou fibrinosa causada por uma invasão bacteriana secundária. A quantidade de gás presente no sangue indica uma intensa hipóxia em bezerros afetados (SHARMA & WOLDEHIWET, 1990a, 1992).

2.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da infecção pelo BRSV está baseado nos sintomas clínicos, achados de necrópsia e análises de laboratório convencionais (sorologia, detecção de antígenos virais, isolamento viral) e, recentemente, por testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BELAK & BALLAGI PORDANI, 1993, VILCEK, *et al.*, 1994).

O teste sorológico padrão para anticorpos específicos contra BRSV é o teste de soroneutralização em cultura de células (SN), realizado em microplacas e leva em média de 5 a 7 dias (DUBOVI, 1993). Outros testes, como a fixação de complemento, imunofluorescência (IF) para a detecção de anticorpos e a imunodifusão têm sido desenvolvidos, porém com pouca utilização (DUBOVI, 1993).

A boa sensibilidade, aliada à rapidez no diagnóstico, indica que os testes de ELISA e PCR são mais adequados para aplicações clínicas que o isolamento viral (WEST *et al.*, 1998; GRAHAM *et al.*, 1998). O isolamento não é um procedimento recomendado para diagnóstico clínico do BRSV visto que amostras contendo altas concentrações de antígeno viral raramente permitem a replicação viral *in vitro* mesmo em sistemas celulares

sensíveis. Além disso, o transporte das amostras clínicas reduz notavelmente a sensibilidade do isolamento viral (WEST *et al.*, 1998). Na maioria dos casos, o isolamento do BRSV é obtido com sucesso durante procedimentos de isolamento para outros patógenos e não especificamente para BRSV (DUBOVI, 1993).

Diferentes ensaios imunoenzimáticos tem sido desenvolvidos para a detecção do BRSV, mas a confiabilidade e segurança nos resultados do ensaio dependem dos reagentes, especialmente da sensibilidade e especificidade do anticorpo anti-BRSV usado (LARSEN, 2000). O uso de ELISAs específicos a um isotipo proporciona uma alternativa de diagnóstico interessante, já que os anticorpos maternos em bezerros são sempre do isotipo IgG1, portanto a presença de outros isotipos, pode ser um indicativo de uma infecção ativa de BRSV (LARSEN, 2000).

Os métodos de SN e ELISA para diagnóstico de BRSV são sensíveis, mas no caso da SN a limitação é a demora para a obtenção do resultado, o que não ocorre no ELISA que é um método sensível e rápido. O maior problema ocorre na obtenção do antígeno, pois, pelos baixos títulos, são necessárias grandes quantidades de vírus para a sensibilização das placas e a realização do teste, tornando muitas vezes o procedimento difícil de ser realizado. Futuramente, com os avanços nos estudos sobre o BRSV e conhecimentos das estirpes em circulação, será interessante a utilização de peptídeos como antígenos no diagnóstico sorológico de infecções, técnica que viria solucionar os problemas de obtenção de antígeno em condições adequadas, pois os peptídeos são relativamente baratos e fáceis de produzir, facilitando a padronização e reprodutividade da técnica. Até agora, métodos moleculares estão sendo uma boa alternativa para o diagnóstico presuntivo da doença, pois além de serem rápidos, não necessitam do vírus viável para obter-se resultados positivos (LANGEDIJK *et al.*, 1996).

Se o diagnóstico não foi realizado durante o período de vida do animal, a informação obtida após a necrópsia através do exame histopatológico pode ser útil. Os achados de necrópsia indicam uma pneumonia intersticial difusa com enfisema e edema intersticial. Em muitos casos a patologia viral é associada à áreas de infecções bacterianas secundárias. Os pulmões podem conter numerosas áreas hemorrágicas e com necrose celular epitelial. Inclusões intracitoplasmáticas estão presentes nas células infectadas (DUBOVI, 1993).

2.7. TRATAMENTO E CONTROLE DA INFECÇÃO

O tratamento indicado após o diagnóstico da doença é tratamento sintomático e pode ser realizado por terapias antimicrobianas (para tratamento de infecção bacteriana secundária), aplicação de anti-histamínicos e terapia antiinflamatória. Futuramente poderão ser úteis a terapia anti-viral, terapia imunomoduladora e imunização passiva. A prevenção é baseada em vacinas, em particular para esse vírus ou em combinação com outros vírus respiratórios (KELLING, 1993).

A imunidade adquirida por infecções naturais não previne a reinfecção, razão pela qual a meta da vacinação é prevenir a expressão clínica da enfermidade. Embora não seja possível prevenir a infecção e reinfecção por vacinação, é possível diminuir a gravidade da doença. (BAKER & VELICER, 1991). Existem vacinas produzidas com vírus atenuados (VA) e vírus inativados. As vacinas com VA produzem uma maior resposta de anticorpos neutralizantes e com duração mais longa do que vacinas inativadas, mas têm o potencial de reverter a uma forma virulenta e causar a doença clínica (KELLING, 1993; ELLIS *et al.*, 1992). A vacina inativada geralmente tem capacidade limitada para produzir a resposta das células T citotóxicas, as quais têm um importante papel na recuperação e resistência à reinfecção. Por outro lado, vacinas VA não são efetivas em bezerros com anticorpos maternos, porque estes interferem a resposta imune e limitam a replicação do vírus vacinal no hospedeiro. Esta interferência pode ser evitada, vacinando os animais próximo aos seis meses de idade, quando os anticorpos maternos declinam (KELLING, 1993). Porém, é muito importante desenvolver um tipo de vacina que induza imunidade ativa na presença de imunidade passiva, devido à maior gravidade da doença associada ao BRSV na faixa etária precoce (BAKER & VELICER, 1991). Vacinas apropriadas devem proteger na presença de anticorpos maternos e contra todos os subtipos (LARSEN, 2000). Vacinas baseadas em DNA podem ser úteis no futuro, mas estão ainda na fase experimental (SCHRIJVER *et al.*, 1997).

- 3.1.** Caracterização morfológica da estirpe brasileira do BRSV, utilizando técnica de contrastação negativa em microscópio eletrônico de transmissão.
- 3.2.** Padronizar as condições de execução da técnica de RT-PCR dupla para um fragmento do genoma da proteína de fusão F e da proteína de adesão G dos isolados de BRSV.
- 3.3.** Análise do fragmento da proteína F das estirpes de BRSV, amplificado pela RT-PCR dupla, e posterior análise deste através do emprego da enzima de restrição *Sca I*
- 3.4.** Seqüenciamento parcial e análise dos fragmentos amplificados do genoma da proteína G da estirpe de BRSV brasileira.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia e no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas-SP.

4.1. CÉLULAS, VÍRUS E MEIO DE CULTURA

Foram utilizados três isolados de vírus respiratório sincicial bovino a saber:

- **BRSV-25-BR** (isolado no Brasil), este isolado foi obtido de amostras de secreções nasotraqueiais coletadas de animais vivos, procedentes de rebanhos dos Estados do Sul e Sudeste do Brasil. O isolado BRSV-25-BR foi tomado de um bezerro Holstein de dois meses de idade, no Estado de Rio Grande do Sul, próximo da fronteira da Argentina e Uruguai. O animal apresentava tosse, secreção nasal e dispnéia grave.

- **BRSV-88**, procedente da Alemanha e

- **Lehmkuhl 375**, procedente dos Estados Unidos da América.

As duas últimas estirpes isoladas de secreções nasais provenientes de bovinos. Como controle negativo foi utilizada uma amostra de pneumovírus aviário, SHS-121-BR, vírus do mesmo gênero que o BRSV, isolado de aves com doença respiratória (ARNS & HAFEZ, 1995).

Os isolados virais foram propagados em monocamadas de células CER (“Chicken Embryo Related”), as quais foram cultivadas em garrafas de 125 cm² (“Corning”) com 2x10⁵ células/mL (concentração inicial) em meio mínimo essencial Eagle (MMEE-Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (SIGMA®) ou soro equino (Nutricell®) por 24 h a 37° C.

Após o tempo necessário para o desenvolvimento do efeito citopático viral característico do BRSV, ou seja, a formação de sincícios e degeneração das monocamadas, as garrafas foram congeladas a -70° C (aproximadamente 5 dias pós-inoculação).

4.2. PURIFICAÇÃO VIRAL

A suspensão viral obtida como foi descrito no item 4.1, foi tratada seguindo os procedimentos descritos por GOUGH & COLLINS, (1989), ou seja, foi centrifugada a 30.000 x g por uma hora a 4° C (Centrífuga Beckmann modelo L 2-21) e o sedimento obtido foi ressuspensão em aproximadamente 2% do volume inicial para cada amostra viral, em tampão TRIS-Cálcio (0,01 M, pH 7,2). O concentrado viral foi cuidadosamente adicionado sobre um gradiente descontínuo de sacarose (Merck®). Para o gradiente foram utilizados 7mL de sacarose em concentração de 30% (p/p) e 2mL em concentração de 55% (p/p), preparadas a partir de uma solução estoque de 66% em tampão 0,01 M TRIS-Cálcio.

O vírus foi sedimentado a 53.000 x g por uma hora e meia a 4° C (Ultra-centrífuga Beckmann modelo L 8-80 M, rotor SW41). Em seguida, com o auxílio de uma seringa de 3mL, foi retirada a banda viral localizada na junção entre as concentrações de 30% e 55%.

A fração colhida foi novamente sedimentada por centrifugação a 30.000 x g por uma hora a 4° C e o sedimento ressuspensão em tampão TRIS-Cálcio, aproximadamente em 0,5 % do volume inicial, e armazenado a -70° C em alíquotas de 100µL.

Além desse método foi também usado o método da precipitação por polietilenoglicol (MAYR et al, 1977), o método do cloreto de cério (MAYR et al, 1989) e o método da dupla centrifugação desenvolvido em nosso laboratório.

O método da dupla centrifugação foi eleito pois o vírus foi mais bem detectado no sobrenadante da amostra, depois da primeira centrifugação a 30.000 x g. Para concentrar o vírus e eliminar a maior parte dos contaminantes celulares, realizou-se a centrifugação em duas etapas, ou seja: uma primeira a 30.000 x g durante 30 minutos, fundamentalmente para eliminar restos (debris) celulares; posteriormente, o sobrenadante foi novamente centrifugado na mesma velocidade porém, durante duas horas para a sedimentação viral. Os resultados foram conferidos mediante avaliação da concentração protéica pela técnica de LOWRY *et al*, (1951) utilizando soroalbumina bovina como padrão (Sigma®) e usando um espectrofotômetro (Espectrophotometer Beckman DU-65), por titulação viral e microscopia eletrônica.

4.3. TITULAÇÃO VIRAL

Foram utilizadas monocamadas de células com 24 horas de crescimento a 37 °C, em microplacas de 96 cavidades (Corning®). O inóculo constou de 0,05 mL de cada diluição (\log_{10} de 10^{-1} a 10^{-8}) da amostra viral em MMEE com oito repetições. Após duas horas de adsorção viral a 37 °C, o inóculo foi eliminado, as monocamadas lavadas com PBS (NaCl 8g; KCl 0,2g; Na₂HPO₄ 12H₂O 2,9g; KH₂PO₄ 0,2g; H₂O desmin./bidest. q.s.p. 1000 mL; pH 7.2) e em seguida, adicionou-se 0,05 mL de MMEE com 2% de SFB a cada cavidade. A incubação foi realizada em estufa de atmosfera úmida de CO₂ a 37 °C (Forma Scientific) durante 5 dias. O DICC₅₀ foi calculado pelo método de REED & MUENCH, (1938).

4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Foi utilizado o método descrito por BARTH, 1984, utilizaram-se grades de cobre revestidas com formvar a 4% (Sigma®), da seguinte maneira: foram depositados 200µL de formvar 4% num colchão de água, as grades foram colocadas em cima do formvar pelo lado opaco do material, retiradas cuidadosamente com a ajuda de parafilme, o qual adere-se nas grades sem alterar a película depositada nelas, submetidas a secagem em temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, foi depositada uma alíquota de 20µL da amostra viral numa superfície de parafilme. A grade, previamente sensibilizada foi colocada em contato com a gota da amostra durante 2 minutos, e posteriormente secada durante 10 minutos para, em seguida, ser acrescentado o contrastante. Todas as amostras foram feitas em duplicata para testar dois contrastantes diferentes, a saber: ácido fosfotúngstico (AFT) a 2% e molibdato de amônia a 2%, os quais foram impregnados na grade pelo método descrito acima. As grades foram tratadas num banho de carbono e guardadas à temperatura ambiente até o momento de uso. As preparações foram observadas em microscópio de transmissão (Zeiss EM modelo 900), no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas (SP).

4.5. RT-PCR DUPLA ("NESTED")

4.5.1. Extração do RNA

A suspensão viral foi obtida de cultura de células CER que apresentavam aproximadamente 50 % de efeito citopático, ao redor do 4º dia após inoculação do vírus. A camada celular foi raspada e essa suspensão foi centrifugada a 3000 rpm durante 12 minutos. O sedimento foi dissolvido com tiocianato de guanidina-fenol (Trizol LS, Invitrogen®) no volume de 1 mL para 5×10^6 células. A mistura foi transferida para tubos de microcentrífuga esterilizados e livres de RNAses que foram mantidos 5 minutos à temperatura ambiente. Depois foram acrescentados 200µL de clorofórmio gelado para cada mililitro de trizol usado. As amostras foram agitadas vigorosamente durante 15 segundos e deixadas repousar por 3 minutos à temperatura ambiente. Depois de centrifugá-las por 15 minutos a $12.000 \times g$ a 4º C, a fase transparente resultante, contendo o RNA total, foi transferida para outro tubo de microcentrífuga esterilizado e livre de RNAses. Foram acrescentados 500µL de isopropanol gelado para precipitar o RNA. Depois de homogeneizada, a mistura foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente e novamente centrifugada por 10 minutos a $12.000 \times g$ a 4º C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1mL de etanol 70º em água contendo 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC). Logo após, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 11.600 rpm a 4º C. O sobrenadante foi descartado e depois de secar, o sedimento foi diluído em 25µL de água com DEPC e mantido 10 minutos a 55º C para inibir qualquer RNase residual.

4.5.2. Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, foram seguidas as instruções do fabricante do “kit” utilizado (Superscript II para RT-PCR, Invitrogen®), a saber: para 20µL de volume de reação foram usados 5µL do RNA total, obtido no item anterior. Em um tubo de microcentrífuga esterilizado e livre de RNAses, foram depositados 5µL do RNA total, 1µL do iniciador B2A para a proteína F (Tabela 1) ou B6A para a proteína G (Tabela 2) e água destilada esterilizada com 0,1% de DEPC até completar 12µL. A mistura foi aquecida a 70º

C por 10 minutos e esfriada em gelo. Logo após, foram acrescentados 4µL de tampão 5X [250mM Tris-HCl (pH 8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂], 2µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M, 1µL de dNTP 10mM (10mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e a mistura foi incubada a 42° C durante dois minutos. Em seguida, foi acrescentado 1µL da enzima transcriptase reversa (Superscript II, 200 unidades, Invitrogen®), a mistura foi incubada 50 minutos a 42° C e a reação inativada a 72° C durante 15 minutos. O cDNA assim obtido, foi usado como molde para a amplificação por PCR.

4.5.3. Reação da RT-PCR para a proteína F

Para um volume final de 50µL, foram acrescentados num tubo de microcentrífuga esterilizado, os seguintes reagentes: 5µL tampão PCR 10X [200mM Tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl]; 2 µL dNTP 10mM; 1 µL iniciador B1 (10µM); 1µL iniciador B2A; 0,3µL da enzima Taq DNA polimerase [5U/µl (Invitrogen®)]; 2µL cDNA e água destilada esterilizada com DEPC até alcançar o volume final. A mistura foi coberta com uma gota de óleo mineral e aquecida por 3 minutos a 94° C para desnaturar. A amplificação foi realizada num termociclador PTC-100 (MJ Research®, Inc.). Cada ciclo de amplificação consistiu em denaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e alongamento a 72° C por 1 e 1/2 minutos, com 35 ciclos de amplificação.

A segunda PCR foi realizada utilizando 2µL do produto da primeira PCR, substituindo os iniciadores por B3 e B4A. O ciclo de amplificação foi o mesmo da primeira reação de PCR e também foram realizados 35 ciclos de amplificação. O último ciclo de alongamento foi prolongado por 7 minutos em ambas reações de PCR. O produto resultante foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 1% usando 0,5 X de tampão TBE [1M Tris base, 1M ácido bórico e 20mM de EDTA (TBE 20 X)]. Alíquotas de 6µL misturadas com 2µL de azul de bromofenol, como indicador, foram depositadas no gel junto com um padrão de fragmentos de 100 pares de bases(100 bp DNA Ladder, Invitrogen®). As alíquotas foram corridas a 90 V durante 30 minutos. As bandas coradas com brometo de etídio foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com uma câmara Polaroid DS 34.

Tabela 1: Descrição dos iniciadores utilizados para a proteína F (VILCEK et al., 1994).

Iniciador	Seqüência (5'→3')	Posição	Tamanho (pb)
B1	AATCAACATGCAGTGCAGTTAG	114-135	711
B2A	TTTGGTCATTTCGTTATAGGCAT	824-803	
B3	GTGCAGTTAGTAGAGGTTATCTTAGT	126-151	481
B4A	TAGTTCCTTTAGATCAAGTACTTTGCT	606-581	

4.5.4. Reação da RT-PCR para a Proteína G

A reação da RT-PCR para a proteína G foi realizada da mesma maneira, utilizando-se os iniciadores B5A e B6A (Tabela 2) e o ciclo de amplificação consistiu em denaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 55° C por 1 minuto e alongamento a 72° C por 1 e 1/2 minutos. Foram realizados 35 ciclos de amplificação.

A segunda PCR foi realizada utilizando 4µL do produto da primeira PCR, substituindo os iniciadores por B7A e B8 (Tabela 2). O ciclo de amplificação consistiu em denaturação a 94° C durante 30 segundos, anelamento a 62° C por 45 segundos e alongamento a 72° C por um minuto. Também foram realizados 35 ciclos de amplificação. O produto resultante foi submetido à eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições que para o produto da PCR da proteína F.

Tabela 2: Descrição dos iniciadores utilizados para proteína G (VILCEK *et al.*, 1994).

Iniciador	Seqüência (5'→3')	Posição	Tamanho (pb)
B5A	CCACCCTAGCAATGATAACCTTGAC	110-134	603
B6A	AAGAGAGGATGC(T/C)TTGCTGTGG	712-691	
B7A	CATCAATCCAAAGCACCACACTGTC	281-305	371
B8	GCTAGTTCTGTGGTGGATTGTTGTC	651-627	

4.6. CLIVAGEM DO PRODUTO DA RT-PCR COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

O produto não purificado da RT-PCR dupla foi digerido, utilizando-se a enzima de restrição *Sca I*. Tal enzima corta o DNA nas regiões de sequência AGT/ACT. O tampão de clivagem (200mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) suplementado com a enzima foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 0,5 a 1mg de DNA foi digerido com 10U da enzima, a 37° C, durante 12 horas. O produto da RT-PCR com os fragmentos clivados foi submetido a separação por eletroforese em gel de agarose a 2,5% usando 0,5 x TBE (20 x TBE e 1M Tris base, 1M ácido bórico e 20mM EDTA) como tampão de corrida. Seis microlitros das amostras, acrescentadas de 2µL de azul de bromofenol como indicador, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 90 V durante 30 minutos. As bandas obtidas foram coradas com brometo de etídio, visualizadas por luz ultravioleta e fotografadas com uma câmara Polaroid DS 34.

4.7. SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DAS PROTEÍNAS G E F

Realizou-se o sequenciamento parcial da amostra brasileira BRSV-25-BR a partir dos fragmentos amplificados pela RT-PCR dupla que apresentou o padrão eletroforético esperado (481 pb para a proteína F e 371 pb para a proteína G). O produto da RT-PCR foi purificado baseado nos métodos de SANGUER, NICKLEN, COULSON, 1977, como indicado a seguir.

4.7.1. Purificação do produto da RT- PCR

Para a purificação do produto da RT-PCR foram utilizadas duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease e a fosfatase alcalina de camarão. A uma alíquota de 5µL de reação da RT-PCR foram adicionadas 10 unidades da enzima exonuclease em tampão 20mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM 2-mercaptoetanol e 50% glicerol e 2 unidades de fosfatase alcalina de camarão em tampão 25mM Tris-HCl, pH 7,6; 1mM de MgCl₂; 0,1mM de ZnCl₂ e 50% de glicerol. Esta mistura foi incubada a 37° C, para atuação das enzimas, e logo a 85° C por 15 minutos, para a inativação das mesmas. Esta mistura foi distribuída em tubos

contendo 2µL do nucleotídeo master mix (dITP) e 0,5µL de ddNTP (G, A, T, C) marcado com fósforo 33 (Amershan®).

Em outro tubo, colocou-se 1µL da PCR tratada, 2µL do tampão de reação (260mM Tris-HCl, pH 9,5; 65mM MgCl₂), 1µL do iniciador, 2µL da enzima Thermo Sequenase DNA polimerase e água para completar 17,5µL. Foram transferidos 4µL dessa solução para quatro tubos contendo dideoxinucleotídeo (G, A., T, C), homogeneizando-se com os 2,5µL da mistura de terminação. As reações foram colocadas em termociclador e submetidas a uma pré-denaturação de 5 minutos a 94° C e 35 ciclos envolvendo denaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto. A interrupção da reação foi levada a efeito pela adição de 4µL da solução “stop” (formamida a 95%, 20mM EDTA; 0,05 bromofenol azul; 0,05 xilenocianol).

4.7.2. Eletroforese em gel desnaturante (Seqüenciamento manual)

Foi realizada a eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida a 6% (acrilamida 5,7g; bisacrilamida 0,3g; uréia 42g, taurina 8X) em placas de 35 x 50cm e 0,4mm de espessura (aparato Bio Rad®) por 1 a 3 horas a 70 a 90 W. O tampão de corrida foi o mesmo utilizado na preparação do gel (taurina 1x). A auto-radiografia foi obtida após a exposição do gel seco em filme de raios X por aproximadamente 24 a 72 horas à temperatura ambiente (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989).

4.7.3. Seqüenciamento automático e análise de seqüências

Os fragmentos amplificados também foram seqüenciados utilizando o seqüenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Biosystems®). Os procedimentos de purificação foram realizados com o uso do “kit” QIAquick PCR Purification kit (Quiagen®) e o produto purificado foi seqüenciado em ambos sentidos com os mesmos iniciadores do RT-PCR dupla, com o “kit” ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Biosciences®), segundo as instruções do fabricante. As amostras assim seqüenciadas foram alinhadas com as seqüências armazenadas no GeneBank, usando-se o programa de busca de ALTSCHUL, *et al.* (1997).

5.1. PURIFICAÇÃO E MORFOLOGIA VIRAL

As características morfológicas do isolado viral brasileiro utilizado neste estudo foram determinadas por observações ao microscópio eletrônico. Paralelamente foram observadas as suspensões virais resultantes de quatro técnicas de purificação viral utilizadas. Utilizando a técnica de gradiente descontínuo de sacarose, as impurezas foram retidas na camada superior e a fração de maior concentração de sacarose (inferior) apresentava-se praticamente pura, comprovando-se a eficiência do método para eliminar impurezas e concentrar as partículas virais na camada média. O método de purificação utilizando as técnicas do polietilenoglicol (PEG) e do gradiente contínuo de Cloreto de Césio, mostraram também uma boa eliminação de restos celulares, mas ocorreu grande destruição das partículas virais, justificando os resultados da titulação viral obtidos, os quais indicavam uma queda no título viral após a purificação do vírus (Tabela 3). Usando o método da dupla centrifugação, as amostras mostravam muitos restos celulares e baixo título viral. Este método permitiu obter uma quantidade um pouco maior de proteínas por mililitro de solução quando comparado com os outros métodos descritos anteriormente. Contudo, esta foi a técnica de purificação que melhor manteve a estrutura da partícula viral.

Tabela 3: Título viral das amostras purificadas (DICT50/ml).

Amostra viral	Sem purificar	Gradiente de sacarose	PEG	Cloreto de Césio	Dupla centrifugação
BRSV-25	5,3	2,3	0	Nt	3,5
BRSV-88	4,8	2,3	0	Nt	3, 1
Lehmkuhl 375	5,0	2,8	0	Nt	3.2

- Nt: não testado

Na figura 2 podemos apreciar a estrutura viral arredondada, pleomórfica e de tamanho aproximado de 100 a 300 nm, com numerosas espículas espalhadas pela superfície do virion, estrutura que está de acordo com a morfologia esperada para uma amostra de BRSV (MALLIPEDDI *et al.*, 1990, LARSEN, 2000). Depois de analisadas ao microscópio eletrônico, todas as suspensões virais obtidas nos diferentes métodos de purificação testadas, comprovam que a amostra que apresentou os melhores resultados em relação à concentração de vírus e integridade do mesmo foi aquela purificada pelo método da dupla centrifugação e contrastada com molibdato de amônia. O método preservou grandemente a estrutura das partículas virais o que se refletiu num maior título.

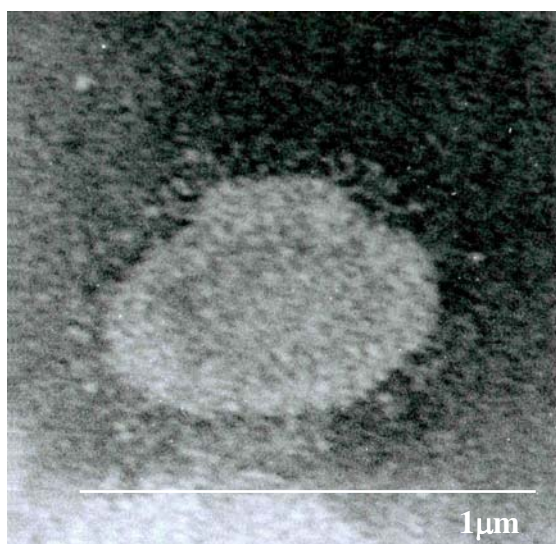


Figura 2: Microfotografia eletrônica do vírus BRSV-25-BR, purificado pelo método da dupla centrifugação, sob contrastação negativa com molibdato de amônia, aumento 77.500 x 2,5x. Pode-se apreciar a morfologia pleomórfica do vírus e a presença de espículas espalhadas por toda a superfície da partícula viral.

5.2. RT-PCR DUPLA

5.2.1. Proteína G

As três amostras de vírus BRSV, mais a amostra controle negativo, foram propagadas em cultura de células CER. Todas as amostras foram submetidas à extração do RNA e produção de cDNA, como foi indicado na seção material e métodos.

Posteriormente, foi realizado o primeiro PCR com os iniciadores B5A e B6A (Tabela 2) (VILCEK *et al.*, 1994). O material amplificado foi novamente submetido a uma segunda PCR (RT-PCR dupla) com os iniciadores B7A e B8, resultando numa ampliação do genoma viral de 371pb (Figura 3). A reação da RT-PCR mostra que os iniciadores selecionados amplificaram um fragmento do mesmo tamanho nas três amostras de BRSV e os mesmos não foram capazes de amplificar qualquer segmento no vírus controle negativo.

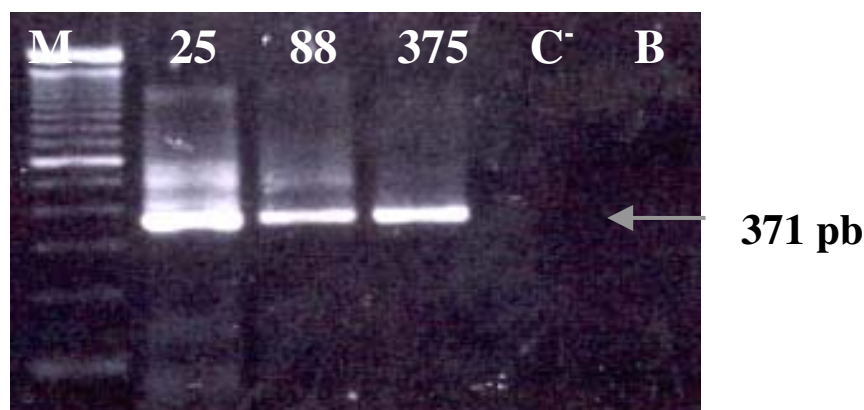


Figura 3: Produto da reação RT-PCR dupla para a proteína G, usando os iniciadores B7A e B8. Região amplificada de 371pb do gene G do vírus respiratório sincicial bovino **M**: Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, Invitrogen®); **25** : BRSV-25-BR; **88**: BRSV-88; **375**: Lehmkuhl 375; **C**: Pneumovírus aviário SHS-121-BR (controle negativo); **B**: Branco.

5.2.2. Proteína F

A amplificação do segmento do genoma da proteína F foi feita segundo as indicações dadas na seção Material e Métodos, ou seja, depois de propagadas em células CER, as amostras de BRSV e a amostra para controle negativo (SHS-121-BR) foram raspadas da garrafa de cultura e centrifugadas a baixa velocidade. O sedimento foi utilizado para a extração do RNA, produção de cDNA e as posteriores etapas da RT-PCR dupla, a qual foi realizada com os respectivos iniciadores, B1 e B2A na primeira PCR e B3 e B4A na segunda PCR (Tabela 1). Estes iniciadores amplificaram um fragmento da proteína F de 481pb (Figura 4) em todas as amostras do vírus bovino. A amostra de controle não amplificou nenhum fragmento.

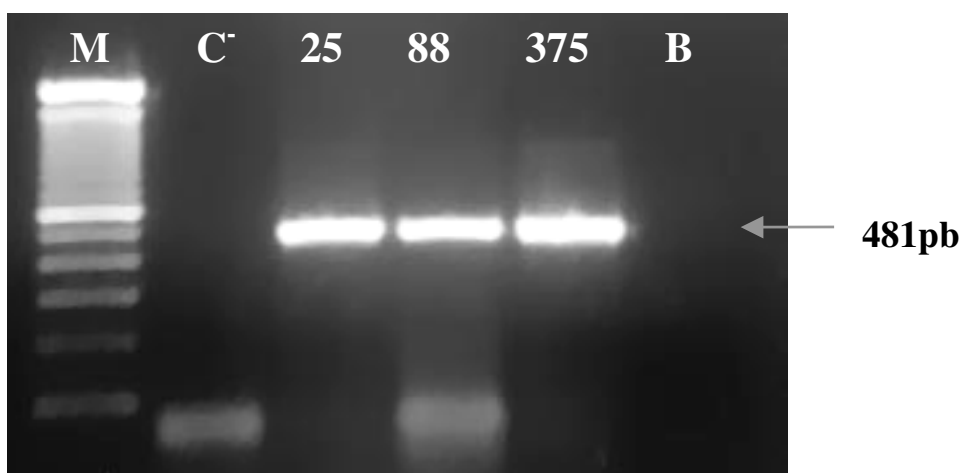


Figura 4: Produto da reação RT-PCR dupla para a proteína F, usando os iniciadores B3 e B4A. Região amplificada de 481pb do gene F do vírus respiratório sincicial bovino **M:** Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, Invitrogen®); **25:** BRSV-25-BR; **88:** BRSV-88; **375:** Lehmkuhl 375; **C:** Pneumovírus aviário SHS-121-BR (controle negativo); **B:** Branco.

5.3. CLIVAGEM DO PRODUTO DA RT-PCR COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Os produtos da RT-PCR dupla para a proteína F, ou seja, os fragmentos de 481pb do gene F de cada amostra, foram digeridos com a enzima de restrição *Sca I*. A digestão produziu dois fragmentos com tamanhos aproximados de 105 pb e 375 pb. Estes dois fragmentos apareceram em todas as amostras testadas (Figura 5), mostrando que os três isolados possuem uma sequência de bases idêntica (AGT/ACT) e localizada no mesmo lugar.

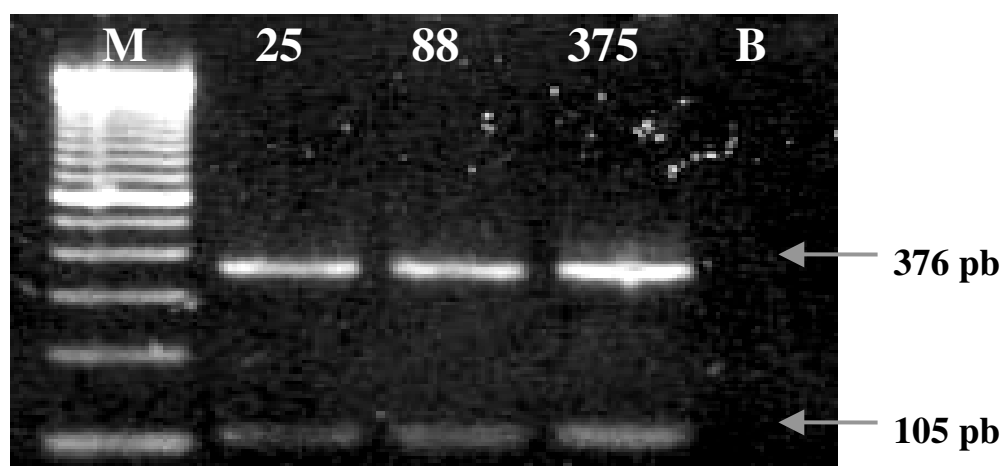


Figura 5: Produto da Reação RT-PCR dupla para a Proteína F do vírus respiratório sincicial bovino, clivado com enzima *Sca I*. **M:** Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, Invitrogen®); **25:** BRSV-25-BR; **88:** BRSV-88; **375:** Lehmkuhl 375; **B:** Branco.

5.4. SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DAS PROTEÍNAS G E F

Foram seqüenciados e analisados dois fragmentos genômicos do isolado BRSV-25-BR. Estes fragmentos pertenciam às proteínas F e G. Em ambos casos, para o mesmo produto amplificado, foram aplicados a técnica de SANGUER *et al.* (1977) e a técnica de seqüenciamento automático. As duas técnicas não apresentaram diferenças marcantes, exceto pelo fato que o segmento seqüenciado manualmente foi um pouco menor

pelas dificuldades em elucidar as seqüências localizadas nos extremos do fragmento amplificado. O seqüenciamento do segmento amplificado do gene G pode ser visualizado na Figura 6.

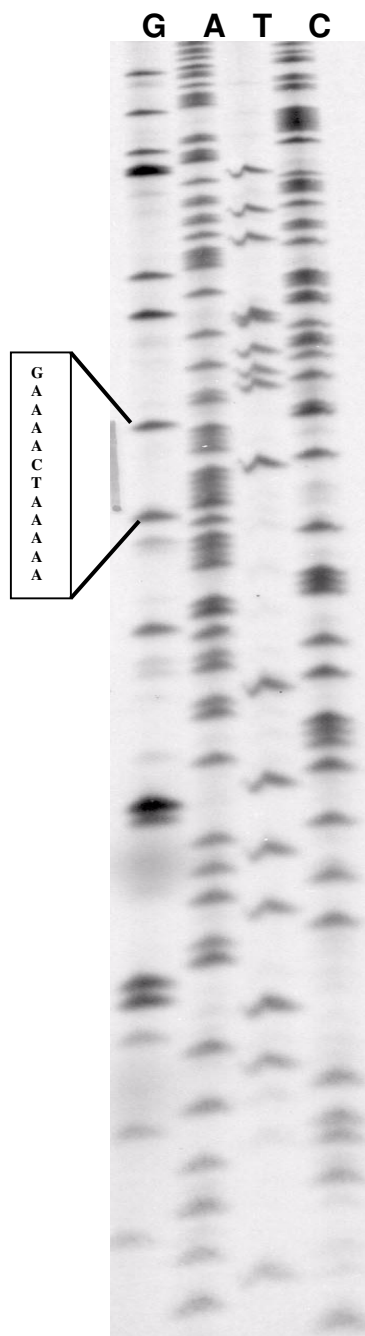


Figura 6: Seqüenciamento manual parcial do fragmento amplificado do gene G em gel de poliacrilamida 6%, usando metodologia de SANGER *et al.*, 1977. Autoradiografia em filme de raios X com 72 horas de exposição.

5.4.1. Proteína F

O fragmento sequenciado corresponde ao segmento da proteína F (fusão) de 428 nucleotídeos. A sequência obtida para o fragmento da proteína F de 428 pb amplificado está localizada entre as bases 177-605 do genoma da proteína F da amostra BRSV-25-BR (Figura 7 e 8).

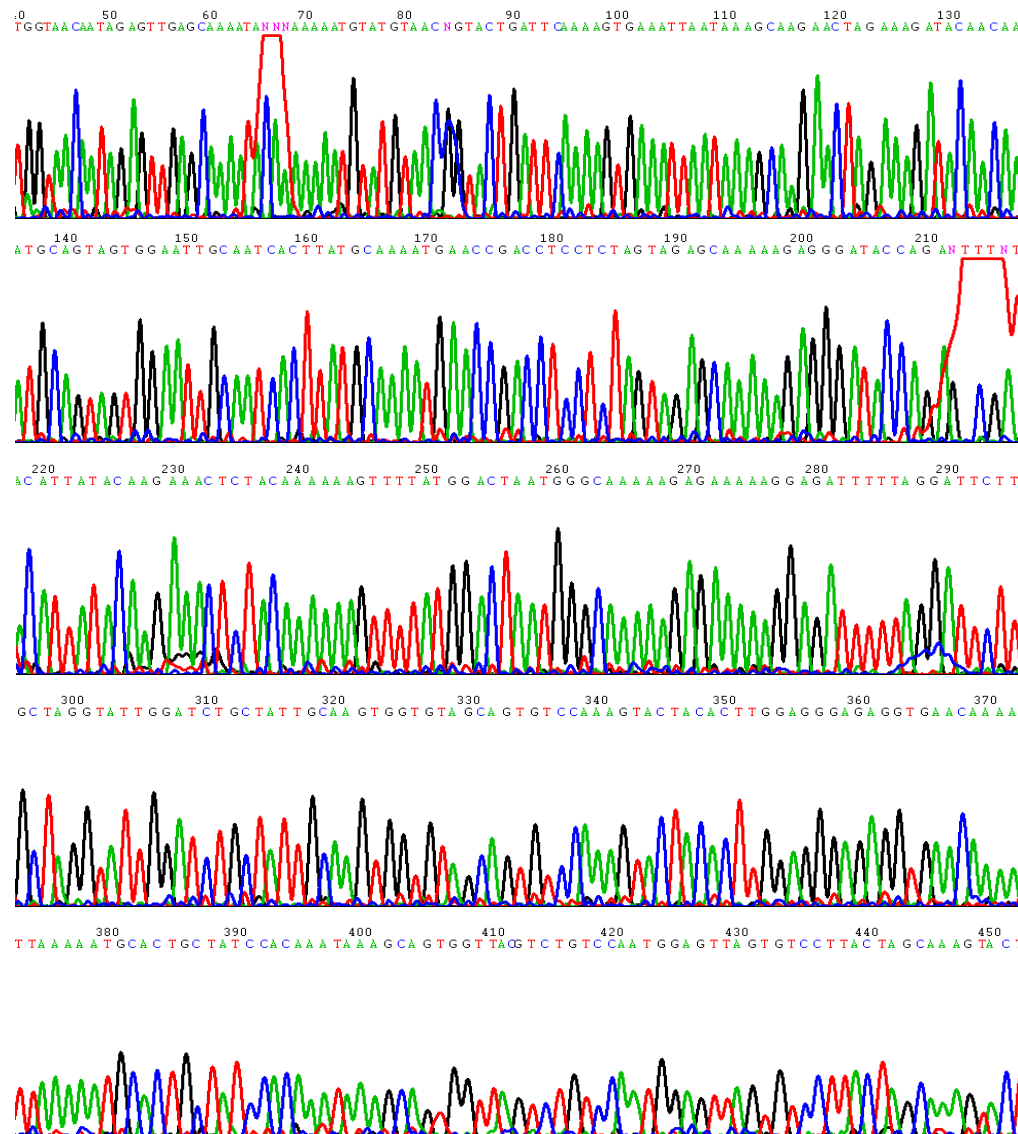


Figura 7: Eletroferogramas do sequenciamento do fragmento amplificado da proteína F do isolado BRSV-25-BR com o iniciador B3, direto.


```
177-CGT  GGTAACAATA  GAGTTGAGCA  AAATACAAAA  AAATGTATGT
AACCGTACTG  ATTCAAAAGT  GAAATTAATA  AAGCAAGAAC  TAGAAAGATA
CAACAATGCA  GTAGTGGAAT  TGCAATCACT  TATGCAAAAT  GAACCGACCT
CCTCTAGTAG  AGCAAAAAGA  GGGATACCAG  AGTCGATACA  TTATACAAGA
AACTCTACAA  AAAAGTTTTA  TGGACTAATG  GGCAAAAAGA  GAAAAAGGAG
ATTTTTAGGA  TTCTTGCTAG  GTATTGGATC  TGCTATTGCA  AGTGGTGTAG
CAGTGTCCAA  AGTACTACAC  TTGGAGGGAG  AGGTGAACAA  AATTAAAAAT
GCACTGCTAT  CCACAAATAA  AGCAGTGGTT  ACGTCTGTCC  AATGGAGTTA
GTGTCCTTAC  TAGCAAAGTA CTTGATCTAA AGAAC-605
```

Figura 8: Sequência do fragmento do genoma da proteína F do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV-25-BR) obtido no sequenciador automático ABI PRISM TM 310 Genetic Analyser.

A sequência do fragmento da proteína F foi comparada com 30 seqüências armazenadas no GeneBank usando o programa de busca de ALTSCHUL *et al.* (1997), (Figuras 9 e 10). Esta seqüência apresentou a mais alta homologia com os isolados RB 94 e AT 51908 (95% e 94%, respectivamente). A estirpe RB94 foi isolada da Bélgica e descrita por WELLEMANS & LEUNEN (1975). Pela resposta aos anticorpos monoclonais, está associado ao subgrupo A/B. A estirpe AT51908 foi isolada e descrita por MOHANTY, INGLING, LIE, (1975) e está associada ao subgrupo B.

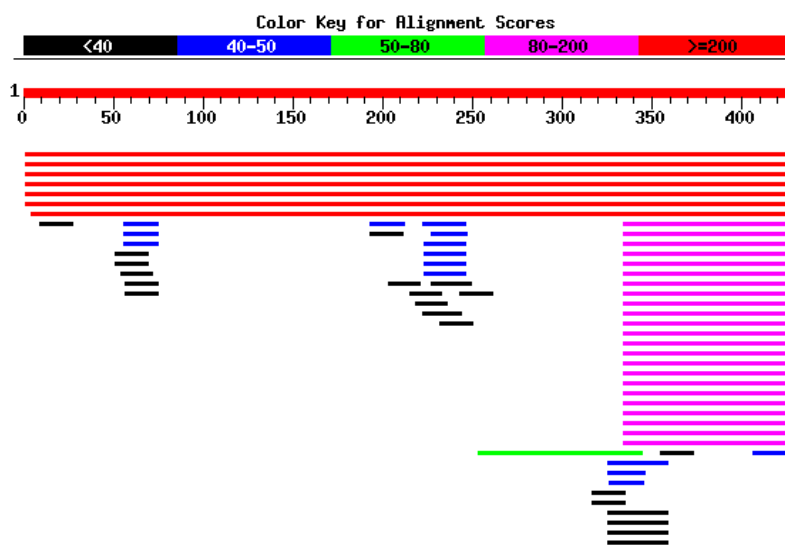


Figura 9: Visualização de alinhamentos da seqüência de nucleotídeos pesquisada da proteína F do BRSV-25-BR com as seqüências armazenadas no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança.

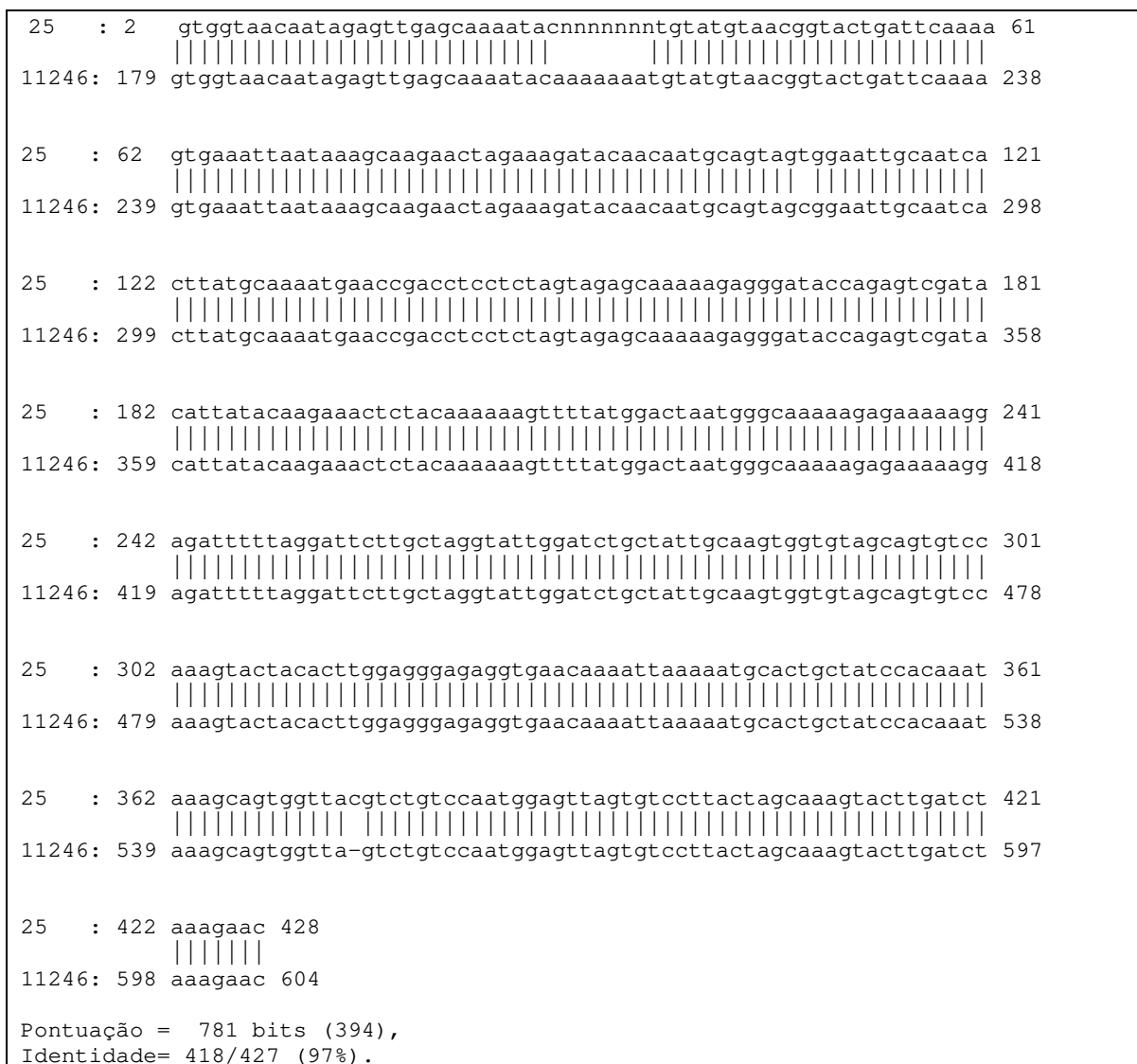


Figura 10: Alinhamento de sequência entre o fragmento do genoma da proteína F do BRSV-25-BR em estudo (25) e fragmento similar do BRSV estirpe 11246.

5.4.2. Proteína G

O segmento de 333 nucleotídeos sequenciado da proteína G do BRSV-25-BR (Figuras 11 e 12), mostrou alta homologia com a maioria das amostras de proteína G, registradas no GeneBank (Figuras 13 e 14). As maiores similaridades foram às encontradas com as estirpes BovX, isolada na Suíça e descrita por PACCAUD e JACQUIER, (1970) e

AT 51908 isolada nos Estados Unidos em 1975 (95 %), ambas são estirpes associadas ao subgrupo B.

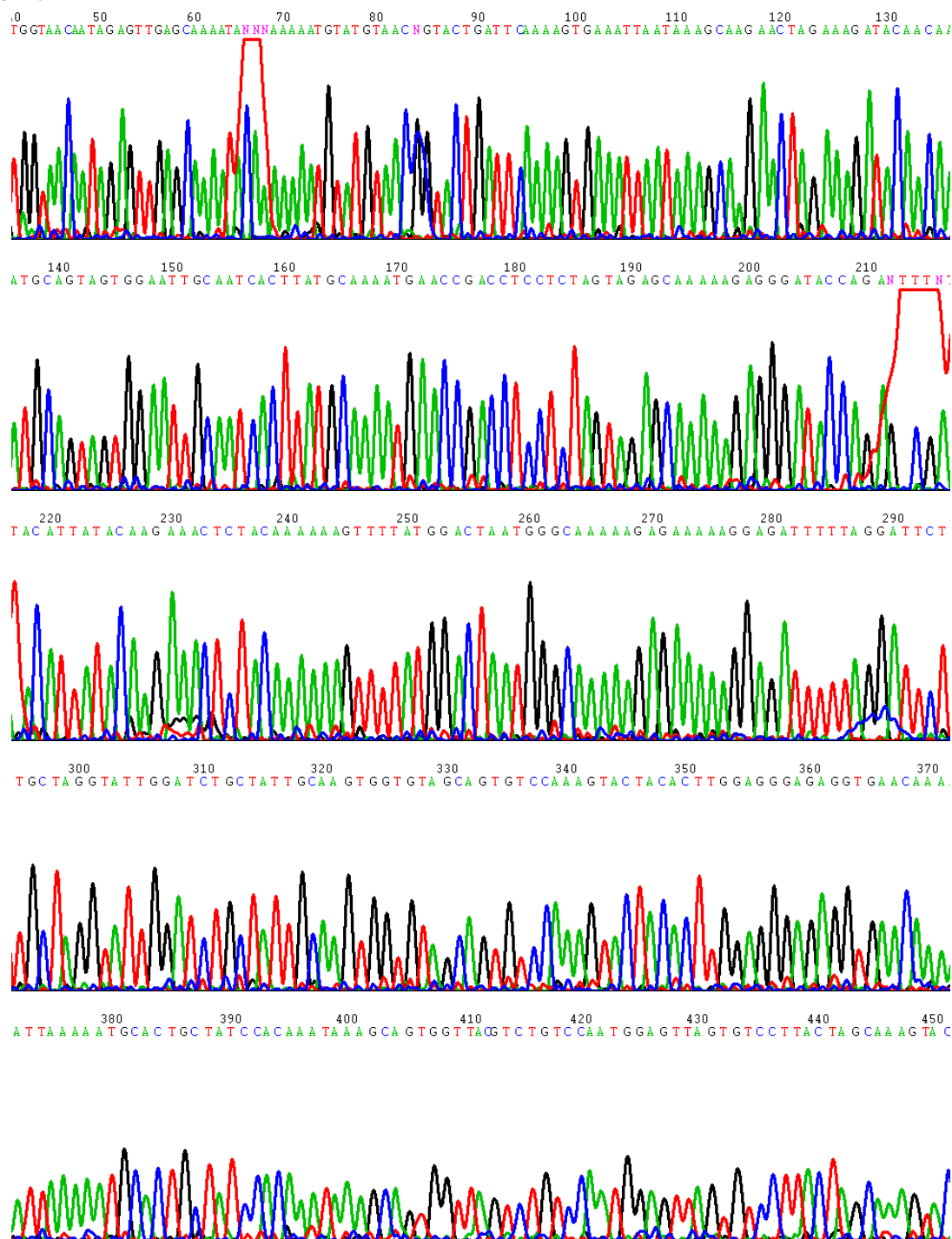


Figura 11: Eletroferogramas do sequenciamento do fragmento amplificado do gene da proteína G do isolado BRSV-25-BR com o iniciador B7, direto.

```

280- CCTAAATCCA AAGCACCACA CTGTCCCAAC CACCAAACAT
AGACACTAGT GGAACTACAT ACGGTCACCC AATCAACAGA
ACCCAAAACA GAAAAATCAA AAGCCAATCT ACTCCTCTTG
CCACCCGAAAA CTACCAATCA ACCCACTGGA AAGCAACCCC
CCCGAAAACC ACCAAGACCA CAACAACCTCC CAAACACTGC
CTCATGTGCC TGCAGCACAT GCGAAACGCA ATCCTGCCTG
TTCACCACTC TGCCAAATCGG GCTGGAGAGA GCACCAAGCA
GAGCTCCCAC AATCACCCTC AAAAAGGCTC CAAAACACAA AAC -
604

```

Figura 12: Sequência do fragmento do genoma da proteína G do BRSV-25-BR obtido no seqüenciador automático ABI PRISM TM 310 Genetic Analyser.

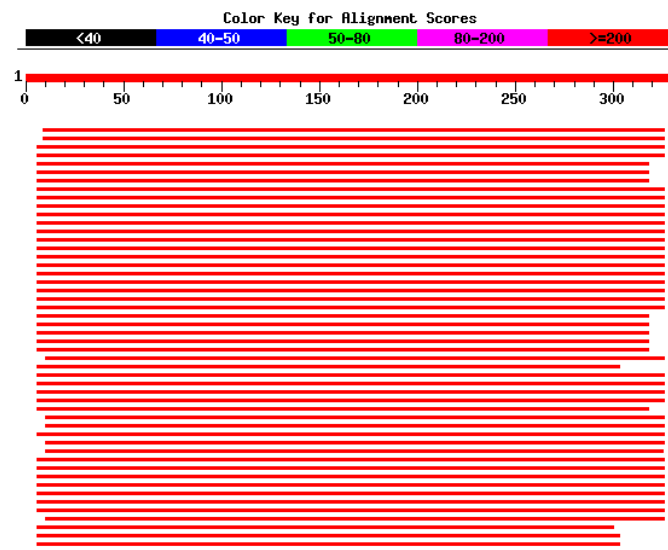


Figura 13: Visualização de alinhamentos da seqüência de nucleotídeos pesquisada da proteína G do BRSV-25-BR com seqüências armazenadas no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança

```

25   : 10  ccaaagcaccacactgtcccaaccaccaaatacaga---cactagtgggaactacatacgg 66
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Bov X: 291 ccaaagcaccacactgtcccaaccaccaaatacagacaccactagtgggaactacatacgg 350

25   : 67  tcaccaatcaacagaacccaaaacagaaaaatcaaaagccaatctactcctcttgccac 126
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Bov X: 351 tcaccaatcaacagaacccaaaacagaaaaatcaaaagccaatctactccacttgccac 410

25   : 127 ccgaaaactaccaatcaaccactggaaagcaannnnnnngaaaaccaccaagaccacaa 186
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Bov X: 411 ccgaaaactaccaatcaaccactggaaagcaaccccccgaaaaccaccaagaccacaa 470

25   : 187 caactccaaacactgcctcatgtg-cctgcagcacatgcgaaacgcaatcctgcctggt 245
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Bov X: 471 caactccaaacactccctcatgtgcctgcagcacatgcg-aaggcaatcctgcctggt 529

25   : 246 caccactctgccaatcgggctggagagagcaccaagcagagctcccacaatcacctca 305
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Bov X: 530 caccactctgccaatcgggctggagagagcaccaagcagagctcccacaatcacctca 589

25   : 306 aaaaggtccaaaacacaaaac 327
      ||||||||||||||||
Bov X: 590 aaaaggtccaaaacccaaaac 611

Pontuação = 505 bits (255),
Identidade= 306/322 (95%).

```

Figura 14: Alinhamento de seqüências entre o fragmento do genoma da proteína G do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe Bov X.

Para analisar a possível associação do BRSV-25-BR aos subgrupos estabelecidos (A, AB e B), foi utilizada como referência a análise realizada por PROZZI *et al.* (1997) e FURZE *et al.*, (1997) que, utilizando várias estirpes de BRSV isoladas em lugares e épocas diferentes, compararam a variação antigênica indicada pelos anticorpos monoclonais, com a constituição molecular destes isolados. A Tabela 4 resume os dados de ano e país no qual foram isoladas e os subgrupos associados às estirpes selecionadas para este estudo.

Tabela 4: Origem e classificação da estirpe viral de acordo à resposta aos anticorpos monoclonais e a sequência da proteína G. (VALARCHER, SCHELCHER, BOURHY, 2000, FURZE *et al.*, 1997, LARSEN *et al.*, 1998).

Estirpe	Subgrupo	Ano	País
AT51908	B	1975	Estados Unidos
Bov X	B	1967	Suiça
220-60	B	-	-
127 (prototipo)	B	1973	Reino Unido
Lelystad	AB	1974	Holanda
MVR553	AB	1983	Bélgica
RB94	AB	1969	Bélgica
220-69 (prototipo)	AB	1969	Bélgica
9314893	AB	1993	Dinamarca
9402020	AB	1994	Dinamarca
8307027	AB	1983	Dinamarca
9304899	AB	1993	Dinamarca
Dorset	A	1971	Reino Unido
VC464	A	1974	Estados Unidos
NMK7	A	1970	Japão
391-2 (prototipo)	A	1985	Estados Unidos
851330	A	1975	Estados Unidos
FS-1	A	1975	Estados Unidos
Lehmkuhl 375	A	1971	Estados Unidos

- Sem informação

A análise das relações entre os isolados, a partir das seqüências do fragmento da proteína G selecionado está na Figura 15. Nesta figura podemos apreciar dois agrupamentos entre os isolados, o primeiro está formado por estirpes do subgrupo B e o segundo está formado pelos demais isolados. Este segundo agrupamento pode ser subdividido também, as estirpes representantes do subgrupo AB formam um núcleo bem diferenciado e as demais um pouco mais dispersas correspondem aos vírus representantes do subgrupo A.

Apesar das pequenas diferenças genéticas entre as estirpes estudadas, observando o dendrograma construído das seqüências de aminoácidos derivados da região correspondente à posição 281 a 651 do gene da proteína G do BRSV (figura 15), podem ser estabelecidos dois agrupamentos bem definidos, o mais evidente reúne os vírus associados ao subgrupo B (AT51908, BovX, 220-60 e 127) e outro que pode ser subdividido em um núcleo bem definido que reúne as estirpes associadas ao subgrupo intermediário AB (Lelystad, MVR553, RB94, 220-69, 9314893, 9402020, 8307027, 9304899). As demais estirpes, associadas ao subgrupo A, não formam um núcleo bem definido como os anteriores. Os isolados do subgrupo A separam-se em dois agrupamentos, um mais disperso, apresenta só estirpes isoladas nos Estados Unidos (nos anos 1971-1985). O outro agrupamento associado mais estreitamente, contém três estirpes isoladas do Reino Unido, Estados Unidos e Japão respectivamente, entre os anos 1970 e 1974 (Tabela 4).

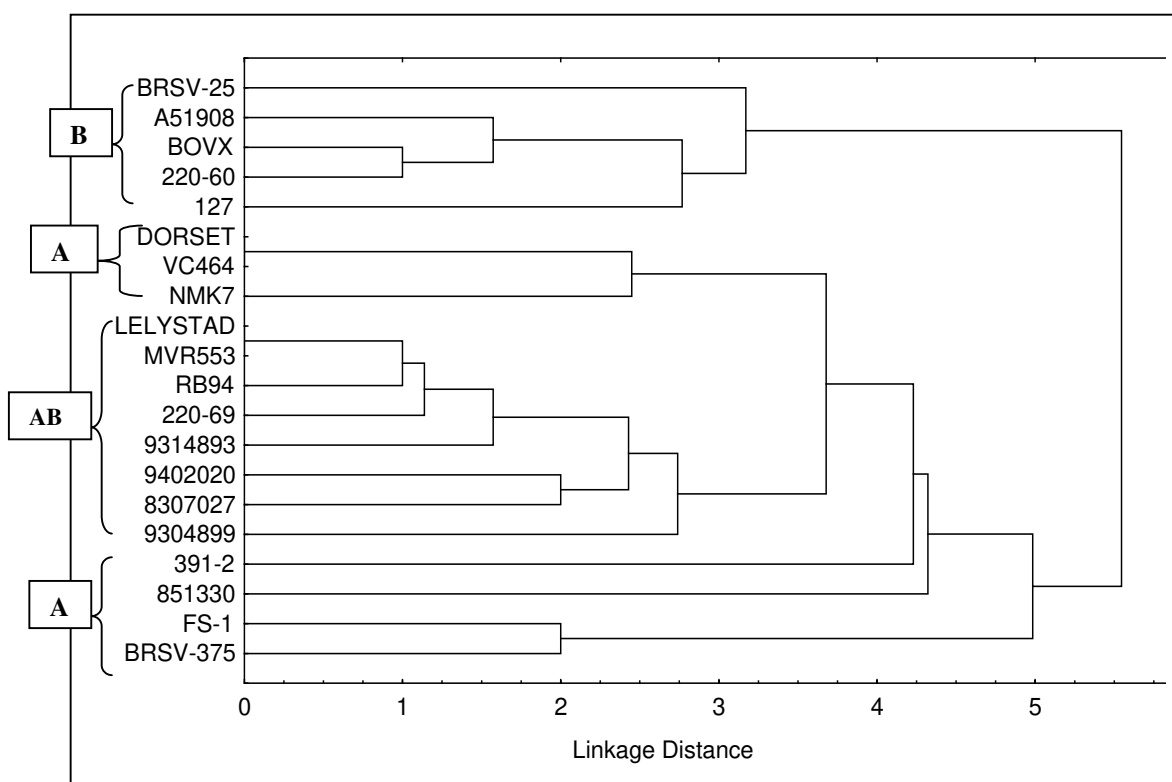


Figura 15: Dendrograma das relações entre os isolados de BRSV a partir da seqüência de aminoácidos derivados do fragmento do gene da proteína G.

Em resumo, a seqüência do BRSV-25-BR tem maior similaridade com as estirpes BovX, 220-60, 127 e AT51908 (95%) formando um núcleo junto com elas, associadas antigenicamente ao subgrupo B. A divergência maior do BRSV-25-BR (15%) é com a estirpe 391-2, representante do subgrupo A.

As características específicas do BRSV, tais como sua alta prevalência na população bovina, a baixa proteção conferida pelos anticorpos maternos, o efeito sinérgico com outras doenças virais comuns nos bovinos, a importância das perdas ocasionadas na produção junto com o escasso conhecimento em relação aos subgrupos do vírus que circulam na população bovina, fazem interessante o seu estudo para determinar as características particulares deste vírus no Brasil. Este conhecimento ajudará nos estudos epidemiológicos e no melhor entendimento da doença, permitindo assim, melhores metodologias para o combate e erradicação da mesma, contribuindo indiretamente ao bem estar das populações de países produtores como o acesso a preços mais acessíveis de proteína animal às grandes massas de consumidores derivados dos menores custos de produção.

O vírus isolado no Brasil foi estudado morfológicamente através da análise de imagens geradas ao microscópio eletrônico, obtidas de vírus purificado segundo método da dupla centrifugação. Este método permitiu obter uma quantidade um pouco maior de proteínas por mililitro de solução quando comparado com os outros métodos aplicados.

A amostra colocada diretamente na grade, e observada ao microscópio eletrônico proporcionou imagens de um vírus de características pleomórficas, tamanho aproximado de 100 a 300 nm, com presença de espículas. Notou-se grande quantidade de partículas incompletas ou destruídas. As imagens observadas (Figura 2) estão de acordo com as características morfológicas do BRSV, permitindo afirmar que o vírus isolado no Brasil procedente de bovinos, trata-se de uma amostra brasileira deste vírus.

O BRSV apresenta muita semelhança com o vírus respiratório sincicial humano (HRSV), tanto na sequência de nucleotídeos como antigenicamente nas proteínas F, M, M2, N e P, com a maior diferença antigênica observada na proteína G, responsável pela adsorção da partícula viral à célula hospedeira (LEVINE, KLAIBER-FRANCO, PARADISO, 1987, ELVANDER *et al.*, 1998b, FURZE *et al.*, 1997). Por estas razões foi escolhido um fragmento da proteína G e outro da proteína F para serem amplificados e analisados.

As estirpes de BRSV são divididas em subgrupos A, AB e B, baseados nas diferenças antigênicas da proteína G. Essas diferenças poderiam, eventualmente, afetar a virulência e estudos deverão ser feitos com esses antecedentes epidemiológicos para criar

estratégias no controle das infecções, já que as estirpes induziriam proteção contra um vírus homólogo e proteção parcial contra um vírus heterólogo. Conhecidas as características do vírus e reconhecida sua presença no território nacional, é imprescindível desenvolver um bom sistema de diagnóstico para uma futura estratégia de erradicação. Usualmente o diagnóstico de infecção respiratória tem sido centrado na técnica de cultivo de vírus a partir de secreções nasofaríngeas. Porém, métodos de cultura de células são lentos, freqüentemente levam uma semana antes de ter um resultado disponível e a sensibilidade pode ser fortemente afetada pela labilidade do vírus (LARSEN, 2000).

Para evitar esse problema, foram desenvolvidos muitos testes baseados nas interações de antígenos e anticorpos, para determinar a presença de antígenos ou anticorpos nos organismos de interesse. Alguns destes testes estão caindo em desuso por serem menos sensíveis e precisar de pessoal altamente treinado para se ter uma boa interpretação dos resultados, e evitar uma certa subjetividade no resultado final. Em outros casos, como o radioimunoensaio, o teste é altamente sensível, mas requer estrutura e pessoal apropriados para trabalhar com elementos radioativos o que é, freqüentemente, um impedimento para a aplicação da técnica em testes de rotina (CHERNESKY & MAHONY, 1996).

Técnicas tais como soroneutralização (SN) e ELISA continuam sendo muito usadas porque são altamente sensíveis. O ELISA tem a vantagem da rapidez, e alta capacidade de automatização. A técnica de SN, apesar de ser mais demorada, mostra ser às vezes mais específica que o ELISA nos primeiros estágios da doença (CAMPALANS & ARNS, 1997). Mas a necessidade de desenvolver outro tipo de testes de diagnóstico é particularmente evidente em gado bovino, onde os rebanhos são vacinados extensivamente, e portanto os testes baseados na medição da presença de anticorpos apresentam a dificuldade de determinar a origem dos anticorpos, se estes são produzidos como resultado de uma infecção natural ou são anticorpos vacinais. Os procedimentos diretos para a detecção de antígeno em vírus como o BRSV, muitas vezes são menos sensíveis considerando a sua labilidade e os baixos títulos.

Novas técnicas não imunológicas como a PCR estão sendo aplicadas de maneira experimental com o objetivo de obter resultados rápidos e confiáveis, adaptados à rotina de grandes quantidades de amostras. No caso do BRSV, a finalidade será sempre detectar

precocemente os animais assintomáticos que presumivelmente mantêm a infecção persistente e poderiam atuar como fonte de um novo surto no outono ou inverno seguinte (VAN der POEL *et al.*, 1997, VALARCHER *et al.*, 2001).

A amplificação por PCR está provando ser uma valiosa metodologia para monitorizar infecções virais ou bacterianas. Os procedimentos convencionais de diagnóstico estão baseados na capacidade de crescimento dos organismos em cultura ou de detectar sua presença em pacientes usando anticorpos específicos. O problema desses testes é requererem algumas semanas para o diagnóstico final. O teste baseado em PCR é mais sensível e mais rápido que os testes convencionais detectando as células infectadas entre grande quantidade de células não infectadas.

Na reação em cadeia da polimerase, a detecção de um patógeno baseia-se na amplificação de um segmento único, relativamente pequeno, de DNA específico do organismo a ser estudado. No caso do BRSV, por se tratar de um vírus RNA, o material genético precisa ser inicialmente convertido em DNA complementar pela enzima transcriptase reversa (RT-PCR) (MAHONY, 1996).

Em numerosos estudos, a RT-PCR está se revelando um promissor método de diagnóstico do BRSV. A grande vantagem do teste é ser muito sensível e específico e não precisar do vírus em forma viável para obter resultados positivos, ampliando grandemente o espectro de amostras úteis para o diagnóstico. A rápida detecção do BRSV é de grande importância clínica e epidemiológica, visto que é provavelmente a mais comum causa de doença respiratória nos bezerros menores de 18 meses e, pelo curto período de incubação (2-3 dias), a disseminação por todo o rebanho é bastante rápida. Estudos sorológicos indicam que mais de 95% do gado com mais de 3 anos está infectado e que 70% dos bezerros são infectados dentro do primeiro ano de vida (FURZE *et al.*, 1997).

A reação em cadeia da polimerase reproduz exatamente cópias ilimitadas de DNA, permitindo o acesso a uma informação genômica fundamental no diagnóstico de doenças, principalmente aquelas de difícil diagnóstico pelos métodos convencionais.

No caso do BRSV, por não produzir sintomas patognomônicos, a doença frequentemente é confundida com outras doenças de sintomatologia semelhante como a diarreia bovina viral (BVD) e a parainfluenza (PI3), dificultando determinar a prevalência. Os métodos de diagnóstico na maior parte das vezes são indiretos, por determinação de anticorpos. As possibilidades de encontrar o vírus em amostras clínicas são escassas, devido aos baixos títulos e à dificuldade para uma replicação em sistemas celulares. A RT-PCR possibilita a produção de inúmeras cópias a partir de uma única cópia viral na amostra, sendo a informação genética assim gerada, fundamental para as medidas de profilaxia e prevenção nos rebanhos susceptíveis.

A utilidade de um teste de diagnóstico de PCR depende da apropriada escolha dos iniciadores, os que devem reconhecer especificamente todos os isolados de um patógeno. Ensaios de RT-PCR em que as seqüências alvo são regiões conservadas dos genes e comuns entre todos os isolados devem ser preferidas com fins de diagnóstico, mas não tem a capacidade para diferenciar o grupo antigênico ao qual o patógeno pertence. Outros ensaios devem ser desenvolvidos para determinar o subgrupo envolvido em um surto em particular e relacionar essa informação com suas características patogênicas e epidemiológicas.

As glicoproteínas do envelope do BRSV em que baseamos a caracterização viral, F e G, são essenciais para a entrada do vírus na célula hospedeira e são importantes alvos da resposta imune como anticorpos neutralizantes do vírus. Essas proteínas foram analisadas quanto a sua seqüência e comparadas com as seqüências armazenadas no GeneBank. A alta homologia encontrada entre as seqüências registradas de BRSV com o segmento da proteína F do novo isolado e com amostras do mesmo segmento de HRSV (92 a 97%), reforça a idéia de se tratar de uma proteína altamente conservada entre as amostras de pneumovírus. Essa característica, junto com o fato de ser também altamente imunogênica, a faz uma boa escolha na hora de produzir vacinas contra a doença (STINE et al., 1997).

A metodologia descrita para a amplificação dos segmentos genômico escolhidos do isolado brasileiro (F e G), demonstrou-se adequada, pois reproduziu quantidades suficientes de cDNA, o que permitiu a identificação da amostra e o posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados. A informação contida na seqüência obtida

deste isolado dá a certeza que o ensaio RT-PCR, tanto do gene da proteína G quanto do gene da proteína F foi efetivo em detectar o ácido nucléico viral.

A proteína G do BRSV, como a proteína G do HRSV, é conhecida por ser a proteína mais variável no vírus respiratório sincicial (VILCEK *et al.*, 1994, LERCH, *et al.*, 1989, LANGEDIJK *et al.*, 1996). Esses autores encontraram uma conservação de seqüências de apenas 30% entre a proteína G de HRSV e BRSV. Entre isolados de BRSV, no entanto, MALLIPPEDDI & SAMAL (1993), demonstraram alto grau de conservação, com 90 a 97% de identidade na seqüência de nucleotídeos e 84 a 95% na seqüência de aminoácidos da proteína G.

Neste estudo, também foi encontrada uma alta homologia entre a seqüência do BRSV-25-BR e as seqüências registradas no GeneBank, tanto de nucleotídeos (85 – 95%) como de aminoácidos (77 – 92%). A análise desta proteína em particular é de grande importância porque a variabilidade genética em regiões funcionalmente relevantes do genoma do BRSV, como a região hidrófoba central (aminoácidos 174 – 188), que é um importante sítio antigênico, poderia afetar a infectividade e virulência, por isso poderão ser usadas como marcadores para infectividade viral em estudos clínicos e para diferenciar as linhagens, associá-las a patogênese viral e manifestação clínica no animal (LARSEN, 2000, FURZE *et al.*, 1997, STINE *et al.*, 1997, LANGEDIJK *et al.*, 1996).

A determinação da seqüência nucleotídica proporciona elementos para mapear os epítomos envolvidos na resposta imune e contribuir para discussão da existência ou não de subgrupos definidos como acontece com a proteína G do HRSV e, portanto, testar sua importância como antígeno vacinal (FURZE *et al.*, 1997, STINE *et al.*, 1997, PROZZI *et al.*, 1997).

O ensaio RT-PCR baseado na região que codifica a proteína G, neste vírus, pode ser usado para identificar isolados e associá-los ao subgrupo específico, visto que o fragmento amplificado pelos iniciadores B7A e B8 fornece informação suficiente para esta análise. Esta região deve ser considerada de muita utilidade para estudos filogenéticos, pois contem regiões conservadas e variáveis. A seqüência determinada neste estudo, tanto para o fragmento da proteína F como para o fragmento da proteína G, estabelece diferenças

pequenas entre os isolados comparados (BRSV-25-BR, BRSV-88 e Lehmkuhl 375, dados não mostrados), limitando-se a mutações pontuais. Resta saber se esses nucleotídeos são essenciais ou não para a patogenicidade e outras características do vírus. Apesar do alto grau de identidade de aminoácidos encontrado entre as estirpes de BRSV, as diferenças parecem ter um profundo efeito sobre o reconhecimento de anticorpos (FURZE *et al.*, 1994, STINE *et al.*, 1997, LARSEN 2000).

Entre os isolados estudados, a identidade maior de nucleotídeos da proteína G foi de 95% sugerindo que esses isolados pertencem ao mesmo subgrupo. Em relação à estirpe de referência L08410 (Lehmkuhl 375), a identidade de nucleotídeos foi consideravelmente menor, 85%. Com a proteína F, o resultado foi semelhante, onde foi encontrado 97% de identidade entre as seqüências de nucleotídeos dos isolados estudados. Faz-se necessário esclarecer se essas diferenças contribuem para uma mudança nas características de patogenia viral ou da resposta imune do hospedeiro frente à doença.

PROZZI *et al.*(1997) determinaram a variação antigênica de oito isolados de BRSV, usando anticorpos monoclonais específicos para essa proteína (G). Desta forma os autores identificaram dois subgrupos maiores (A e B) e um subgrupo intermediário (A/B). FURZE *et al.*(1997) acrescentaram outras 11 estirpes, classificando-as segundo as respostas frente aos anticorpos monoclonais selecionados para tal objetivo (Tabela 3) Uma análise inicial destes isolados de BRSV, procedentes de diferentes regiões geográficas demonstra um alto grau de similaridade (85 - 97%) em suas seqüências de RNA se comparados com o primeiro isolado BovX em 1969 (PACCAUD & JACQUIER, 1970). Não existe uma clara distribuição de subgrupo e área geográfica, ou seja, não há padrões claros indicando regiões específicas dos subgrupos (Tabela 4), porém, pode-se indicar tendências que deverão ser confirmadas na medida em que ocorra um aumento da informação e dos isolamentos em outros lugares do mundo, como na América do Sul, lugar em que existe uma ampla exploração pecuária, mas pouca informação em relação a este vírus.

Comparando os aminoácidos derivados do isolado BRSV-25-BR com as estirpes estudadas nesses trabalhos, pode-se sugerir que este isolado assemelha-se mais estreitamente às estirpes BovX, 220-60, 127 e AT51908 (95%). Todos esses fatores indicam que o vírus corresponde a um vírus respiratório sincicial bovino e que pertence ao

mesmo grupo antigênico que as estirpes BovX, 220-60, 127 e AT51908, ou seja, o subgrupo B. Essa informação passa a ter uma relevância maior ao considerar que o subgrupo B não era isolado desde 1976 e, portanto, estimava-se que este subgrupo não era circulante (FURZE *et al.*, 1997, STINE *et al.*, 1997). Por esta razão, as vacinas estão sendo desenvolvidas com outros antígenos, especificamente do subgrupo A (STINE *et al.*, 1997) utilizando a estirpe Lehmkuhl 375 (Bayovac[®]), o que explicaria, em parte, os fracos resultados obtidos depois da sua aplicação nos rebanhos do país. Na Europa são utilizadas também, vacinas obtidas com as estirpes RB-94 (Rispoval[®]) e 220-69 (Vacores[®]), ambas do subgrupo AB (VALARCHER *et al.*, 2000).

A padronização e uso extensivo de técnicas moleculares como a RT-PCR, permitem a detecção precoce da doença e futuramente a eliminação de portadores, se for o caso. A RT-PCR dupla apresenta vantagens evidentes. Esta técnica é específica, sensível e rápida, detectando o ácido nucléico viral onde outros métodos falham (VAN der POEL *et al.*, 1997). Assim, a infecção pode ser diagnosticada em amostras de "swab" nasais tomados na fase aguda do surto suspeito. Porém, a técnica da PCR exige laboratórios com grande infraestrutura, equipe treinada, procedimentos de laboratório rígidos e cuidadosos e de controles positivos e negativos (POST & EHRLICH, 2000).

Analizando o dendrograma que compara entre si as estirpes selecionadas para este estudo (Figura 15), foi observado que apesar das pequenas diferenças genéticas entre as 20 estirpes, dois grupos evidentes podem ser estabelecidos. O primeiro grupo consiste de estirpes que pertencem ao subgrupo B. A análise filogenética apresentada aqui revela que o BRSV-25-BR forma um grupo diferenciado junto com os outros representantes do subgrupo B, distante dos membros do subgrupo AB, os que apresentam outro núcleo bem diferenciado no dendrograma e também distante dos representantes do subgrupo A.

Pode-se perceber que uma grande pressão seletiva tem atuado em relação à proteína G, estimulando a diferenciação desta proteína da superfície viral a diferenciar-se nos três grupos antigênicos até agora conhecidos, mantendo sua função de ligação com o receptor da célula hospedeira. Provavelmente os membros do subgrupo B se diferenciaram e separaram mais precocemente na evolução deste vírus se comparados aos outros

subgrupos, o que está de acordo com o fato de ser um subgrupo presente nos primeiros isolamentos e não ter sido isolado após 1976, por esta razão acreditava-se que não estava mais circulando nos rebanhos.

É interessante notar que o núcleo das estirpes do subgrupo intermediário (AB) contém aquelas isoladas num longo espaço de tempo, entre os anos 1969 e 1994, e numa área limitada da Europa (Holanda, Bélgica e Dinamarca), sendo que até o momento não tem sido detectado em outra área geográfica. As estirpes associadas ao subgrupo B, foram isoladas entre os anos 1969 e 1975 e são principalmente isoladas em países da Europa. Podemos também apreciar que os representantes do subgrupo A estão formados principalmente por isolados procedentes dos Estados Unidos (Tabela 3).

O isolado brasileiro, associado ao subgrupo B, proporciona a primeira análise genômica do BRSV no país. Este estudo deve servir de base para futuras análises da variabilidade do BRSV no Brasil e na América do Sul, permitindo estabelecer a provável origem geográfica dos isolados e oferecendo um valioso instrumento para estudos epidemiológicos.

Neste estudo foi apresentada a RT-PCR dupla como um método rápido e específico para a detecção de BRSV em amostras contendo o vírus. Este ensaio foi desenvolvido com vírus replicando em cultura de células, porém, futuramente deverá ser testado em amostras clínicas de bovinos. Os próximos passos serão utilizar esses testes não só como diagnóstico de doenças, mas também para medidas de prevenção, controlando contaminações e dispersão de patógenos. Estas ações ainda são favorecidas pela rapidez na obtenção dos resultados, possibilitando decisões imediatas, com suas conseqüentes e evidentes vantagens como economia de recursos e geração de informação importante para o controle definitivo da doença.

- A estrutura viral da amostra estudada, BRSV-25-BR é arredondada, pleomórfica e de tamanho aproximado de 100 a 300 nm, com numerosas espículas espalhadas pela superfície do virion.

- Os iniciadores selecionados neste estudo, B1, B2A, B3 e B4A, para a proteína F, amplificaram o genoma viral no fragmento esperado, de 481 pb.

- As condições ideais para a amplificação do segmento F do genoma viral foram as mesmas na primeira e segunda PCR, ou seja, 35 ciclos de denaturação 94° C, durante 45 segundos, anelamento 55° C por 30 segundos e extensão 72° C por 1 minuto e 30 segundos.

- Os iniciadores selecionados neste estudo, B5A, B6A, B7A e B8, para a proteína G, amplificaram o genoma viral no fragmento esperado, de 371 pb.

- As condições ideais para a amplificação do segmento G do genoma viral foram 35 ciclos de denaturação 94° C durante 1 minuto, anelamento 55° C por 1 minuto e extensão 72° C por 1 minuto e 30 segundos na primeira PCR e denaturação 94° C durante 30 segundos, anelamento 55° C por 45 segundos e extensão 72° C por 1 minuto na segunda PCR.

- O tratamento do produto amplificado do RT-PCR duplo para a proteína F, com a enzima de restrição *Sca I*, revelou dois segmentos de tamanhos aproximados de 376 e 105 pb, nos três isolados analisados.

- A sequência do fragmento amplificado da proteína F revelou 97 % de identidade de nucleotídeos entre as amostras do BRSV-25-BR e as amostras armazenadas no GeneBank.
- Menor porcentagem de identidade foi obtida para a sequência da proteína G, comparada com as sequências armazenadas no GeneBank, entre 92 e 95 %.
- A comparação dos aminoácidos derivados da sequência da proteína G do BRSV-25-BR com as sequências das estirpes registradas no "GeneBank" sugerem que o isolado pertence ao subgrupo B.

The bovine respiratory syncytial virus (BRSV) causes acute infection in the respiratory tract of cattle and is wide spread in the world, causing significant economic losses. The objective of this project was to characterize the BRSV, named BRSV-25-BR, isolated from a 2 months calve from Rio Grande do Sul state cattle, which presented respiratory disease symptoms. This sample was compared against BRSV strain isolates from other countries. The initial step was to adapt the viral samples in cellular culture. To achieve this purpose, a CER (Chicken Embryo Related) cell culture was used. The morphologic analysis was done through electronic microscopy using a negative stain. A genomic comparison to the viral isolates was carried out. The outcomes of the analyses indicate that the analyzed sample, named BRSV-25-BR, is an rounded, pleomorphic virion, between 100-300 nm in size and numerous spikes over the surface. The amplification of the expected size fragment, which was 481 pb, was observed through a nested RT-PCR technique, using the B1, B2A, B3 and B4A primers for the F protein. The analyses of this sequence of nucleotides revealed 97% identity between the F protein sequence of the isolated BRSV-25-BR and the strains of BRSV equivalent sequences stored in the GeneBank. The amplification of the viral genome on an expected size fragment (371 pb) was achieved using the nested RT-PCR, in which the B5A, B6A, B7A and B8 primers for the G protein were used. The identity percentage between the BRSV-25-BR sequence and the compensative fragment of the GeneBank stored strains was smaller, ranging between 92% and 95%. A probable association to the B subgroup is suggested from the deduzed amminoacid sequence of the G protein of the Brazilian sample compared to the sample sequences registered in the GeneBank. The information gathered from this research project allows to affirm that the isolated Brazilian sample belongs to a kind of BRSV different from those present in the world and contribute with a values to epidemiologic studies.

- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; WALTER, I. W.; YOUNG, J. A.; FEE, S.; DOUGLAS, A. J.; ADAIR, B. M. -Serological evidence for pneumovirus infections in pigs. **Vet Rec**, **142** (1): 8-12, 1998.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. -Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, **25**: 3389-3402, 1997.
- AMES, T.R. -The epidemiology of bovine respiratory syncytial virus infection. **Vet Medicine**, **88**: 881-885, 1993.
- ARNS, C.W. & HAFEZ, H.M. -Isolation and identification of avian pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. **IN: Proceedings 44th Western Poultry Diseases Conference** Califórnia, Sacramento, p. 124-125, 1995.
- BAKER, J. & VELICER, L. F. -Bovine respiratory syncytial virus vaccination current status and future vaccine development. **Comp on Continuing Education for the practicing Vet**, **113**:1323-1335, 1991.
- BARTH, O. M. -Estudos sobre a contrastação negativa de suspensões virais. **Rev Brasil Biol**, **44**(1): 71-80, 1984.
- BELAK, S.; BALLAGI PORDANI, A. – Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet Res Commun**, **17**: 55- 72, 1993.
- BELKNAP, E.B. -Recognizing the clinical signs of bovine respiratory syncytial virus infection. **Vet Medicine**, **88**: 886-887, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. – Discurso ante Comissão de Agricultura e Política Rural. Ministro Marcus Vinícius Pratini de Moraes. Brasília, 2000, p 9.
- BRODERSEN, B.W. & KELLING, C. L. -Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. **Am J Vet Res**, **59** (11): 1423-30, 1999.

- BUCHHOLZ, U. J.; FINKE, S; CONZELMANN, K.K. -Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. **J Virol**, **73** (1): 251-9, 1999.
- CAMPALANS, J.F.B & ARNS C.W. -Serological investigation of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **IN: VII ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA**, A3, São Lourenço, MG, 1994. **Anais**. São Lourenço, MG, 1994.
- CAMPALANS, J. & ARNS, C.W. -Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Virus Rev Res**, **1-2**: 50-56, 1997.
- CHERNESKY, M. A.; MAHONY, J. B. – Immunoassays principles and assay design. **IN: MAHY, B.W.J.& KANGRO, H. O. eds., Virology Methods Manual**. Academic Press INC, San Diego, pp 123 – 142, 1996.
- COSTA M.; GARCIA L.; YUNUS A.S. -Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. **Vet Res**, **31**(2) p241-6, 2000.
- DRIEMEIER, D.; GOMES, M.J.P.; MOOJEN,V.; ARNS,C.W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; Da COSTA, U.M. -Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesq Vet Bras**, **17** (2): 77-81, 1997.
- DUBOVI, E.J. -Diagnosing bovine respiratory syncytial virus infection: A laboratory perspective. **Vet Medicine**, **88**: 888-893, 1993.
- ELLIS,J.A.; BELDEN, E.L.; HAVEN, T.R.; CAVENDER, J. -Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of proliferation and secretion of lymphokines by leukocytes in vitro. **Vet Immunol and Immunopatol**, **34** :21-34, 1992.
- ELVANDER, M.; BAULE, C.; PERSSON, M; EGYED, L.; BALLAGI-PORDANY, A.; BELAK, S; ALENIUS, S. -An experimental study of a concurrent primary infection with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) in calves. **Acta Vet Scand**, **39** (2): 251-64, 1998a

- ELVANDER, M.; VILCEK, S.; BAULE, C.; UTTENTHAL, A.; BALLAGI-PORDANY, A. & BELAK, S. - Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. **J Gen Virol**, **79**: 2939-2946, 1998b.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Dados sobre produção de carne bovina no Brasil e América do Sul, atualizado até ano 1999. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/aga>. Acesso em 01 de Agosto de 2001.
- FLORES, E.F.; WEIBLEN.R.; MEDEIROS, M.; BOTTON,S.A.; IRIGOYEN, L.F.; SCHUCH, L.F; DRIEMEYER, D.; MORAES, M. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Pesq Vet Bras**, **20** (4): 139 – 143, 2000.
- FROLICH, K.; FLACH, E. J. -Long-term viral serology of semi-free-living and captive ungulates. **J Zoo Wildl Med**, **29** (2): 165-70, 1998.
- FURZE,J.M.; WERTZ,G.W.; LERCH,R.; TAYLOR,G. -Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. **Jour Gen Virol**, **75**(2): 363-370, 1994.
- FURZE, J.M.; ROBERTS, S.R.; WERTZ, G.W. & TAYLOR, G. -Antigenically distinct G glycoproteins of bovine respiratory syncytial virus strains share a high degree of genetic homogeneity. **Virology**, **231**: 48-58, 1997.
- GONÇALVES, I.P.D.; JOST, H.C.; SOGLIO, A.D.; SIMANKE, A.T.; HOTZEL, I.; MOOJEN, V. -Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, **23**(3):389-390, 1993.
- GOUGH, R.E. & COLLINS, M.S. (1989) Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. *Avian Pathology* **18**, 227-238.
- GRAHAM, D. A.; MAWHINNEY, K. A.; ELVANDER, M.; ADAIR, B. M.; MERZA, M. -Evaluation of na IgM-specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus infection: influence of IgM rheumatoid factor on test results with field sera of bovine respiratory syncytial virus. **J Vet Diagn Invest**, **10** (4): 331-7, 1998.

- HALL, C.B. - Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. Review Article. **N Engl J Med** **344** (25): 1917 – 1928, 2001.
- INABA, Y.; TANAKA, Y.; SATO, K.; OMORI, T.; MATUMOTO, M. -Bovine respiratory syncytial virus: studies on an outbreak in Japan, 1968-1969. **Jap J Microbiol** **16**: 373-383, 1972.
- JACOBS, J.W. & EDINGTON, N. -Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. **Res Vet Sc**, **18**: 299-306, 1975.
- KELLING, C.L. -Controlling bovine respiratory syncytial virus infection in calves. **Vet Medicine**, **88**: 903-906, 1993.
- KIMMAN, T.G.; ZIMMER, G.M.; WESTENBRINK, F.; MARS, J.; VAN LEEUWEN, E. - Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves; influence of maternal antibodies on the outcome of disease. **Vet Rec**, **123**: 104-109, 1988.
- LANGEDIJK, J.P.M.; MIDDEL, W.G.J.; SCHAAPER, W.M.M.; MELOEN, R.H.; KRAMPS, J. A.; BRANDENBURG, A. H.; VAN OIRSCHOT, J.P. – Type – specific serologic diagnosis of respiratory syncytial virus infection, based on a synthetic peptide of the attachment protein G. **J Immunol Method**, **193**: 157-166, 1996.
- LARSEN, L.E.; UTTENTHAL, A.; ARCTANDER, P.; TJORNEHOJ, K.; VIUFF, B.; RONTVED, C.; RONSHOLT, L.; ALEXANDERSEN, S. BLIXENKRONE-MOLLER, M. – Serological and genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) indicates that Danish isolates belong to the intermediate subgroup: no evidence of a selective effect on the variability of G protein nucleotide sequence by prior cell culture adaptation and passages in cell culture or calves. **Vet Microbiol**, **62**: 265 - 279, 1998.
- LARSEN, L. E. – Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): A review. **Acta Vet Scand**, **41**: 1-24, 2000.

- LERCH, R.A.; STOTT, E.J.; WERTZ, G.W. -Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins mRNAs and generation of cDNA clones to the viral mRNAs. **J Virol**, **63**: 833-840, 1989.
- LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P. R. – Demonstration that the glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **J Gen Virol**, **68**: 2521 – 2524, 1987.
- LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. -Proteins measurement with the Folin reagent. **J Biol Chem**, **193**: 265-275, 1951.
- MAHONY, J. B. Detection of viral nucleic acids in clinical material. **IN**: MAHY, B.W.J.& KANGRO, H. O. eds., **Virology Methods Manual**. Academic Press INC, San Diego, pp 333 – 342, 1996.
- MALLIPEDDI, S. K.; SAMAL, S. K.; MOHANTY, S. B. -Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus-infected cells. **Arch Virol**, **115**: 23-36, 1990.
- MALLIPEDDI, S.K. & SAMAL, S.K. -Structural difference in the fusion protein among strains of bovine respiratory syncytial virus. **Vet Microbiol**, **36**: 359-367, 1993.
- MARS, M. H.; BRUSCHKE, C. J.; VAN OIRSCHOT, J. T. -Airborne transmission of BHV1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. **Vet Microbiol**, **66** (3): 197-207, 1999.
- MAYR, A.; BACHMANN, P.A.; BIBRACK, B.; WITTMANN, G. -Virologische Arbeitsmethoden, Band II. **Gustav Fischer Verlag Stuttgart** , p: 281,1977.
- MAYR, A.; BACHMANN,P.A.; BIBRACK, B.; WITTMANN, G. -Virologische Arbeitsmethoden, Band III. **Gustav Fischer Verlag. Stuttgart - New York** , p: 539, 1989.
- McINNES, E.; SOPP, P.; HOWARD, C. J.; TAYLOR, G. -Phenotypic analysis of local cellular responses in calves infected with bovine respiratory syncytial virus. **Immunology**, **96** (3): 396-403, 1999.

- MOHANTY, S.B.; INGLING, A.L.; LILLIE, M.G. -Experimentally induced respiratory syncytial viral infection in calves. **Am J Vet Res**, **36**: 417-419, 1975.
- OLCHOWY, T.W.J.; AMES, T.R.; MOLITOR, T.W. -Interaction of bovine respiratory syncytial virus with bovine alveolar macrophages in vivo: Effects of virus infection upon selected cell functions. **Can J Vet Res**, **58** (1): 42-48, 1994.
- PACCAUD, M.G. & JACQUIER, C. -A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Arch Ges Virusforsch**, **30**: 327-342, 1970.
- PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; ALENIOUS, S.; CRANWELL, M. P.; PRITCHARD, G. C.; DREW, T. W. -Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **Vet Rec**, **142** (15): 385-91, 1998.
- PEIXOTO, P. V.; MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; de SOUZA, M.I. – Infecção natural pelo vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesq Vet Bras**, **20** (4):, 2000.
- PIRIE, H.M.; PETRIE, L.; PRINGLE, C.R.; ALLAN, E.M.; KENNEDY, G.J. -Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus. **Vet Rec**, **108**: 411-416, 1981.
- POST, J. C.; EHRLICH, G. D. – Impacto da reação em cadeia da polimerase na medicina clínica. **JAMABrasil**, **4**: 3081 – 3083, 2000.
- PROZZI, D.; WALRAVENS, K.; LANGEDIJK, J.P.M.; KRAMPS, J.A.; LETESSON, J.J. - Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. **J Gen Virol**, **78**, 359-366, 1997.
- REED, J.L. & MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **Amer.J.Hyg.** **27**:493, 1938.
- ROSENQUIST, B.D. -Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory diseases. **J Infect Dis**, **130**: 177-182, 1974.

- ROSSI, C.R. & KIESEL, G.K. -Serological evidence for the association of bovine respiratory syncytial virus with respiratory tract disease in Alabama cattle. **Infect Immun**, **10**: 293-298, 1974.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. -Molecular cloning: A laboratory Manual. 2 ed. NY , Cold Spring Harbor, Cold Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER, F. NICKLEN, S.; COULSON, A.R. -DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Nat Acad Scien**, **74**, 5463-5467, 1977.
- SCHRIJVER, R.S.; DAUS, F.; KRAMPS, J.A.; LANGEDIJK, J.P.M.; BUIJS, R.; MIDDEL, W.G.J.; TAYLOR, G.; FURZE, J.; HUYBEN, M.W.C.; van OIRSCHOT, J.T. – Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. **Vet Microbiol**, **53**: 253 – 260, 1996.
- SCHRIJVER, R.S.; LANGEDIJK, J.P.M.; KEIL, G.M.; MIDDEL, W.G.J.; MARIOVELHUIS, M.; van OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. – Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. **Vaccine**, **15**: 1908 – 1916, 1997.
- SCHRIJVER, R. S. -Immunobiology of bovine respiratory syncytial virus. **Tijdschr Diergeneeskde**, **123** (22): 658-63, 1998.
- SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. -Increased susceptibility to *Pasteurella haemolytica* in lambs infected with bovine respiratory syncytial virus. **J Comp Path**, **103**: 411-420, 1990.
- SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. -Reinfection of lambs with bovine respiratory syncytial virus. **Res Vet Science**, **52**: 72-77, 1992.
- STINE, L.C.; HOPPE, D.K.; CLAYTON, L.K. – Sequence conservation in the attachment glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. **Vet Microbiol**, **54**: 201 – 221, 1997.

- VALARCHER, J-F.; SCHELCHER, F.; BOURHY, H. - Evolution of bovine respiratory syncytial virus. **J Virol**, **74** (22): 10714-10728, 2000.
- VALARCHER, J. F. BOURHY, H.; LAVENU, A.; BOUGES-ABELA, N.; ROTH, M.; ANDROLETTI, O.; AVE, P.; SCHELCHER, F. -Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. **Virology**, **291**: 55-67, 2001.
- VAN der POEL, W.H.M.; KRAMPS, J.A.; MIDDEL, W.G.J.; Van OIRSCHOT, J.T.; BRAND, A. – Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. **Arch Virol**, **133**: 309 – 321, 1993.
- VAN der POEL, W.H.M.; LANGUEDIJK, J.P.M.; KRAMPS, J.A.; MIDDEL, W.G.J.; BRAND, A.; Van OIRSCHOT, J.T. -Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus. **Arch Virol**, **142**: 1681-1696, 1997.
- VAN der POEL, W.H.M.; MIDDEL, W.G.J.; SCHUKKEN, Y. H. -Antibody titer against bovine respiratory syncytial virus in colostrum-fed dairy calves born in various seasons. **Am J Vet Res**, **60** (9): 1098 -101, 1999.
- VERHOEFF, J.; WIERDA, A.; BOON, J.H. -Clinical signs following experimental lungworm infection and natural bovine respiratory syncytial virus infection in calves. **Vet Rec**, **123**: 346-350, 1988.
- VILCEK, S.; ELVANDER, M.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; BELÁK, S. -Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. **J Clin Microbiol**, **32** (9): 2225-2231, 1994.
- WELLEMANS, S.; LEUNEN, J. - Respiratory syncytial virus and respiratory disorders in cattle. **Ann Med Vet**, **119**: 359 – 369, 1975.
- WEST, K.; BOGDAN, J.; HAMEL, A. NAYAR, G.; MORLEY, P.S. HAINES, D.M.; ELLIS, J. A. -A comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens. **Can J Vet Res**, **62** (4): 245-250, 1998.

- WESTERNBRINK, F. & KIMMAN, T.G. -Immunoglobulin M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections. **Am J Vet Res**, **48**(7) :1132-1137, 1987.
- WOOLUMS A. R.; ANDERSON, M. L.; GUNTHER, R. A.; SCHELEGDE, E. S.; LaROCHELLE, D. L.; SINGER, R. S.; BOYLE, G. A.; FRIEBERTSHAUSER, K. E.; GERSHWIN, L. J. -Evaluation of severe disease induced by aerosol inoculation of calves with bovine respiratory syncytial virus. **Am J Vet Res**, **60** (4): 473-80, 1999.
- YUNUS, A. S.; COLLINS, P. L.; SAMAL, S. K. -Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication. **J Gen Virol**, **79** (9): 2231-8, 1998.

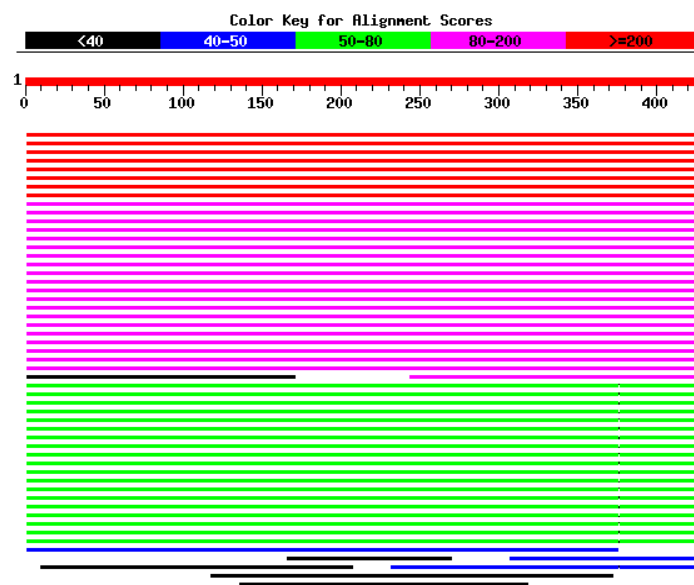


Figura 16: Visualização de alinhamentos da sequência de aminoácidos derivados da proteína F do BRSV-25-BR com as seqüências de similar fragmento armazenadas no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança.

```

25   : 2   gtggtacaatagagttgagcaaaatacnnnnnntgtatgtaacggtactgattcaaaa 61
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
RB 94: 166 gtggtacaatagagttgagcaaaatacaaaaaaatgtatgtaacagtactgattcaaac 225

25   : 62   gtgaaattaataaagcaagaactagaaagatacaacaatgcagtagtggaattgcaatca 121
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
RB 94: 226 gtgaaattaataaagcaagaactagaaagatacaacaatgcagtagtggaattgcagtca 285

25   : 122  cttatgcaaaatgaaccgacctcctctagtagagcaaaaagagggataccagagtcgata 181
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
RB 94: 286 cttatgcaaaatgaaccggcctcctccagtagagcaaaaagagggataccagagttgata 345

25   : 182  cattatacaagaaactctacaaaaaagttttatggactaatgggcaaaaagagaaaaagg 241
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
RB 94: 346 cattataaaagaaactctacaaaaaagttttatgggctaattgggcaaaaagagaaaaagg 405

25   : 242  agatttttaggattcttgctaggtattggatctgctattgcaagtggtagcagtggtcc 301
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
RB 94: 406 agatttttaggattcttgctaggtattggatctgctattgcaagtggtagcagtggtcc 465

25   : 302  aaagtactacacttgaggaggaggtgaacaaaattaaaaatgcactgctatccacaaat 361
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
RB 94: 466 aaagtactacacctggaggaggaggtgaataaaaattaaaaatgcactgctatccacaaat 525

25   : 362  aaagcagtggttacgtctgtccaatggagttagtgctccttagtagcaaagtacttgatct 421
      ||||||||| |||| |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
RB 94: 526 aaagcagtagtta-gtctatccaatggagttagtgctcctaactagcaaagtacttgatct 584

25   : 422  aaagaac 428
      |||||||
RB 94: 585 aaagaac 591

Pontuação = 686 bits (346),
Identidade = 406/427 (95%).

```

Figura 17: Alinhamento de sequência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína F do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe RB 94.

```

BRSV-25-BR: 2  gtggtacaatagagttgagcaaaatacnnnnnntgtatgtaacgggtactgattcaaaa 61
                |||||
AT51908: 5735  gtggtacaatagagttgagcaaaatacaaaaaaatgtgtgtaaaagtactgattcaaaa 5794

BRSV-25-BR: 62gtgaaattaataaagcaagaactagaaagatacaacaatgcagtagtggaattgcaatca 121
                |||||
AT51908: 5795  gtgaaattaataaagcaagaactagaaagatacaacaatgcagtagtggaattgcaatca 5854

BRSV-25-BR:122cttatgcaaaatgaaccgacctcctctagtagagcaaaaagagggataccagagtcgata 181
                |||||
AT51908: 5855  cttatgcaaaatgaaccggcctccttcagtagagcaaaaagagggataccagagttgata 5914

BRSV-25-BR:182cattatacaagaaactctacaaaaaggttttatggactaatgggcaaaaagagaaaaagg 241
                |||||
AT51908: 5915  cattatacaagaaactctacaaaaaggttttatgggctaattgggcaagaagagaaaaagg 5974

BRSV-25-BR:242agatttttaggattcttgctaggtattggatctgctattgcaagtgggtgtagcagtgtcc 301
                |||||
AT51908: 5975  agatttttaggattcttgctaggtattggatctgctgttgcaagtgggtgtagcagtgtcc 6034

BRSV-25-BR:302aaagtactacacttggagggagaggtgaacaaaattaaaaatgcactgctatccacaaat 361
                |||||
AT51908: 6035  aaagtactacacttggagggagaggtgaataaaaattaaaaatgcactgctatccacaaat 6094

BRSV-25-BR:362aaagcagtggttacgtctgtccaatggagttagtgtccttactagcaaagtacttgatct 421
                |||||
AT51908: 6095  aaagcagtagtta-gtctatccaatggagttagtgtccttactagcaaagtacttgatct 6153

BRSV-25-BR:422aaagaac 428
                |||||
AT51908: 6154  aaagaac 6160

Pontuação = 670 bits (338)
Identidade = 404/427 (94%)

```

Figura 18: Alinhamento de sequência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína F do BRSV-25-BR em estudo e similar fragmento do BRSV estirpe AT51908.

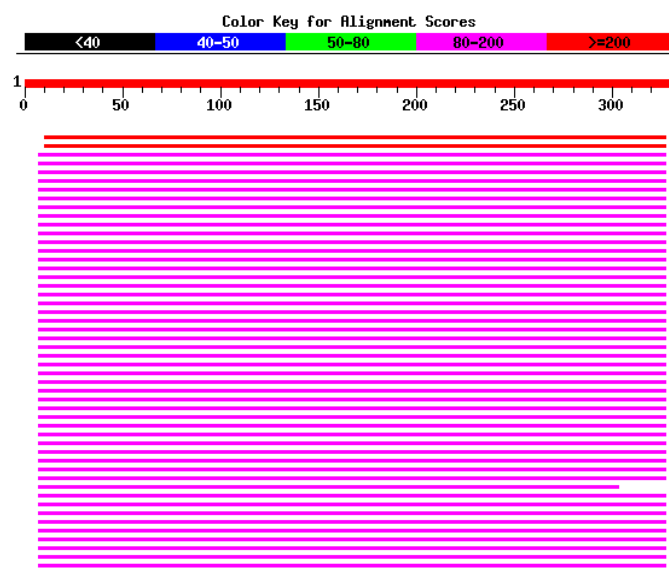


Figura 19: Visualização de alinhamentos da sequência de aminoácidos derivados da proteína G do BRSV-25-BR com as sequências armazenadas no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança.

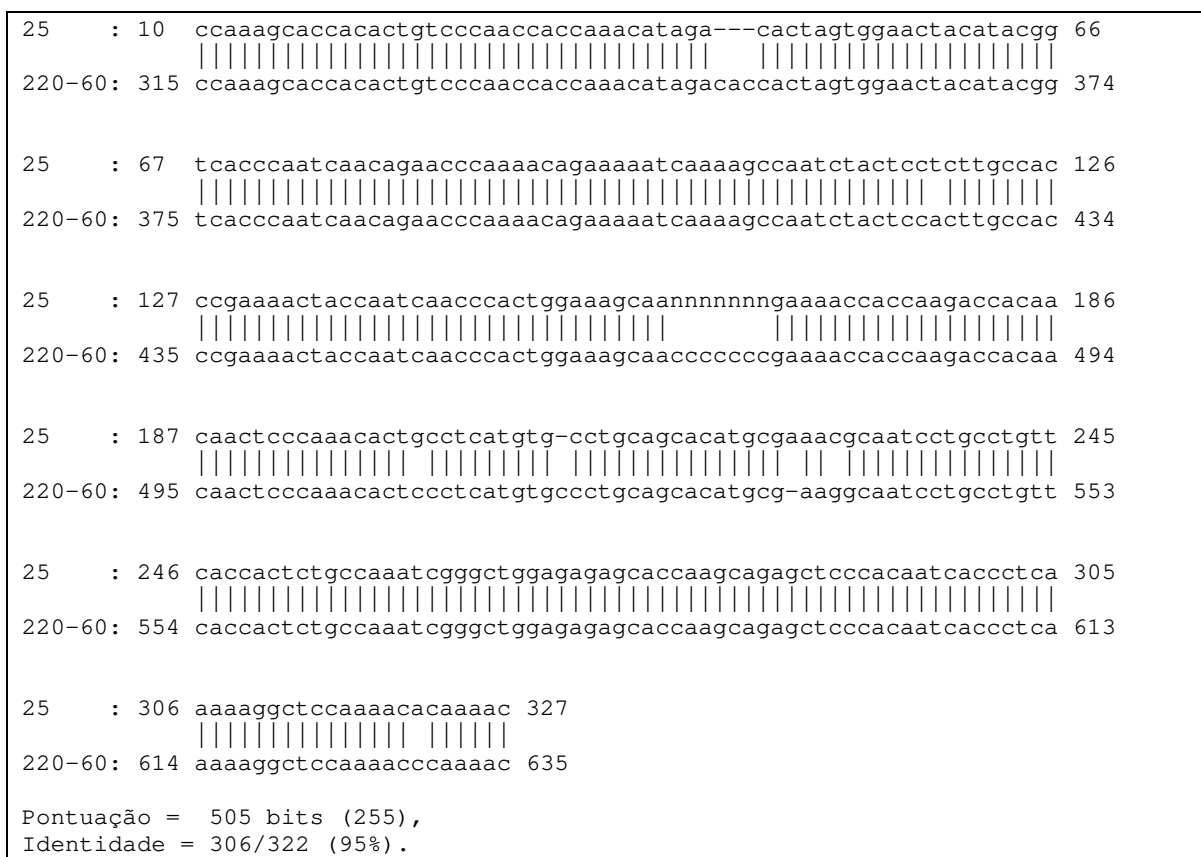


Figura 20: Alinhamento de sequência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína G do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe 220-60, representante do subgrupo B.

```

25   : 7   aatccaaagcaccacactgtcccaaccaccaaacatagac---actagtggaactacata 63
      |||
4642 : 312 aatccaaagcaccacactgtcccaaccaccaaacatagacacaactagtggaaccacata 371
      |||

25   : 64   cggtcacccaatcaacagaacccaaaacagaaaaatcaaaagccaatctactcctcttgc 123
      |||
4642 : 372 cggtcacccaacacagaacccaaaacagaaaaattaaaagccaatctactccacttgc 431
      |||

25   : 124  caccgcgaaaactaccaatcaaccactggaaagcaannnnnnngaaaaccaccaagacca 183
      |||
4642 : 432 caccgcgaaaaccaccaatcaaccactgggaagcaaccccccgaaaaccaccaagacca 491
      |||

25   : 184  caacaactcccaaactgcctcatgtg-cctgcagcacatgcgaaacgcaatcctgcct 242
      |||
4642 : 492 caacaactcccaaactcccccatgtgcctgcagcacatgcg-aaggcaatcctgcct 550
      |||

25   : 243  gttcaccactctgccaaatcgggctggagagagcaccaagcagagctcccacaatcacc 302
      |||
4642 : 551 gttcaccactctgccaaatcgagttggagagagcaccaagcagtgctcccacaatcacc 610
      |||

25   : 303  tcaaaaaggctccaaaacacaaaac 327
      |||
4642 : 611 tcaaaaaggctccgaaacccaaaac 635
      |||

Pontuação = 432 bits (218),
Identidade = 299/325 (92%).

```

Figura 21: Alinhamento de sequência de nucleotídeos entre o fragmento do genoma da proteína G do BRSV-25-BR em estudo (25) e similar fragmento do BRSV estirpe 4642, representante do subgrupo B.