

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

Renata Servan de Almeida

**ADAPTAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE RT-NESTED-PCR E
IMUNO-HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL BOVINO (BRSV)**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Doutor
em Genética e Biologia Molecular na Área de
Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Co-Orientador: Profa. Dra. Liana M. Cardoso Verinaud

Campinas – SP
2004

Trabalho executado no Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, no Laboratório de Virologia do Danish Veterinary Institute (DVI) e da Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dinamarca

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Clarice Weis Arns pela orientação, confiança, carinho e amizade, que transcenderam o trabalho, além das valiosas oportunidades a mim proporcionadas.

À Prof^a. Dr^a. Liana Verinaud pela oportunidade de ingressar nesta instituição e pela co-orientação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo imprescindível apoio financeiro depositado neste trabalho.

Aos demais professores do Depto. de Microbiologia e Imunologia, em especial à Dr^a. Maria Sílvia Gatti, Dr^a. Lucila Ricci, Dr. Tomomasa Yano e Dr. Domingos Leite pelos ensinamentos, amizade e permissão do uso de equipamentos e instalações.

Ao Dr. Lars Erik Larsen do Danish Veterinary Institute, Copenhagen, Dinamarca pela brilhante orientação, amizade, receptividade e principalmente pela valiosa oportunidade de desenvolver parte dos experimentos em seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Birgitte Viuff da Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dinamarca pela solicitude, orientação e concessão do laboratório, equipamentos e reagentes para a realização de parte das reações de imuno-histoquímica.

Ao Dr. Edson Luís Bordin do Laboratório Merial pelas análises histológicas e agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Áureo Yamada do Depto. de Histologia pelos ensinamentos e empréstimo de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini da Faculdade de Ciências Médicas e sua equipe, em especial à Patrícia e ao Luciano pela contribuição essencial na confecção dos cortes histológicos.

Ao amigo Fernando Spilki e ao Prof. Dr. Paulo Roehe que tão gentilmente permitiram e concretizaram a infecção experimental dos bovinos e cederam outras amostras.

À bolsista Joyce Camargo pela agradável convivência e pelo enorme auxílio nos experimentos desenvolvidos.

Ao funcionário do LVA Geneci Davi pelo constante fornecimento de células e pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitado.

A todos os demais funcionários do Instituto de Biologia, em especial à Ana Lúcia, Lúcia, Lourdes, Erivaldo, Marcos, que de alguma forma ajudaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Animal (LVA), Gonçala, Jaqueline, Rodrigo, Lica, Gislaine e Lage pela ajuda em diversas etapas do trabalho e pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Verena, Ângela, Sandra pelas produtivas trocas de idéias e pela disponibilidade no uso do laboratório.

À amiga Regina pela ajuda fundamental na realização do trabalho mas principalmente pela convivência e pela amizade incondicional.

À amiga Lia pelo apoio e ajuda incansável e pela agradável amizade.

A todos os demais amigos que estejam onde estiverem participaram de alguma forma desta conquista.

Ao Geraldo Silveira pelas importantes correções na confecção da tese mas principalmente pelo apoio, estímulo, copanheirismo.

Aos meus pais e irmãos pela confiança, amor e dedicação e por me trazerem tanta alegria.

ÍNDICE

1. RESUMO	X
ABSTRACT	XI
2. INTRODUÇÃO	1
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. HISTÓRICO	4
3.2. TAXONOMIA	4
3.3. ESTRUTURA VIRAL	5
3.4. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	9
3.5 PATOGÊNESE	10
3.6. LESÕES MACROSCÓPICAS	11
3.7. LESÕES MICROSCÓPICAS	12
3.8. EPIDEMIOLOGIA.....	13
3.9. SUBGRUPOS DO BRSV	16
3.10. IMUNOLOGIA	17
3.11. IMUNOPATOLOGIA	20
3.12. DIAGNÓSTICO.....	21
3.13. MODELOS EXPERIMENTAIS	24
3.14. IMUNOPROFILAXIA	25
4. OBJETIVOS	27
ARTIGO 1	28
DETECTION OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN EXPERIMENTALLY INFECTED BALB/C MICE..	28
ARTIGO 2	38
BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS: DETECTION BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN MOUSE AND BOVINE TISSUES	38
ARTIGO 3	62
DETECTION OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV) ISOLATE BY A RT-NESTED-PCR IN EXPERIMENTALLY INFECTED CALVES	62
8. OUTROS RESULTADOS	75
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

10. CONCLUSÕES	84
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
12. ANEXO 1.....	108
13. ANEXO 2.....	109
14. ANEXO 3.....	110

1. RESUMO

O Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) é o agente etiológico de infecções respiratórias amplamente distribuídas e que produzem perdas importantes na criação comercial de bovinos. A infecção pelo BRSV produz alterações patológicas como bronquiolite e pneumonia intersticial e acomete, sobretudo, animais jovens. A limitada multiplicação do vírus em cultivos celulares e a sua instabilidade, representam dificuldades durante os procedimentos de isolamento do BRSV a partir de amostras clínicas. O presente trabalho teve como objetivo padronizar técnicas rápidas, sensíveis e específicas para a detecção do BRSV, utilizando um isolado brasileiro. Para tanto, foram utilizados camundongos Balb/c como modelo de infecção experimental pelo BRSV, a partir dos quais o vírus foi detectado pelas técnicas de RT-nested-PCR e imuno-histoquímica (IHQ) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos em bovinos infectados experimentalmente. A técnica de RT-nested-PCR mostrou-se mais sensível para detecção do BRSV do que a técnica de IHQ, tanto para tecidos murinos quanto bovinos. As técnicas foram utilizadas em tecidos de bovinos suspeitos de infecção por BRSV. Uma destas amostras apresentou resultado positivo no RT-nested-PCR e na IHQ. O sequenciamento dos produtos de PCR deste vírus detectado foi realizado. Esta nova estirpe, juntamente com a descrita previamente BRSV-25-BR (único isolado presente até então no Brasil), é representante do subgrupo B do BRSV e constitui importante ferramenta para a avaliação do perfil dos isolados brasileiros de BRSV, estimar a origem destes isolados e redefinir as necessidades locais com relação ao conteúdo das vacinas. As técnicas de RT-nested-PCR e IHQ padronizadas serão úteis em estudos epidemiológicos bem como, no diagnóstico laboratorial do BRSV no Brasil.

ADAPTATION AND COMPARISON OF RT-NESTED-PCR AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUES FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE SYNCYTIAL VIRUS (BRSV)

ABSTRACT

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is the etiologic agent of widely distributed respiratory infections and is responsible for significant economic losses in commercial cattle production. Infection by BRSV produces pathological changes such as bronchiolitis and interstitial pneumonia and affects mainly young animals. The poor growth of the virus in cell cultures and its instability represent difficulties in virus isolation from clinical samples. The aim of the present work was to standardise fast, sensitive and specific methods to detect BRSV, using a Brazilian strain. For this purpose, Balb/c mice were used as experimental model to the BRSV infection, from which the virus was detected by the RT-nested-PCR and immunohistochemistry (IHC) standardised, and the results were compared with experimentally infected calves. RT-nested-PCR was more sensitive in detecting BRSV than IHC, from both mouse and calf tissues. These techniques were also used to screen calves suspected of being infected with BRSV. One of the suspected samples was positive by RT-nested-PCR and IHC. Sequencing of the PCR products of this sample was carried out. This new isolate and the previously described BRSV-25-BR strain (the only well-known isolate in Brazil) are belong to subgrupo B and provide an important tool to evaluate the profile and to esteem the origin of Brazilian BRSV isolates and to determine the local necessities about the vaccines content. The standardised RT-nested-PCR and IHC techniques could be useful in the epidemiological studies and laboratory diagnosis of BRSV in Brazil.

2. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com o maior rebanho bovino comercial do mundo contando com 180 milhões de animais e uma produção responsável por aproximadamente 7 milhões de toneladas de carne (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2003) e mais de 20 milhões de litros de leite por ano (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003). Visto a grande participação da pecuária na economia brasileira, torna-se justificável a preocupação, tanto das autoridades governamentais como dos profissionais da área, com os aspectos sanitários dos nossos rebanhos.

Diversas são as enfermidades que podem acometer os bovinos, muitas dessas endêmicas no Brasil. Com a intensificação da bovinocultura comercial, a frequência e severidade das doenças respiratórias têm aumentado e o problema atualmente é considerado preocupante em muitos países (Baker et al., 1986; van der Poel et al., 1993; Paton et al., 1998; Obando et al., 1999; Norström et al., 2000; Sorden et al., 2000; Uttenthal et al., 2000; Woldemeskel et al., 2000). As doenças respiratórias em bovinos podem ser classificadas em duas categorias; a primeira inclui doença causada por um único fator, geralmente um microrganismo. A segunda, comumente chamada de síndrome respiratória bovina ou complexo respiratório bovino, tem um desencadeamento multifatorial, parecendo ser influenciada pelo próprio animal (*status* imune e condições gerais), pelo ambiente (condições de alojamento e clima), pelo manejo (número de animais por metro quadrado, animais de diferentes origens, fatores de estresse, precauções profiláticas) e pela presença de agentes infecciosos como vírus e bactérias (Lekeux, 1995; Larsen, 2000). Em geral, este complexo ocorre mais em consequência da interação de fatores desencadeantes de estresse sobre um animal sensível, do que pela ação isolada de um determinado microrganismo (Lekeux, 1995).

No entanto, diversos estudos demonstraram que o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) é o agente viral mais freqüentemente associado a graves epizootias de doença respiratória em bovinos, especialmente em animais jovens (Baker et al., 1986; Samal & Zamora, 1991; Ames, 1993; Collins et al., 1996; van der Poel, 1995).

O diagnóstico laboratorial do BRSV é geralmente baseado em métodos como isolamento do vírus, detecção de antígenos virais, testes sorológicos e histopatológicos. Entretanto, são freqüentes as dificuldades relacionadas à identificação laboratorial de infecções pelo BRSV devido à sua multiplicação limitada em cultivos celulares ou em animais experimentais; e ainda em decorrência da instabilidade da partícula viral, que representam obstáculos para o isolamento deste vírus. Além disso, tais dificuldades demonstram que esta prática é pouco indicada para o diagnóstico de infecções pelo BRSV, mesmo em amostras clínicas contendo altas concentrações do vírus (Dubovi, 1993).

As infecções pelo BRSV são mais comumente diagnosticadas através da detecção de anticorpos específicos no soro dos animais, por técnicas sorológicas como soroneutralização, fixação do complemento, imunofluorescência indireta e ELISA (Westenbrink et al., 1985; Westenbrink & Kimman, 1987). No entanto, limitações relacionadas ao tempo necessário para a obtenção dos resultados (Dubovi, 1993), relatos de infecções assintomáticas indetectáveis sorologicamente (Collins et al., 1996) e evidências de infecções latentes (Ames, 1993; van der Poel et al., 1997; Valarcher et al., 2001), reduzem a eficiência do diagnóstico sorológico.

O BRSV foi isolado pela primeira no Brasil em 1995, a partir de suabes nasais de um bovino soropositivo de 2 meses de idade da raça holandesa, proveniente da região sul do País (Arns et al., 2003). O animal apresentava tosse, secreção nasal e dispnéia grave. O isolamento foi possível somente a partir desta amostra, dentre 33 coletadas a partir de animais que apresentavam sintomatologia semelhantes. Até recentemente, este era o único isolado do

BRSV originado no Brasil. Apesar da confirmação da presença do vírus em rebanhos brasileiros, pouco é sabido sobre a importância de infecções pelo BRSV no País. Isto provavelmente ocorra, em parte, em decorrência da falta de grupos de pesquisa e de diagnóstico trabalhando com este vírus no Brasil e também por acreditar-se que as perdas causadas por estas infecções não representam um problema significativo para a produção bovina explorada de forma extensiva, que corresponde à principal forma de exploração nos rebanhos brasileiros. No entanto, infecções pelo BRSV foram detectadas por análises sorológicas em bovinos no Brasil, indicando que o vírus já infectou 75% dos bovinos provenientes de 65 diferentes fazendas localizadas nos estados da região sul do Brasil (Arns et al., 2003), e mais de 95% dos bovinos brasileiros com mais de 3 anos de idade, com 70% destes animais sendo infectados no primeiro ano de vida (Gonçalves et al., 1993). Alguns estudos sugerem ainda que a presença do BRSV no País ocorre há um longo tempo (Campalans & Arns, 1997).

Com o intuito de reduzir as dificuldades e/ou deficiências mencionadas com relação ao diagnóstico e estudos epidemiológicos das infecções causadas pelo BRSV no Brasil, o presente estudo adaptou as técnicas de RT-nested-PCR e imuno-histoquímica (IHQ) para a detecção de produtos virais em tecidos de camundongos Balb/c infectados experimentalmente para, posteriormente, serem aplicadas na detecção do BRSV em tecidos oriundos de bovinos infectados, tanto natural quanto experimentalmente. Além disso, foram realizadas infecções experimentais de bovinos com um isolado brasileiro de BRSV, para caracterização da sintomatologia reproduzida. Ainda com objetivos direcionados aos aspectos epidemiológicos da infecção no Brasil, uma estirpe de BRSV detectada de um bovino naturalmente infectado, foi parcialmente sequenciada e comparada com isolados do vírus oriundos de outros países.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Histórico

O vírus respiratório sincicial (RSV) foi descrito pela primeira vez em 1955 durante um episódio de doença respiratória que acometeu chimpanzés de um laboratório em Washington (Morris et al., 1956). O agente viral isolado nesta ocasião, e inicialmente denominado *Chimpanzee Coryza Agent*, foi posteriormente renomeado *Respiratory Syncytial Virus* ou vírus respiratório sincicial, baseado em seu efeito citopático característico em cultivos de células (Chanock et al., 1957). Diversos estudos adjacentes levaram ao estabelecimento da importância do RSV na doença respiratória em crianças do mundo inteiro (Chanock et al., 1961), e o agente passou a ser conhecido com *Human Respiratory Syncytial Virus* (HRSV). Mais de uma década depois, um vírus intimamente relacionado ao HRSV foi isolado de bovinos em um episódio de doença respiratória grave na Suíça, sendo este denominado *Bovine Respiratory Syncytial Virus* (vírus respiratório sincicial bovino, BRSV) (Paccaud & Jacquire, 1970).

3.2. Taxonomia

O BRSV é estruturalmente relacionado ao HRSV em mais de 80% em algumas proteínas (Zamora & Samal, 1992). Estes dois vírus, juntamente com outro morfológicamente similar, mas antigenicamente distinto, o vírus da pneumonia dos camundongos, constituem o gênero *Pneumovirus*, subfamília *Pneumovirinae* da família *Paramyxoviridae*. Os membros da subfamília *Pneumovirinae* diferem dos demais paramixovírus pela ausência das proteínas neuraminidase e hemaglutinina e em certas dimensões das projeções de superfície e no diâmetro do nucleocapsídeo do vírus (Stott & Taylor, 1985).

3.3. Estrutura viral

Morfologicamente, o BRSV apresenta-se como uma partícula, envelopada e altamente pleomórfica com um diâmetro médio de 200 nm. Em um vírion intacto, a única estrutura visível é o envelope externo de 7 a 15 nm de espessura recoberto com projeções de 7 a 19 nm de comprimento. A partícula viral inclui ainda um núcleo eletrodenso constituído de uma nucleoproteína firmemente associada ao genoma RNA fita simples (Ito et al., 1973). Um desenho esquemático da estrutura geral do BRSV está demonstrado na Figura 1.

3.3.1. Polipeptídeos e ácido nucléico viral

Dez polipeptídeos já foram identificados no BRSV e são codificados por 85% de um genoma de 15.222 nucleotídeos (Huang & Wertz, 1982) (Figura 2). O genoma é constituído por uma única fita de RNA linear de polaridade negativa. Todas as etapas do ciclo replicativo do BRSV ocorrem no citoplasma da célula, a exemplo dos demais vírus que possuem RNA de sentido negativo (Larsen, 2000).

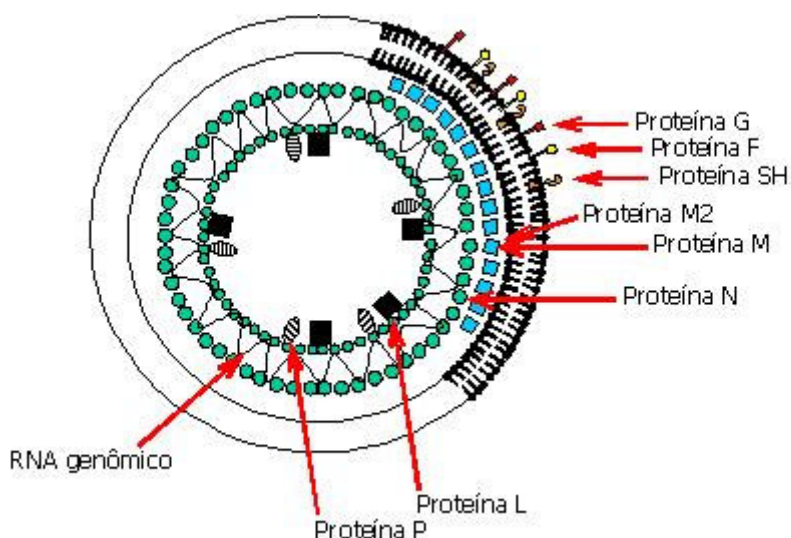


Figura 1: Estrutura da partícula do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) (adaptado de Larsen, 2000).

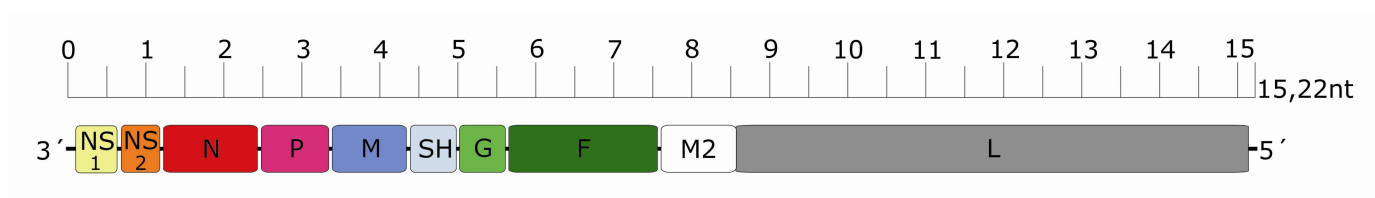


Figura 2: Estrutura genômica do BRSV (gentilmente cedida pela Méd. Vet. Helena Lage Ferreira).

Glicoproteína G

A função da glicoproteína G encontra-se sob revisão pois embora a ela seja atribuída a atividade de ligação do vírus à célula alvo, Schlender et al. (2003) encontraram que a glicoproteína G não é essencial a esta função, embora seja capaz de aumentar a infectividade viral. É a única entre as proteínas análogas dos membros de família *Paramyxoviridae* que não possui atividade de hemaglutinina e neuraminidase (Richman et al., 1971), como também não responde pela especificidade do vírus à célula hospedeira (Schlender et al. 2003). O RNA mensageiro (mRNA) que dá origem à proteína G compreende, na maioria dos isolados de BRSV, 838 nucleotídeos excluindo a cauda poli-A (Larsen, 2000). Este mRNA contém uma única janela de leitura, que codifica um polipeptídeo de 257 aminoácidos (Larsen et al., 1998). As proteínas G do HRSV e BRSV são típicas proteínas integrais de membranas, com um atípico *loop* de cisteína (Larsen, 2000). A proteína pode se apresentar como um multímero (dímero ou trímero), e constitui-se na proteína menos conservada entre isolados de BRSV e entre estes e isolados de HRSV (Lerch et al., 1990; Samal & Zamora, 1991).

Glicoproteína F

A glicoproteína F encontra-se situada na superfície do vírion e é responsável pela fusão das membranas do envelope viral e citoplasmática da célula alvo e pela produção de sincícios entre células infectadas (Matheise et al., 1995). A proteína F dos RSVs está relacionada, estrutural e funcionalmente, à proteína F dos demais paramixovírus (Richardson et al., 1986). O gene da glicoproteína F codifica um polipeptídeo de 574 aminoácidos a partir de uma única janela de leitura (Lerch et al., 1991). Representa a proteína mais conservada entre isolados de BRSV, com 97% a 99% de homologia e possui um papel importante na geração de imunidade protetora contra infecções por RSVs (Himes & Gershwin, 1992; Matheise et al., 1995). A glicoproteína F é formada por duas subunidades, F₁ e F₂, geradas a partir de um precursor F₀ e então ligadas por pontes dissulfídicas (Lerch et al., 1991). A subunidade F₂ é responsável pelo comportamento espécie-específico dos RSVs (Schlender et al., 2003).

Proteína hidrofóbica pequena (Proteína small hydrophobic) (SH)

A proteína SH é uma proteína integral de membrana com a porção C-terminal localizada na região extracelular da membrana (Collins & Mottet, 1993). A SH pode apresentar-se sob diversas formas, como revelaram estudos realizados por Anderson et al. (1992) e Olmsted & Collins (1989). A sequência de nucleotídeos correspondente à proteína pode gerar polipeptídeos de 81 a 73 aminoácidos (Samal & Zamora, 1991). A sua função ainda não foi totalmente esclarecida, mas parece aumentar a eficiência de fusão entre membranas promovida pela proteína F e, portanto, contribuir para a formação de sincícios (Pastey & Samal, 1997).

Proteína matrix (M)

A sequência nucleotídica que codifica esta proteína gera um polipeptídeo de 256 aminoácidos (Samal & Zamora, 1991). A proteína apresenta uma única região hidrofóbica. A

sua função ainda não está totalmente elucidada, mas parece estar envolvida na interação entre o nucleocapsídeo viral e a membrana da célula hospedeira, antes da montagem, maturação e brotamento dos vírions (Larsen, 2000). A proteína M parece também interagir com a proteína NS1 (Evans et al., 1996).

Proteínas do complexo do nucleocapsídeo e associadas

Os corpúsculos de inclusão formados por estas proteínas no citoplasma das células infectadas pelos RSVs possuem característica amorfa e, até recentemente, eram encontrados exclusivamente no citoplasma e nas vizinhanças do núcleo celular (Larsen, 2000), embora as nucleoproteínas (N) do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) e coronavírus tenham sido encontradas em uma localização nuclear atípica (Rowland et al., 1999; Chen et al., 2002).

O mRNA de 1196 nucleotídeos que codifica a nucleoproteína N produz um polipeptídeo de 391 aminoácidos (Mallipeddi et al., 1990). Estudos realizados por Barr et al. (1991) sugerem um alto grau de homologia entre as proteínas N dos diferentes RSVs.

A fosfoproteína P do BRSV tem 860 nucleotídeos que geram uma proteína de 241 aminoácidos a partir de uma única janela de leitura (Larsen, 2000). Análises de diferentes isolados de BRSV demonstraram um grau de homologia de 97% na proteína P (Mallipeddi & Samal, 1992). Juntamente com a proteína N, a proteína P forma agregados citoplasmáticos conhecidos como corpúsculos de inclusão nas células infectadas, cuja relevância para o ciclo replicativo do RSV ainda não foi totalmente definida (Garcia-Barreno et al., 1996).

A proteína M2 não parece ter homólogo em outros vírus RNA de polaridade negativa não segmentados, e está associada ao complexo do nucleocapsídeo dos RSVs (Garcia et al., 1993). A sequência de 958-962 nucleotídeos possui duas janelas de leitura (ORF1 e ORF2), que codificam as proteínas de 186 aminoácidos e 95 aminoácidos, respectivamente

(Mallipeddi et al., 1990; Collins et al., 1990). O polipeptídio de 186 aminoácidos está envolvido na elongação da transcrição, enquanto que o polipeptídio de 95 aminoácidos parece estar associado à inibição da síntese de RNA (Hardy & Wertz, 1998).

O gene que codifica a proteína L do BRSV consiste de 6562 nucleotídeos e contém uma única janela de leitura de 2161 aminoácidos. A proteína compartilha 84% de identidade com a proteína homóloga do HRSV (Larsen, 2000). A proteína L é considerada responsável por formar o componente enzimático da RNA-polimerase RNA dependente viral.

O complexo do nucleocapsídeo (ou complexo ribonucleoprotéico) é composto pelo nucleocapsídeo viral associado com as proteínas N, P, M2 e L e é requerido para transcrição e replicação do genoma do BRSV (Collins et al., 1996).

Os RSVs são os únicos entre os paramixovírus que possuem dois genes que codificam para proteínas não estruturais (NS) precedendo a nucleoproteína. O gene da NS1 do BRSV possui 524 bases que codificam um polipeptídio de 136 aminoácidos formando esta proteína que atua como um potente inibidor da transcrição e replicação do RNA viral (Atreya et al., 1998). A NS2 é formada por 124 aminoácidos codificados por 488 nucleotídeos e foi determinada por não ser necessária para a replicação do vírus *in vitro* (Buchholz et al., 1999).

3.4. Propriedades físico-químicas

O BRSV é sensível a pH baixo e aquecimento a 56°C por 30 minutos (Paccaud & Jacquier, 1970). A exposição a dietiléter, clorofórmio e outros solventes lipídicos destrói a infectividade viral (Paccaud & Jacquiere, 1970; Smith et al., 1975). O vírus é extremamente lábil, mas permanece estável em temperaturas de -50°C ou mais baixas por muitos meses, embora episódios de congelamento e descongelamento também destruam a infectividade (Larsen, 2000). O BRSV tem uma densidade de 1,23 g/mL determinado por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose (Ito et al., 1973).

3.5 Patogênese

Embora a patogênese das infecções pelo BRSV não tenha sido totalmente esclarecida, diversas evidências apontam para a importante participação de mecanismos mediados pelo sistema imune. Um outro aspecto a ser considerado é que a infecção pelo BRSV aumenta a aderência e colonização bacteriana por alteração dos mecanismos específicos e inespecíficos de defesa do trato respiratório (Larsen, 2000). Por estas razões, estima-se que 90% das pneumonias bacterianas em geral desenvolvem-se após uma infecção viral prévia (Babiuk et al., 1988).

Em bovinos, após a penetração por rotas respiratórias, o BRSV replica-se em células epiteliais da mucosa nasal, faringe, traquéia e pulmões (Mc Nulty et al., 1983; Thomas et al., 1984; Castleman et al., 1985). Uma fase virêmica ainda não foi relatada; e o vírus é raramente detectado fora do sistema respiratório (van der Poel et al., 1996). Antígenos virais podem ser detectados na mucosa da nasofaringe dois dias após infecção experimental de bovinos, bem como nos linfonodos traqueobronquiais, enquanto que as células pulmonares somente aparecem infectadas 4 a 13 dias após a infecção (Mc Nulty et al., 1983; Bryson et al., 1983; Castleman et al., 1985; West et al., 1998; Larsen et al., 1999; Valarcher et al., 1999). As primeiras células pulmonares infectadas são aquelas do epitélio bronquiolar e, posteriormente, as células dos alvéolos (Thomas et al., 1984; Castleman et al., 1985). Antígenos virais podem também ser detectados nos macrófagos alveolares, embora relatos referentes ao papel destas células na patogenia do BRSV sejam conflitantes (Castleman et al., 1985; Olchoway et al., 1994; Schrijver et al., 1995; Keles et al., 1998; Valarcher et al., 2001). É provável que no mínimo um subgrupo de macrófagos alveolares possam ser permissivos à replicação viral e, portanto, contribuir para a patogênese da infecção, ou seja, por uma redução da habilidade funcional (Olchoway et al., 1994; Larsen, 2000). Os macrófagos, uma vez ativados, também

podem liberar citocinas que potencialmente contribuem para as lesões (Schrijver et al., 1995; Sharma & Woldehiwet, 1996). Em bovinos experimentalmente infectados, o BRSV foi isolado de secreções nasais já às 24 horas pós-infecção (Elazhary et al., 1980). No entanto, o pico de excreção do vírus em secreções nasais ou pulmonares e em células pulmonares ocorre de 4 a 8 dias após a infecção, podendo se estender até 10 a 12 dias, ou ser detectado por PCR até o dia 17 após a infecção (Jacobs & Edington, 1975; Elazhary et al., 1980; Thomas et al., 1984; van der Poel et al., 1996; van der Poel et al., 1997; West et al., 1998; Valarcher et al., 1999; Tjørnehøj et al., 2003). O vírus pode ser detectado em células oriundas de lavado pulmonar aos 2 dias após infecção ou isolado do tecido pulmonar igualmente na fase precoce da infecção, aos 3 dias após a mesma e persistir neste tecido além de 17 dias após a infecção, como foi detectado por PCR (Castleman et al., 1985; van der Poel et al., 1996; Valarcher, et al., 1999). Dos tecidos traqueais o vírus foi igualmente detectado precocemente às 24 horas e isolado aos 4 dias após o início da infecção experimental e continuou a ser detectado além dos 10 dias subsequentes (Jacobs & Edington, 1975; McNulty et al., 1983; Castleman et al., 1985).

3.6. Lesões macroscópicas

As mucosas da cavidade nasal, traquéia e brônquios dos animais infectados podem apresentar-se hiperêmicas, especialmente nos estágios iniciais da infecção (Bryson et al., 1983). Uma típica pneumonia intersticial é um achado de necropsia consistente em infecções naturais causadas pelo BRSV, particularmente envolvendo a porção crânio-ventral dos pulmões (Keister, 1981; Bryson et al., 1983; Castleman et al., 1985; Collins et al., 1988; Kimman et al., 1989; Viuff et al., 1996; Flores et al., 2000). Nesta região, a consolidação pode comprometer desde pequenas áreas até a metade da área total do pulmão (Bryson et al., 1983; Kimman et al., 1989; Larsen, 2000; Tjørnehøj et al., 2003). Exsudato mucopurulento, hemorragia e enfisema podem estar presentes (Johnson et al., 1982a; Bryson et al., 1983;

Flores et al., 2000; Tjørnehøj et al., 2003). O septo interlobular muitas vezes aparece espessado devido ao edema pronunciado causado por bronco-obstrução ampla que pode levar à dispnéia grave (Pirie et al., 1981; Larsen, 2000). As porções dorsal e cranio-dorsal do pulmão podem apresentar-se normais em muitos casos, mas podem também estar marcadamente distendidas, devido ao edema e enfisema intersticial e alveolar severos (Larsen, 2000). Os linfonodos regionais do trato respiratório, mais especificamente bronquiais e mediastínicos, aparecem muitas vezes acentuadamente aumentados e edematosos. Em infecções experimentais realizadas por alguns autores, pode-se observar somente poucas alterações nos 2 a 5 dias pós-infecção, alterações profundas aos 5 a 8 dias e posterior recuperação das lesões voltando-se, novamente, a observar alterações mais leves aos 10 a 14 dias (Bryson et al., 1983; Castleman et al., 1985). Em contraste, Tjørnehøj et al. (2003) observaram a persistência de sintomatologia clínica como tosse, descarga nasal e lesões como consolidação pulmonar até os dias 15 a 30 pós-inoculação. Thomas et al. (1984) ainda puderam constatar alterações graves aos 14 a 16 dias após a infecção experimental de bovinos.

3.7. Lesões microscópicas

Em animais naturalmente infectados pelo BRSV, o principal achado histopatológico é a presença de células sinciciais no epitélio bronquiolar e alveolar (Bryson et al., 1983; Kimman, 1989; Driemeier et al., 1997; Flores et al., 2000; Tjørnehøj et al., 2003), decorrente da capacidade do vírus de produzir fusão celular. Estes sincícios podem conter corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (Bryson et al., 1983; Sharma & Woldehiwet, 1991). Bronquite, peribronquite e bronquiolite são, igualmente, achados histológicos característicos em bovinos após infecção natural pelo BRSV (Bryson et al., 1983; Collins et al., 1988; Viuff et al., 1996; Tjørnehøj et al., 2003). Outras importantes alterações histopatológicas incluem pneumonia intersticial difusa, espessamento da parede alveolar, proliferação do epitélio

bronquiolar com perda de cílios, epitelização alveolar, formação de membranas hialinas, edema e exsudato nos espaços alveolares, bronquiais e bronquiolares, colapso de alvéolos, infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (Pirie et al., 1981; Bryson et al., 1983; Baker & Frey, 1985; Kimman, 1989; Driemeier et al., 1997; Tjørnehøj et al., 2003).

3.8. Epidemiologia

O BRSV tem distribuição mundial (van der Poel et al., 1993; Gonçalves et al., 1993; Campalans & Arns, 1997; Paton et al., 1998; Obando et al., 1999; Norström et al., 2000; Sorden et al., 2000; Uttenthal et al., 2000; Woldemeskel et al., 2000). No entanto, uma estimativa precisa da incidência do BRSV é difícil, uma vez que outros patógenos como o vírus da parainfluenza-3 (PI-3), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), coronavírus bovino, herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) e agentes bacterianos podem estar envolvidos, assim como a grande labilidade do vírus, o que dificulta seu isolamento e interfere no sucesso do diagnóstico das infecções (Kimman et al., 1986; Larsen, 2000). Por outro lado, surtos de doença respiratória podem ser desencadeados por uma infecção subclínica prévia por BRSV (Larsen et al., 1999). Em regiões endêmicas, surtos de doença respiratória muitas vezes ocorrem esporadicamente, envolvendo apenas grupos de animais mais suscetíveis (Larsen, 2000). Em surtos ocorridos naturalmente, a doença clínica é raramente observada em animais com idade inferior a 2 semanas, sendo mais grave em bezerros de 1 a 5 meses de idade e rara em animais com mais de 9 meses (Baker et al., 1986). Entretanto, alguns autores relataram doença grave em animais adultos seguinte à infecção por BRSV (Ellis et al., 1996; Elvander, 1996).

Embora a forma de transmissão do BRSV durante a infecção natural não seja completamente definida, Larsen (2000) refere-se à provável necessidade do contato direto entre animais infectados e não infectados para que ela ocorra. Dados experimentais, no

entanto, sugerem que a transmissão por aerossóis pode ocorrer em curtas distâncias (Mars et al., 1999). Estudos realizados por Tjørnehøj et al. (2003) demonstraram que após a exposição de animais ao BRSV por aerossóis e inoculação intratraqueal, estes apresentaram lesões que muito se assemelharam às alterações encontradas na pneumonia aguda causada pelo vírus a campo. Desta forma, os autores sugerem que a inoculação por aerossol com exposição durante 10 minutos provavelmente seja a forma mais próxima da transmissão natural da infecção.

Em climas temperados, a maioria dos surtos associados ao BRSV ocorre no início do inverno, embora episódios severos da doença já tenham sido relatados durante os meses de verão (Pirie et al., 1981; Bohlender et al., 1982; van der Poel et al., 1993). Ainda não se tem conhecimento de como o BRSV mantém-se entre os surtos. É possível que esta sobrevivência seja mantida pela circulação do vírus, em baixos níveis, entre os animais soropositivos, dos quais este pode ser periodicamente reativado (van der Poel, 1995). O reaparecimento do vírus em rebanhos fechados pode também ser explicado pela persistência deste no organismo infectado, uma vez que a aplicação de corticosteróides em animais previamente infectados resultou em um aumento de 4 vezes nos títulos de anticorpos específicos e que houve detecção viral até 71 dias após a infecção nos linfonodos traqueobronquiais e mediastínicos (van der Poel et al., 1997; Valarcher et al., 2001). Mudanças repentinas de clima podem aumentar a incidência da infecção, particularmente no surgimento de dias úmidos e ventosos que muitas vezes coincidem com o início de doença respiratória (Baker et al., 1986). Fatores que afetam a atividade mucociliar, como níveis elevados de amônia no ambiente, alta umidade do ar, variações extremas de temperatura, são considerados fatores participantes (Bryson et al., 1978; Baker et al., 1986). Embora o alojamento separado e em boas condições; e o adequado manejo dos animais tenham demonstrado que diminuem significativamente a incidência de infecções causadas por BRSV (Kimman et al., 1988), rebanhos em excelentes condições nestes aspectos

também podem experimentar surtos severos, sugerindo que o BRSV pode causar doença sem que haja fatores ambientais predisponentes (Baker et al., 1986).

A morbidade da infecção pelo BRSV pode atingir 80 a 100% do rebanho. No entanto, a taxa de mortalidade raramente excede 5 a 10%, embora possa, ocasionalmente, ser mais alta (Inaba et al., 1972; Bryson et al., 1978).

No Brasil, apesar de possuir o maior rebanho comercial bovino com 180 milhões de animais, o conhecimento com relação ao significado das infecções por BRSV em perdas econômicas ainda é escasso. No entanto, análises sorológicas realizadas em animais provenientes de diversos estados brasileiros demonstram que 75% dos bovinos adultos ou >95% dos animais com idade igual ou inferior a 3 meses apresentam anticorpos específicos para o BRSV (Campalans & Arns, 1997; Gonçalves et al., 1993). O BRSV foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1993 em amostras de tecido pulmonar e traqueal de bovinos provenientes do Rio Grande do Sul (Gonçalves et al., 1993) e isolado pela primeira vez em 1995 a partir da secreção nasotraqueal de um animal originado do mesmo estado (Arns et al., 2003). Este isolado brasileiro foi parcialmente seqüenciado e classificado como pertencente ao subgrupo B do BRSV (Campalans J, Costa SCB, Arns CW, submetido). Este achado é de grande relevância uma vez que, isolados do subgrupo B não eram encontrados desde 1976 e, portanto, acreditava-se que não mais circulavam (Furze et al., 1997; Stine et al., 1997). Por esta razão, as 3 vacinas utilizadas atualmente nos rebanhos brasileiros provavelmente são produzidas com antígenos virais pertencentes ao subgrupo A ou AB e, portanto, este fator pode responder, ao menos em parte, pelas falhas de proteção muitas vezes encontradas após a utilização destas vacinas no País.

3.9. Subgrupos do BRSV

Com base na reatividade antigênica usando anticorpos monoclonais (AcMs) específicos para a proteína G, os isolados de BRSV foram classificadas em 3 subgrupos designados A, B e AB ou intermediário (Furze et al., 1994; Schrijver et al., 1996a; Furze et al., 1997; Larsen et al., 1998). Estudos de mapeamento de epitopos demonstraram que os AcMs utilizados para subgrupar os isolados de BRSV foram direcionados a uma região compreendida entre os aminoácidos 174 e 210, a qual é rica em cisteína, sendo que três posições nesta região (180, 183 e 184), parecem ser importantes para a reatividade antigênica destes isolados (Furze et al., 1997). Mudanças únicas de aminoácidos nestas regiões, localizadas no domínio extracelular e porção C-terminal da proteína, podem determinar conseqüências estruturais e funcionais, dando origem aos subgrupos (Lerch, et al., 1990). Embora estes subgrupos exibam considerável diversidade quanto ao padrão de reação com AcMs, apresentam uma limitada variabilidade na seqüência nucleotídica (Mallipeddi & Samal, 1993; Larsen, 2000). A variabilidade observada entre os subgrupos do BRSV é muito menor do que aquela observada entre os subgrupos A e B do HRSV (Furze et al., 1997; Larsen et al., 1998). Na realidade, a divergência na extensão de aminoácidos entre os subgrupos do BRSV é similar àquela observada entre os isolados do mesmo subgrupo de HRSV (Cane et al., 1991; Sullender et al., 1991). Apesar disto, estas diferenças existentes na seqüência de aminoácidos da proteína G entre os subgrupos de BRSV parecem ter um importante efeito sobre o reconhecimento de anticorpos (Furze et al., 1997). No entanto, o significado biológico do aparecimento de diferentes subgrupos de BRSV não foi ainda determinado e algum grau de proteção cruzada tem sido observado (Larsen, 2000).

3.10. Imunologia

Apesar de intensos estudos durante décadas de pesquisa em imunologia relacionados a infecções por HRSV e BRSV, muitas questões permanecem por ser esclarecidas. Ainda não foi possível elucidar, por exemplo, a ligação entre proteção e nível de anticorpos produzidos ativamente ou adquiridos passivamente na infecção natural pelo BRSV (Larsen, 2000). Sabe-se que o sistema imune tem uma evidente participação na patologia exercida pelo BRSV. No entanto, muitas dúvidas ainda existem com relação aos mecanismos imunopatológicos das infecções por estes vírus.

Anticorpos sistêmicos ativamente produzidos

Diversos experimentos relacionados à cinética da resposta humoral para o BRSV têm revelado resultados contraditórios. Schrijver et al. (1996b) observaram a produção de IgM por um período mais prolongado em infecções naturais, quando comparado com animais experimentalmente infectados e, que, estes últimos, apresentaram títulos de anticorpos mais baixos. Em contraste, Uttenthal et al. (2000) encontraram maiores níveis de IgG1 em animais experimentalmente infectados do que em animais naturalmente infectados. As contradições continuam ao analisar-se os resultados encontrados com relação ao tempo de aparecimento das imunoglobulinas. Castleman et al. (1985) e Elazhary et al. (1984) detectaram anticorpos tão precoce quanto 3 dias após inoculação. Em contrapartida, análises realizadas em outros estudos não foram capazes de detectar anticorpos antes dos 6 a 10 dias após a inoculação (Jacobs & Edington, 1975; Kimman et al., 1987; Uttenthal et al., 2000). Diversos autores detectaram anticorpos da classe IgM no soro de animais experimentalmente infectados por 7 a 29 dias (Thomas et al., 1984; Westenbrink et al., 1985; Kimman et al., 1987) enquanto que Uttenthal et al. (2000) detectaram esta imunoglobulina apenas durante 5 a 10. Anticorpos da subclasse IgG1 foram detectados do dia 8 ao dia 17 após inoculação, atingiram o pico entre os

dias 24 e 38 dias e permaneceram detectáveis até 8 meses após a infecção experimental (Kimman et al., 1988; Schrijver et al., 1996b; Uttenthal et al., 2000). Os anticorpos da classe IgG2 não foram detectados no soro até os dias 25 a 86 mas permaneceram detectáveis por no mínimo 8 meses (Kimman et al., 1987; Uttenthal et al., 2000). Uma característica do perfil das imunoglobulinas produzidas em resposta à infecção pelo BRSV é a presença de IgE, encontrada em torno de 9 dias após a infecção (Stewart & Gershwin, 1989; Gershwin et al., 2000).

Anticorpos maternos

Uma das características marcantes das infecções graves pelo BRSV é que elas ocorrem na sua maioria em animais de 1 a 3 meses de idade, os quais, em geral, ainda apresentam anticorpos maternos (Stott et al., 1980; Kimman et al., 1988). No entanto, estes autores também descrevem que anticorpos passivamente transferidos podem ser protetores até um certo grau, uma vez que a severidade e a incidência da doença em animais com menos de 3 meses de idade são vistas por serem inversamente relacionadas ao nível de anticorpos maternos séricos, específicos para o BRSV. Além disso, embora alguns autores tenham concluído que a presença de IgG1 transferida via colostro possa suprimir o desenvolvimento de anticorpos para o BRSV, a presença de altos níveis de imunidade passiva pode prevenir a excreção viral, sintomas clínicos e alterações pulmonares (Kimman et al., 1987; Belknap et al., 1991).

Resposta celular

Diversos estudos relacionados à resposta imune mediada por células direcionada para o BRSV, embora ainda contraditórios, apontam para o papel fundamental das células T CD8⁺ na eliminação do vírus de organismos infectados (Thomas et al., 1996; Gaddum et al., 2003); seja através de citotoxicidade direta ou pela liberação de citocinas. Ocorre um aumento destas

células no tecido pulmonar, verificado aos 7 a 10 dias após a infecção por BRSV (Gaddum et al., 2003; McInnes et al., 1998). Os resultados obtidos com relação à proliferação de células CD4⁺ demonstraram resultados diferenciados. Enquanto Ellis et al. (1992) encontraram uma proliferação significativa destas células após vacinação de bovinos com vírus vivo modificado ou inativado, Gershwin et al. (2000) relataram uma redução no número de células CD4⁺ e aumento de linfócitos B em animais inoculados com BRSV. No entanto, os resultados observados por Ellis et al. (1992) podem ter tido influência do tipo de vacina utilizada ou o adjuvante presente. A depleção de células CD8⁺ em animais infectados experimentalmente não afetou a resposta de anticorpos tanto local quanto sistêmica enquanto que a depleção de células CD4⁺ levou a uma alteração na resposta humoral (Taylor et al., 1995; Thomas et al., 1996). A diminuição de ambos os tipos de célula levou a um aumento na severidade da consolidação pulmonar, mas somente a depleção de células CD8⁺ resultou em atraso na eliminação do BRSV (Thomas et al., 1996). Gaddum et al. (2003) relatam que as proteínas F, N e M2 do BRSV são os principais antígenos reconhecidos por células TCD8⁺ embora estas células também reconheçam a proteína G. No entanto, estes autores sugerem que o reconhecimento da proteína F pelas células CD8⁺ pode ter curta duração.

Citocinas imunoregulatórias como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), IL-4 e IL-10 também são produzidas por células mononucleares pulmonares e circulantes em bovinos como respostas a infecções pelo BRSV (McInnes et al., 1998; Gershwin et al., 2000). O IFN- γ é produzido por células CD8⁺, entre outras, e provavelmente participa na eliminação do BRSV de organismos infectados juntamente com outras citocinas (Gaddum et al., 2003).

3.11. Imunopatologia

Sabe-se que o sistema imune pode contribuir para a exacerbação da infecção pelo BRSV, mas o mecanismo exato envolvido não está esclarecido. A ativação do sistema complemento, reações de hipersensibilidade tipo I, II e III e uma exacerbação dependente de anticorpos são os fenômenos sugeridos (Kimman et al., 1989; Kimman & Westenbrink, 1990; Kimpen et al., 1992; Gimenez et al., 1996). Além disso, a forma, dose, rota de administração e tipo de adjuvante empregado podem também influenciar no tipo de resposta montada contra os RSVs (Taylor et al., 1987; Vaux Peretz et al., 1992). A idade, espécie e *status* imunológico do animal, bem como a quantidade e qualidade dos anticorpos locais e sistêmicos, igualmente parecem ter influência sobre o grau de proteção (Larsen, 2000). Os mecanismos envolvidos nos efeitos imunopatológicos dos anticorpos não foram totalmente elucidados até o presente. No entanto, Stewart & Gershwin (1989) descreveram uma correlação entre os níveis de IgE específicas para o BRSV no soro de bovinos e a resposta sintomática após a inoculação de vírus nestes animais. Estes achados são reiterados pelos estudos realizados por Gershwin et al. (1990 e 2000). As imunoglobulinas do isotipo E desencadeiam a degranulação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, levando a conseqüências como citotoxicidade celular e reações de hipersensibilidade, que podem provocar exacerbação dos sinais respiratórios (Abbas et al., 2000). Diversos estudos também indicam que a predominância de células do tipo T helper 2 (Th2) pode ser responsável pelas alterações imunopatológicas observadas após a infecção ou vacinação pelos RSVs (Jackson & Stott, 1996), pela tendência de induzirem a produção de IgE (Wellinver et al., 1981) e que diferentes proteínas destes vírus ativam diferentes subgrupos de células T helper (Alwan & Openshaw, 1993; Jackson & Stott, 1996; Gershwin et al., 1998). Citocinas também estão envolvidas no tipo de resposta imune desencadeada. Infecção prévia, vacinação e anticorpos maternos são exemplos de fatores que podem mudar o balanço da

resposta local de citocinas e desencadear uma resposta protetora (tipo Th1) ou iniciar a cascata que, subseqüentemente, leva à exacerbação da doença (tipo Th2) (Abbas et al, 2000). Gershwin et al. (2000) detectaram níveis aumentados de IL-4 em animais infectados pelo BRSV, interleucina esta direcionadora de respostas do tipo Th2, embora estes autores não tenham sido capazes de detectar reações polarizadas para este tipo de resposta nestes animais. A sugestão da associação de citocinas do tipo 2, como IL-4 e IL-10, com patologias mais graves decorrentes de infecções por BRSV em bovinos também surge ao avaliar-se os resultados dos trabalhos realizados por McInnes et al. (1998), que encontraram mRNA destas citocinas somente em células mononucleares pulmonares e circulantes de animais com consolidação pulmonar grave. Além disso, a presença de IL-4 nos pulmões de bovinos - infectados pelo BRSV pode afetar o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos CD8+ específicos para o vírus e, como anteriormente mencionado, conhecidos como importantes células envolvidas na eliminação do vírus do organismo infectado (Taylor et al., 1995). McInnes et al. (1998) ainda comentam que a produção de IL-4 e IL-10 durante infecções pelo BRSV pode limitar a expansão clonal de células T, resultando em uma baixa frequência de células de memória resultantes da infecção. Este fenômeno poderia explicar a falha de muitas infecções naturais em induzir uma resposta imune protetora e duradoura.

3.12. Diagnóstico

Dificuldades associadas ao diagnóstico laboratorial de infecções pelo HRSV são muitas vezes evidenciadas durante procedimentos laboratoriais para o diagnóstico de infecções pelo BRSV. Estes problemas incluem dificuldades de isolamento de vírus, reagentes de diagnóstico ineficientes e respostas sorológicas dificultadas pela presença de anticorpos maternos, infecções assintomáticas ou latentes (Kimman et al, 1988, Dubovi, 1993; Ames, 1993; Collins et al., 1996; van der Poel et al., 1997; Valarcher et al., 2001). Estas dificuldades

prejudicaram a tal ponto que muitos esforços foram empreendidos para aumentar a eficiência de técnicas laboratoriais de detecção de infecções pelo BRSV. No entanto, indubitavelmente o diagnóstico laboratorial das infecções pelo BRSV ainda permanece um desafio.

Amostras para detecção de vírus/antígeno podem ser obtidas a partir do tecido pulmonar do animal infectado em uma coleta *post mortem*, ou, alternativamente, pelo uso de lavados pulmonares e traqueais e/ou suabes nasais que podem ser realizados no animal vivo. Deve-se atentar, entretanto, que em estágios avançados da infecção ativa pelo BRSV, grandes quantidades de vírus podem estar presente nos pulmões mesmo que nenhuma partícula seja detectada na cavidade nasal (Pirie et al., 1981; Larsen et al., 1999). Visto que o pico de excreção viral normalmente ocorre 2 a 3 dias antes do início dos sintomas como revelado em infecções experimentais (Belknap et al., 1995), amostras mais apropriadas devem ser coletadas de animais exibindo sinais clínicos leves ou animais que estejam somente próximos aos gravemente afetados (Larsen, 2000).

O método clássico para diagnosticar infecções causadas pelo BRSV é o isolamento do vírus em cultivo de células. Este método, no entanto, é demorado, laborioso e até ineficiente quando não empregado imediatamente após a coleta das amostras. Numerosas técnicas imunoenzimáticas do tipo ELISA têm sido desenvolvidas como alternativa para a detecção laboratorial do BRSV (Lokensgard et al., 1992; Grubbs et al., 2001). A confiabilidade e exatidão de cada uma destas técnicas dependem dos reagentes e sensibilidade e especificidade do anticorpo anti-BRSV aplicados. Técnicas alternativas como imunofluorescência e imunohistoquímica também vêm sendo amplamente aplicadas com bom desempenho na detecção do BRSV em amostras clínicas (Kimman et al., 1986; Haines et al., 1989; Johnston & Siegel, 1990; Masson et al., 1993; Schrijver et al., 1996a; Brodersen & Kelling, 1998; Alkan et al., 2000; Schreiber et al., 2000; Sorden et al., 2000; Flores et al., 2000; Peixoto et al., 2000). A

aplicação de técnicas de detecção do ácido nucléico viral como PCR e hibridização normalmente fornece resultados mais sensíveis além de não exigirem vírus infeccioso e não serem afetadas pela presença de anticorpos (Belak & Pordany, 1993; Larsen et al., 1999). Tais técnicas vêm sendo amplamente desenvolvidas e aplicadas no diagnóstico do BRSV (Paton et al., 1992; Oberst et al., 1993; Vilcek et al., 1994; Tantivanich et al., 1995; Freymuth et al., 1995; Viuff et al., 1996; Henkel et al., 1997; West et al., 1998; Valarcher et al., 1999; Masot et al., 2000).

O diagnóstico de infecções pelo BRSV pode igualmente ser obtido de forma indireta através da detecção de anticorpos específicos contra o vírus no soro de fase aguda ou coalescente. Uma variedade de técnicas para este fim tem sido usada como soroneutralização, ELISA, fixação de complemento, imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (Potgieter & Aldridge, 1977; Martin, 1983; Gillette, 1983; Westenbrink et al., 1985; Baker et al., 1985; Florent & Marneffe, 1986; Ellis et al., 1992; Costa et al., 2000). Embora a presença de anticorpos maternos muitas vezes inviabilize o diagnóstico de infecções pelo BRSV em animais com menos de 3 meses de idade usando estas técnicas sorológicas convencionais, estas têm se mostrado úteis para o diagnóstico da infecção em animais mais velhos (Kimman et al., 1988; Uttenthal et al., 1996; Westenbrink & Kimman, 1987). Como em todos os testes sorológicos aplicados na identificação de um surto ocorrente, amostras pareadas de soro, coletadas respeitando um intervalo de 2 a 3 semanas, são recomendadas. A desvantagem do atraso na obtenção do diagnóstico inerente à coleta de amostras pareadas pode ser eliminada pela utilização de um ELISA isotipo-específico. Anticorpos transferidos maternalmente são restritos ao isotipo IgG1 conseqüentemente a presença de outros isotipos no soro de animais jovens pode ser indicativa de uma infecção ativa pelo BRSV (Kimman et al., 1987;

Westenbrink & Kimman, 1987; Kimman et al. 1988; Kimman & Westenbrink, 1990; Uttenthal et al., 2000).

Para que um diagnóstico adequado de infecções pelo BRSV seja obtido, é importante avaliar resultados oriundos de diferentes testes diagnósticos tendo como base o histórico da doença no rebanho estudado, idade dos animais, tratamentos anteriores, entre outros (Larsen, 2000).

3.13. Modelos experimentais

Embora a discussão sobre a utilização de modelos experimentais para o estudo dos RSVs seja bastante contraditória, alguns estudos demonstram que uma ampla variedade de espécies animais, incluindo sagüi e outros primatas não humanos, furão, marta, chinchila, cobaio, rato *cotton* e camundongo podem ser infectados experimentalmente ao inocular-se HRSV diretamente no trato respiratório (Prince et al., 1983; Taylor et al., 1984; Cannon, 1987; Bastien et al., 1997; Bastien et al., 1999; Murphy et al., 1990; Cook et al., 1998; Bourgeois et al., 1998; Kumar et al., 2000). Entretanto, na maioria dos casos a replicação viral ocorre somente de forma semipermissiva e a doença não se manifesta (Collins, et al., 1996). Análises realizadas por Murphy et al., (1990) utilizando a técnica de hibridização *in situ* em tecidos pulmonares de ratos *cotton* infectados pelo HRSV mostraram que somente uma fração pequena de células apareceu produtivamente infectada. Johnson et al. (1982b) obtiveram, após infecção experimental de ratos *cotton* pelo HRSV, excreção viral por um período prolongado de 7 semanas mas somente sob efeito de doses maciças de uma droga imunossupressora, capazes de reduzir em mais de 65% a contagem normal de leucócitos. Os animais que não sofreram efeito imunossupressor eliminaram o vírus somente durante uma semana. Alguns estudos utilizando camundongos balb/c infectados pelo HRSV não demonstraram sinais clínicos da doença (Taylor et al., 1984; Anderson et al., 1990). Utilizando este mesmo modelo

experimental, Cook et al. (1998) encontraram somente poucas células do epitélio alveolar e bronquiolar positivas por hibridização *in situ*, levando estes autores a sugerir que o uso de camundongos como um modelo experimental para infecções pelo HRSV é limitado, provavelmente pela infecção restrita. Em contrapartida, de acordo com Kumar et al. (2000) camundongos balb/c representam um bom modelo experimental para o estudo de infecções pelo HRSV, nos quais a duração da infecção e a patologia pulmonar assemelham-se às aquelas em humanos.

Os problemas relacionados à utilização de modelos experimentais para isolados bovinos do vírus sincicial respiratório são ainda mais marcantes. Tentativas de recuperar o BRSV a partir de camundongos experimentalmente infectados, igualmente não têm resultado em grande sucesso (Taylor et al., 1984; Stott & Taylor, 1985). Matumoto et al. (1974) foi capaz de propagar um isolado de BRSV no cérebro de camundongos de um dia de idade mas não obteve o mesmo resultado em camundongos adultos. Além de camundongos, cobaios ainda foram avaliados quanto ao seu potencial para estudos experimentais do BRSV. Matumoto et al. (1974) estudaram porcos da Índia inoculados com BRSV e não encontraram nenhuma alteração clínica nos animais, embora baixos títulos de anticorpos neutralizantes tenham sido detectados.

3.14. Imunoprofilaxia

Existe uma grande carência em relação a vacinas protetoras contra o HRSV e o BRSV. Vacinas apropriadas devem ser hábeis para conferir proteção mesmo na presença de anticorpos maternos, devem proteger contra todos os subtipos e eliminar os efeitos de exacerbação da doença (Larsen, 2000). Alguns estudos relacionados com triagens de vacinas vivas ou atenuadas contra o BRSV demonstraram diferentes níveis de proteção (Mohanty et al., 1981; Verhoeff & van Nieuwstadt, 1984; Howard et al., 1987; Taylor et al., 1989; Kubota

et al., 1992; Ellis et al., 1992; Fulton et al., 1995; Gershwin et al., 1998). No entanto, outros relatos informam a possibilidade de algumas vacinas desencadearem exacerbação da doença em bovinos (Kimman et al., 1989; Gershwin et al., 1998; West et al., 1999). Além disso, a administração de vacinas em animais que ainda possuem anticorpos maternos pode levar a uma proteção menos efetiva (Kimman et al., 1989; Gershwin et al., 1998). Além das vacinas convencionais, aquelas produzidas com subunidades protéicas do vírus ou com peptídeos sintéticos podem induzir proteção (Nelson et al., 1992; Bastien et al., 1997). As vacinas baseadas em DNA, embora ainda em caráter experimental, representam uma possibilidade futura para a difícil obtenção de respostas imunes protetoras e de longa duração contra infecções causadas pelo BRSV (Schrijver et al., 1997).

4. OBJETIVOS

2.1. Artigo 1

- Estabelecer camundongos da linhagem endocruzada Balb/c como modelo experimental de infecções pelo BRSV.

2.2. Artigo 2

- Padronizar a técnica de IHQ para a detecção do BRSV em cultivo de células infectadas e tecidos de camundongos e bovinos infectados experimentalmente;
- Verificar o desempenho da técnica padronizada em tecidos pulmonares e traqueais de bovinos provenientes de animais suspeitos de infecção pelo BRSV.

2.3. Artigo 3

- Padronizar a técnica de RT-nested-PCR para a detecção do BRSV em cultivo de células infectadas e tecidos de bovinos infectados experimentalmente;
- Realizar uma infecção experimental pelo BRSV em bovinos utilizando um isolado brasileiro e detectá-lo, posteriormente, a partir dos animais infectados.

2.4. Artigo 4

- Realizar uma caracterização molecular parcial de um novo isolado brasileiro de BRSV detectado neste estudo;
- Classificar este novo isolado em relação aos diferentes subgrupos do BRSV.

Artigo 1

Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in experimentally infected balb/c mice

R. S. Almeida, H. G. Domingues, L. T. Coswig, R. C. F. D'Arce,

R. F. Carvalho, C. W. Arns

aceito para publicação na revista

Veterinary Research. 35: 1-9, 2004 (in press)

Original article

Detection of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected balb/c mice

Renata Servan ALMEIDA, Helena Gallicchio DOMINGUES,
Lia Treptow COSWIG, Regina Celia Freitas D'ARCE,
Rodrigo Franco de CARVALHO, Clarice Weis ARNS*

Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 13081-970 Campinas, SP, Brazil

(Received 4 March 2003; accepted 18 September 2003)

Abstract – The present study used an RT-nested-PCR and an immunohistochemistry assay to detect bovine respiratory syncytial virus in tissues from experimentally infected balb/c mice. As a first step, Chicken Embryo Related (CER) cell monolayers infected with the BRSV-25-BR strain isolated in Brazil were used for antigen production. Then, the infected lung and tracheal tissues of female balb/c mice were collected on 3, 5, 7 and 10 days post-infection and submitted to both techniques. Primers specific to F and G genes that amplify fragments of 481 bp and 371 bp, respectively, were used. The BRSV detection was not successful in all of the animals tested. The genomic fragment of the G gene from the organs of some infected mice on all analyzed post-infection days was amplified. However, in the RT-nested-PCR corresponding to the F gene, it was not possible to observe any amplified fragment. This was probably due to the higher sensitivity of the developed technique to amplify the fragment corresponding to the G gene compared to the F gene. Moreover, only three of the lungs collected five days post-infection were positive by immunohistochemistry. To the author's knowledge, this is the first study reporting bovine respiratory syncytial virus detection in balb/c mice after experimental inoculation.

bovine respiratory syncytial virus / RT-nested-PCR / immunohistochemistry / mice / experimental infection

1. INTRODUCTION

The bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is an agent that belongs to the Paramyxoviridae family, the Pneumovirus genus, being one of the pathogens of higher importance in respiratory diseases [23], and responsible for significant economic losses in commercial cattle production [7]. Specific antibodies for the BRSV are more frequently detected in animals up to six

months of age [18]. In individuals of two weeks to three months of age, the clinical manifestation of the illness is inversely related to the level of maternal specific serum antibodies conferred to these animals [16]. These maternal antibodies also interfere with the serological diagnosis and with the response to vaccination.

Laboratory diagnosis of BRSV is generally based on criteria such as virus isolation, BRSV antigen detection in the suspected

* Corresponding author: arns@obelix.unicamp.br

tissues, serologic methods or histopathological examination. There are however, frequent difficulties related to this due to its limited growth in cell cultures or in the majority of experimental animals, and to the lability of the virus. Hence, the isolation of the virus in cell cultures is a procedure less indicated for the diagnosis of BRSV infections, even in clinical samples containing high virus concentration.

Currently, the diagnosis of BRSV infections is more commonly performed through the detection of specific antibodies by sero-diagnostic methods such as the serum neutralization test, complement fixation test, indirect immunofluorescence test and ELISA [29, 30]. Although the serum neutralization test is the standard gold test for the detection of specific antibodies against BRSV, difficulties arise regarding the time needed to obtain the results, which takes an average of 5 to 7 days [12]. Furthermore, there are reports of asymptomatic infections by the Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV), which are serologically undetectable [10]. In analogy to the HRSV, since BRSV and HRSV are antigenetically related of the up to 80% in proteins N, M, M2 and F [31], is possible to speculate that part of the infections by BRSV cannot be diagnosed through the detection of specific serum antibodies. This probably occurs due to the simple fact that these animals do not develop antibodies in levels high enough to be detected by conventional techniques. In addition, there is evidence indicating the existence of latent infections, since the virus has been isolated from asymptomatic animals, as well as from animals infected seven months before the appearance of the symptoms [1].

There is an urgent need, therefore, for a quick, sensitive and specific method for the diagnosis of infections by the BRSV virus. Several authors have been working on the development of techniques to simplify and to increase the sensitivity of BRSV infection diagnosis. The reverse transcription-PCR assay has shown high speed, sensitiv-

ity and specificity in great parts of these works [20–22, 27, 28], providing a valuable tool for diagnostic and epidemiological purposes.

Experimental animals represent a useful alternative for experiments with viruses and other microorganisms, mainly when it is not possible to work with their natural host. Collins et al. [10] have pointed out that a wide range of animals, including marmosets, nonhuman primates, ferrets, mink, chinchillas, guinea pigs, cotton rats and mice, could be experimentally infected when RSV is inoculated directly into the respiratory tract. Small experimental animals have been used as models of lower respiratory tract infection with RSV [5, 8, 9, 15, 17, 19, 24, 25]. The present study detected BRSV in experimentally infected balb/c mice by RT-nested-PCR and immunohistochemistry.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Virus

The Brazilian BRSV-25-BR strain, isolated in the Laboratorio de Virologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) [2], was used in the present study. This strain was isolated from samples of nasotracheal secretions collected from live animals from the Southern and Southeastern Brazilian States, inoculated successively in MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) and CER (Chicken Embryo Related) cells.

2.2. Cells

The cell cultures used were from the continuous cell line of CER. The cells were cultivated in bottles of 75 cm², with 1.5×10^5 cells/mL (initial concentration) in minimal essential Eagle medium (MEME) supplemented with 10% BRSV-free fetal calf serum (FCS) and kept at 37 °C.

2.3. Antigen production

For the production of the viral antigen used in the mice infection and submitted to the extraction of the viral RNA for RT-nested-PCR, cellular monolayers, were inoculated with $10^{4.3}$ DICC₅₀/mL of the BRSV-25-BR strain. The bottles were incubated at 37 °C and the cells were observed daily under an inverted light microscope (Axiovert 100, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) in order to detect a cytopathic effect (CPE). Then, the infected cells were submitted to RNA extraction or scraped and the supernatant was clarified through centrifugation, aliquoted and stored at -70 °C until use in the mice infection.

2.4. Animal infection

During the experiment, all mice were kept in the laboratory animal house of the Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. The infected animals were installed separately from negative control animals.

Four-week-old specific-pathogen-free (SPF) female balb/c mice, purchased from the Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica of UNICAMP (CEMIB-UNICAMP), kept behind barriers, were used in this study. The animals were distributed into two groups, one containing 16 animals and the other, a negative control, containing 8 animals. All animals of the first group were intranasally inoculated with 100 µL of the viral antigen with an infectious dose of $10^{4.3}$ DICC₅₀/mL, using a micropipette. The negative control animals received an amount of supernatant CER cells free of virus. The animals were observed daily for clinical signs. The samples of lung and tracheal tissues of the infected (4 animals) and control group (2 animals), collected 3, 5, 7 and 10 days post-infection (dpi), were submitted to immunohistochemistry and RT-nested-PCR assays. These inoculations were performed in three repetitions, in different periods of time, resulting in a total of 48 virus-infected and 24 mock-infected animals.

2.5. Histopathology

Tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA), embedded in paraffin wax, cut in 4 µm thick sections, and mounted on microscope slides. For a routine histological examination, the sections were stained with haematoxylin and eosin (HE). The same protocol was used for section preparation for the immunohistochemistry assay.

2.6. Immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemistry was carried out at the Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark. Briefly, the sections were de-paraffinated by heating up to 70 °C for 10–15 min and baths of xylene and ethanol. After a pre-treatment with 0.018% protease for 5 min at room temperature, the sections were blocked with 5% normal pig serum and incubated overnight at 4 °C with a polyclonal bovine-serum against BRSV in a 1:600 dilution (primary antibody). After this, the sections were incubated with 0.9% streptavidin (DAKO, Glostrup, Denmark) and following with 0.9% biotinylated alkaline phosphatase for 30 min at 37 °C (DAKO). Fast red (KemEnTec, Copenhagen, Denmark) was used for 10–15 min to visualize the positive reactions. The sections were counter-stained with Harris haematoxylin and mounted in Glycergel (DAKO) for light microscopy.

2.7. RNA extraction

The RNA extraction from approximately 100 mg of tissue samples was carried out using phenol guanidine isothiocyanate (TRIzol, Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) and chloroform. The precipitation of the total RNA was performed with 100% ethanol followed by centrifugation. The pellet was washed with 70% ethanol and diluted in 25 µL of water containing 0.1% of diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA).

Positive controls have been processed using the virus multiplied in CER cell cultures. The RNA extracted from non-infected mice tissue was used as the negative control.

2.8. RT-nested-PCR

The technique was standardized to amplify a fragment of 481 bp corresponding to a part of the F gene and 371 bp corresponding to a part of the G gene of the BRSV, using outer and inner primers described by Vilcek et al. [28].

The different RT-nested-PCR steps, from RNA extraction until the second amplification round, have been processed in different rooms to avoid contamination problems.

2.8.1. cDNA synthesis

For the synthesis of the cDNA, the commercial kit, SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen™, California, USA) was used according to the manufacturers' recommendations and primers B2A (F gene) or B6A (G gene) designed by Vilcek et al. [28].

2.8.2. PCR reactions

For a final volume of 50 µL, the following reagents were added in a PCR tube: 5 µL 10× amplification buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]; 2 µL dNTP 10 mM; 1 µL primer B1 (F gene; 10 pmoles) or B5A (G gene; 10 pmoles); 1 µL primer B2A (F) or B6A (G); 0.6 µL of the enzyme Platinum™ Pfx DNA Polymerase 2.5 U/µL (Invitrogen™, California, USA); 1 µL of MgSO₄ (50 mM); 2 µL cDNA and sterilized distilled water with DEPC until reaching the final volume. The mixture was heated for 2 min at 94 °C for the initial denaturation. The amplification was carried out in a thermal cycler PCR System 9700 (Gene Amp, Applied Biosystems, Perkin-Elmer, California, USA). The cycling program consisted of denaturation

at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 1 min. Twenty-five cycles of amplification were carried out. The second PCR was done using 2 µL of the first PCR product, substituting the primers for B3 and B4A (F gene) or B7A and B8 (G gene). After initial denaturation at 94 °C for 2 min, the thermal cycle consisted of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 62 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 1 min. Thirty-five cycles of amplification were carried out. The last cycle of elongation was prolonged for 7 min in both PCR reactions.

RT-nested-PCR reactions were submitted to electrophoresis in 0.7% agarose gel containing 0.5 mg of ethidium bromide/mL, run at 110 V for 60 min. The molecular sizes of the products were compared with those of a 50 bp ladder (Invitrogen™, California, USA). The ethidium bromide-stained bands were visualized by UV light and recorded with the equipment Image Master VDS (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

2.9. RT-nested-PCR sensitivity analysis

The cDNA synthesized from viral RNA extracted from infected CER cells, both for the F gene and G gene, was quantified by spectrophotometry, submitted to serial dilutions (10^{-1} to 10^{-3}) and amplified by RT-nested-PCR.

3. RESULTS

3.1. Animal infections

The balb/c infected mice did not present apparent clinical signs during this experiment. However, macroscopic lesions were observed in the pulmonary tissue of one of the infected and sacrificed animals with 10 dpi, characterized for intense hemorrhage. Histopathological analysis demonstrated infiltration of mononuclear cells in

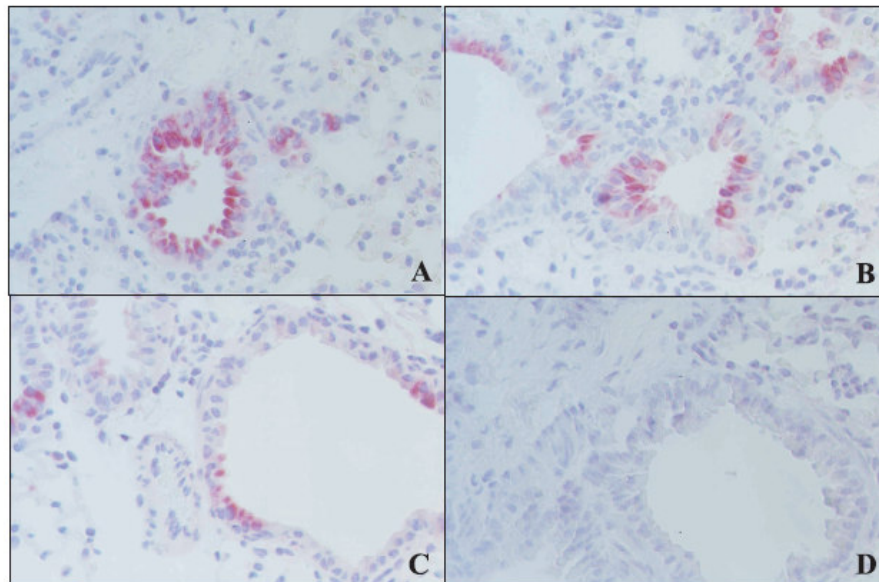


Figure 1. A, B and C: Immunohistochemistry of 3 infected mice lungs sacrificed 5 days post-infection. The red coloration represents the infected cells (see www.edpsciences.org/vetres for a colour version of this figure). **D:** negative control (magnified 20×).

the lungs with intense thickening of alveolar walls and mucosal oedema, periarterial oedema, mononuclear infiltrate in lamina propria, multifocal proliferative tracheitis and hyperplasia of the mucus glands in the tracheae (data not shown).

3.2. Immunohistochemistry

A positive result was detected only in three lung samples extracted from mice five days post-infection. The positive reaction was present in bronchial epithelial cells (Fig. 1).

3.3. RT-nested-PCR

Positive results were obtained with the amplifications of the fragment corresponding to a part of the G gene, from RNA extracted from 2 lungs and 2 tracheae collected on 3 dpi; 2 lungs and 1 trachea collected on 5 dpi; 1 lung and 1 trachea collected on 7 dpi and 2 lungs and 2 tracheae collected on 10 dpi. In the RT-nested-PCR

corresponding to the F gene, however, it was not possible to observe any amplified fragment (Tab. I and Fig. 2).

3.4. Nested-PCR sensitivity analysis

The technique amplified the fragment corresponding to the G gene of the material diluted up to 10^{-2} (containing 1225 µg/mL of cDNA), while the fragment corresponding to the F protein could only be amplified from pure material (1 197.5 µg/mL; Fig. 3).

4. DISCUSSION

Several small experimental animals have been used as models of infections with RSV. In this study, balb/c mice were elected to be infected with the BRSV-25-BR strain due to the impossibility of maintaining large experimental animals – such as calves – in our institution. Several authors have used this lineage mice during experiments carried out with HRSV [4, 11, 17, 24, 25]

Table I. The results of RT-nested-PCR of BRSV F and G genes from the tracheae and lungs of experimentally infected balb/c mice.

Days post-inoculation (dpi)	No. F gene amplified/ total animals		No. G gene amplified/ total animals		Positive total
	Trachea	Lung	Trachea	Lung	
3 days	0/12	0/12	2/12	2/12	4
5 days	0/12	0/12	1/12	2/12	3
7 days	0/12	0/12	1/12	1/12	2
10 days	0/12	0/12	2/12	2/12	4
Positive total	0	0	6	7	13

and BRSV [4]. According to Kumar et al. [17], balb/c mice provide a good model for the study of infection by HRSV, in which the infection duration and the pulmonary pathology resembles those in human beings. Viral replication was detected in balb/c mice experimentally infected with RSVs through tests of immunofluorescence [24], in situ hybridization [11] and ELISA [4, 17]. Bastien et al. [3, 4] obtained virus titres in balb/c mice challenged with HRSV and BRSV during experiments with synthetic peptides to confer protection against these viruses. Notwithstanding, some authors mentioned the great difficulty to get BRSV detection after the infection of mice. They comment that some reasons for this phenomenon may exist, since many strains do not grow well in mice and this would seriously reduce the possibility of viral nucleic acid detection. However, intranasal inoculation of balb/c mice with live BRSV induces similar levels of serum antibodies as those detected in mice infected with HRSV (G. Taylor, Institute for Animal Health, Compton, UK, personal communication) and BRSV could undergo an abortive infection in the lungs of mice (A. Easton, University of Warwick, Coventry, UK, personal communication). Taylor et al. [24] have also concluded that the growth of the HRSV strain in different cell lines affects its infectivity for mice.

In the present study, no clinical signs were observed in the animals, in agreement with the findings of some authors [4, 11, 17,

24]. However, it was possible to detect BRSV in mice tissue by RT-nested-PCR and immunohistochemistry which, to the author's knowledge, was the first time that this virus was detected in balb/c mice. The F gene was chosen as the target for the RT-nested-PCR because it is one of the most conservative RSV genes and, consequently, represents a good alternative to be used for virus detection in calves with unknown history about this virus. The G gene, however, is described as the more variable portion of the RSV genome, and can be used in the future in Brazilian field sample characterization. Therefore, these genes are good choices to study the BRSV in our country. The RT-nested-PCR was able to amplify a fragment corresponding to a part of the G gene from the RNA extracted from the lungs and tracheae collected 3, 5, 7 and 10 dpi but only from one or two infected mice each day. However, in the amplifications corresponding to the F gene, it was not possible to observe any amplified fragment. The RT-nested-PCR sensitivity, up to one hundred times superior in the amplification of the G gene fragment as compared to the F gene fragment, may explain the amplification of only the first one of the infected mice tissues. Probably, the viral RNA extracted from this material was enough only to allow the amplification of the G gene and not the F gene. Although there are no reports of similar results in the literature, this phenomenon may have occurred due to inherent conditions of the primers. Even so,

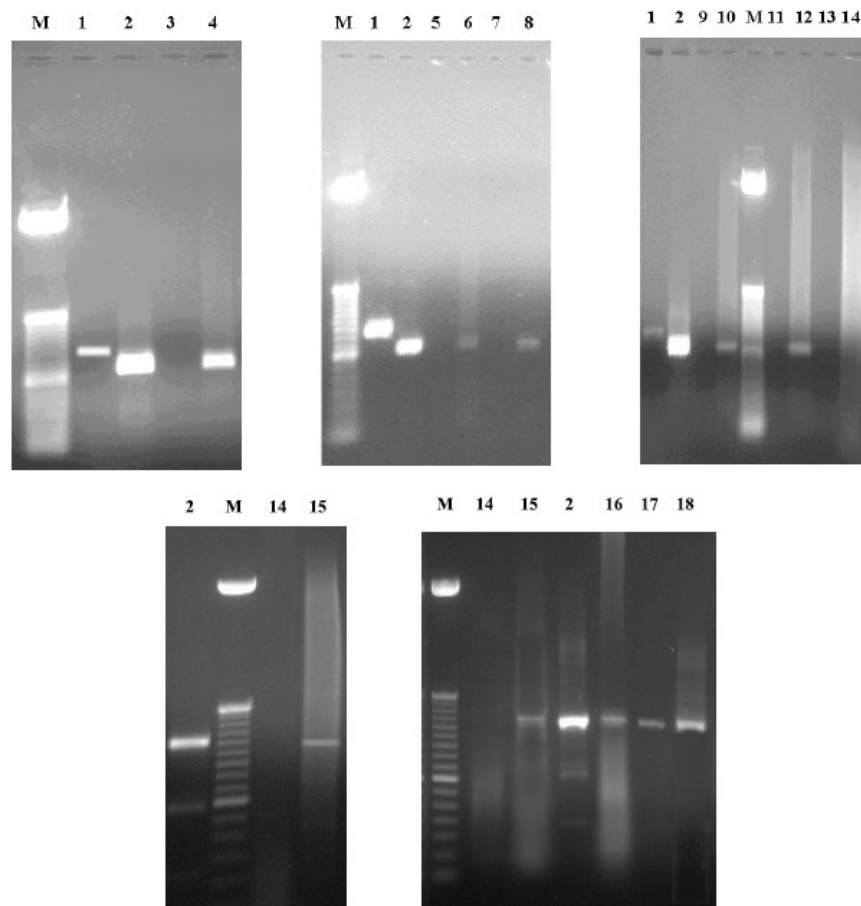


Figure 2. RT-nested-PCR for the detection of a part of the G genes. M: Molecular weight marker. 1: positive control of the F gene (fragment of 481 bp). 2: positive control of the G gene (fragment of 371 pb). 3, 5, 7, 9: F gene from the lungs of infected mice on 3, 5, 7 and 10 dpi, respectively. 4, 6, 8, 10: G gene from the lungs of infected mice on 3, 5, 7 and 10 dpi, respectively. 11: F gene from the tracheae of infected mice on 10 dpi. 12, 18: G gene from the tracheae of infected mice on 10 dpi. 15, 16, 17: G gene from the tracheae of infected mice on 3, 5, and 7 dpi. 13, 14: negative controls.

more studies to analyze this must be performed. Furthermore, only lungs five days post-infection were positive by immunohistochemistry. This can be explained by the higher sensitivity normally shown in PCR reactions when compared to immunohistochemistry, as observed by other authors in the detection of several infectious agents, including viruses [6, 13, 14, 26]. By immunohistochemistry the presence of the BRSV antigen in bronchial epithelial cells, as

detected by Prince et al. [22] in cotton rats infected with HRSV, was verified. Differently, Taylor et al. [25] found positive immunohistochemistry reactions in the small scattered foci in cells of alveolar walls using a reference strain of HRSV for inoculation in balb/c mice. In this study, nevertheless, we also had considerable difficulty in recovering BRSV from balb/c tissues, and it was necessary to use a great number of animals to obtain the results shown here.

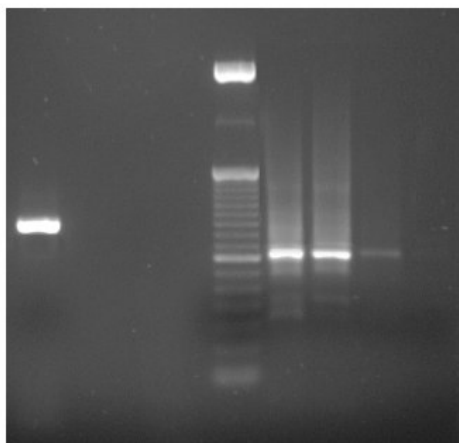


Figure 3. Analysis of the sensitivity of RT-nested-PCR. 1: pure cDNA of the F gene (1225 µg/mL). 2: cDNA 1:10 dilution of the F gene. 3: cDNA 1:100 dilution of the F gene. 4: cDNA 1:1000 dilution of the F gene. M: molecular weight marker. 5: pure cDNA of the G gene (1197.5 µg/mL). 6: cDNA 1:10 dilution of the G gene. 7: cDNA 1:100 dilution of the G gene. 8: cDNA 1:1000 dilution of the G gene.

Although the present study permitted the detection of BRSV in experimentally infected balb/c mice, this procedure showed difficulties. The results here obtained demonstrate that the use of balb/c mice without any artifact can be laborious and often unsuccessful. The use of immunodepressed mice could probably represent a good alternative in order to obtain better results with experimental models to BRSV. Moreover, in our study, only one cell line type and virus strain were tested. It is important to emphasize that studies using more cell lines and other virus strains to complement our unedited data, should be carried to analyze the real application condition of this particular experimental animal.

ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the financial support of FAPESP throughout the research. We also thank Dr. Birgitte Viuff from the Royal Veterinary and

Agricultural University and Dr. Lars Erik Larsen from the Danish Veterinary Institute, Copenhagen, Denmark, for the opportunity to perform the immunohistochemistry assays, and the technical assistance of Joyce Camargo and Geneci Davi.

REFERENCES

- [1] Ames T.R., The epidemiology of BRSV infection, *Vet. Med. Sci.* 88 (1993) 881–885.
- [2] Ams C.S., Campalans J., Costa S.C.B., Domingues H.G., D'Arce R.C.F., Almeida R.S., Characterization of bovine respiratory virus isolated in Brazil, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36 (2003) 213–218.
- [3] Bastien N., Taylor G., Thomas L.H., Wyld S.G., Simard C., Trudel M., Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host, *Vaccine* 15 (1997) 1385–1390.
- [4] Bastien N., Trudel M., Simard C., Complete protection of mice from respiratory syncytial virus infection following mucosal delivery of synthetic peptide vaccine, *Vaccine* 17 (1999) 832–836.
- [5] Bourgeois C., Bour J.B., Aho L.S., Pothier P., Prophylactic administration of a complementarity-determining region derived from a neutralizing monoclonal antibody is effective against respiratory syncytial virus infection in balb/c mice, *J. Virol.* 72 (1998) 807–810.
- [6] Brainard J.A., Greenon J.K., Vesey C.J., Tesi R.J., Papp A.C., Snyder P.J., Western L., Prior T.W., Detection of cytomegalovirus in liver transplant biopsies. A comparison of light microscopy, immunohistochemistry, duplex PCR and nested PCR, *Transplantation* 57 (1994) 1753–1757.
- [7] Bryson D.G., McConnel S., McAliskey M., McNulty M.S., Ultrastructural features of alveolar lesions in induced respiratory syncytial virus pneumonia of calves, *Vet. Pathol.* 28 (1991) 286–292.
- [8] Cannon M.J., Microplaque immunoperoxidase detection of infectious respiratory syncytial virus in the lungs of infected mice, *J. Virol. Methods* 16 (1987) 293–301.
- [9] Cannon M.J., Openshaw P.J., Askonas B.A., Cytotoxic cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus, *J. Exp. Med.* 168 (1988) 1163–1168.
- [10] Collins P.L., McIntosh K., Chanock R.M., Respiratory syncytial virus, in: Fields B.N. (Ed.), *Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, pp. 1313–1351.

- [11] Cook P.M., Eglin R.P., Easton A.J., Pathogenesis of pneumovirus infections in mice: detection of pneumonia virus of mice and human respiratory syncytial virus mRNA in lung of infected mice by in situ hybridization, *J. Gen. Virol.* 79 (1998) 2411–2417.
- [12] Dubovi E.J., Diagnosing BRSV infection: a laboratory perspective, *Vet. Med. Sci.* (1993) 888–893.
- [13] Gressens P., Langston C., Mitchell W.J., Martin J.R., Detection of viral DNA in neonatal herpes encephalitis autopsy tissue by solution-phase PCR: comparison with pathology and immunohistochemistry, *Brain Pathol.* 3 (1993) 237–250.
- [14] Held T.K., Kruger D., Switala A.R., Beyer J., Kingreen D., Busemann C., Janitschke K., Siegert W., Diagnosis of toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients: comparison of PCR-based results and immunohistochemistry, *Bone Marrow Transplant.* 25 (2000) 1257–1262.
- [15] Johnson R.A., Prince G.A., Siffin S.C., Horswood R.L., Chanock R.M., Respiratory syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats, *Infect. Immun.* (1982) 369–373.
- [16] 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 (1988) 104–109.
- [17] Kumar M., Behera A.K., Matsuse H., Lockey R.F., Mohapatra S.S., Intranasal IFN- γ gene transfer protect BALB/c mice against respiratory syncytial virus infection, *Vaccine* 18 (2000) 558–567.
- [18] Mohanty S.B., Ingling A.L., Lillie M.G., Experimentally induced respiratory syncytial viral infection in calves, *Am. J. Vet. Res.* 36 (1975) 417–419.
- [19] Murphy B.R., Prince G.A., Lawrence L.A., Croen K.D., Collins P.L., Detection of respiratory syncytial virus (RSV) infected cells by in situ hybridization in the lungs of cotton rats immunized with formalin-inactivated virus or purified RSV F and G glycoprotein subunit vaccine and challenged with RSV, *Virus Res.* 16 (1991) 153–162.
- [20] Oberst R.D., Hays M.P., Hennessy K.J., Stine L.C., Evermann J.F., Kelling C.L., Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization, *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 1237–1240.
- [21] Paton A.W., Paton J.C., Lawrence J., Goldwater P.N., Harris R.J., Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirate by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification, *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 901–904.
- [22] Prince G.A., Jenson A.B., Horswood R.L., Camargo E., Chanock R.M., The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats, *Am. J. Pathol.* 43 (1984) 649–655.
- [23] Samal S., Zamora M., Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.* 72 (1991) 1715–1720.
- [24] Taylor G., Stott E.J., Hughes M., Collins A.P., Respiratory syncytial virus in mice, *Infect. Immun.* 43 (1984) 649–655.
- [25] Taylor G., Stott E.J., Bew M., Fernie B.F., Cote P.J., Collins A.P., Hughes M., Jebbett J., Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus in mice, *Immunology* 52 (1984) 137–142.
- [26] Tegtmeier C., Angen O., Ahrens P., Comparison of bacterial cultivation, PCR, in situ hybridization and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle, *Vet. Microbiol.* 76 (2000) 385–394.
- [27] Valarcher J., Bourhy H., Gelfi J., Schelcher F., Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based of the nucleoprotein gene of diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infection, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 1858–1862.
- [28] Vilcek S., Elvander M., Ballagi-Pordany A., Belak S., Development nested PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 2225–2231.
- [29] Westenbrink F., Brinkhof J.M.A., Straver P.J., Quak J., De Leeuw P.W., Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralization tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infection, *Res. Vet. Sci.* 38 (1985) 334–340.
- [30] Westenbrink F., Kimman T.G., Immunoglobulin M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections, *Am. J. Vet. Res.* 48 (1987) 1132–1137.
- [31] Zamora M., Samal S.K., Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that on human respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.* 73 (1992) 737–741.

Artigo 2

Bovine respiratory syncytial virus: detection by immunohistochemistry in mouse and bovine tissues

R.S. Almeida, F.R. Spilki, P.M. Roehe, L. M. C. Verinaud, C. W. Arns

enviado para publicação para a revista

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS: DETECTION BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN MOUSE AND BOVINE TISSUES

R.S. Almeida¹, F.R. Spilki², P.M. Roche², L.M.C. Verinaud¹, C.W. Arns^{1,*}

¹ Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

² DM/ICBS- UFRGS & CPVDF-FEPAGRO, Estrada do Conde 6000, CEP 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brasil

* Corresponding author. Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNICAMP

Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, SP, Brasil

Tel: +55-19-37886267; fax: +55-19-37886276; e-mail: arns@obelix.unicamp.br

Running title: Immunohistochemistry to BRSV detection

Key words: Bovine respiratory syncytial virus/immunohistochemistry/calves/mice/
experimental infection/F and N proteins

Abstract

In this work, an IHC was developed to detect BRSV in cultured cells and in tissues of experimentally infected mice and calves. After, calves suffering of respiratory disease were screened using the test. IHC test demonstrated efficient in detecting BRSV antigens in mouse tracheas (3, 5 and 7 days post-infection) and lungs (5 and 7 days post-infection), but only in one of three lungs from experimentally infected calves. Lung samples from two naturally infected calves were positive for BRSV by IHC. These results suggest that IHC test may be used in the future to diagnose and assess the distribution of BRSV infections in Brazilian herds.

Introduction

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) which belongs to the Pneumovirus genus *Paramyxoviridae* family, is one of the most important pathogens of respiratory tract disease in nursing beef cattle, feedlot and dairy calves (Baker et al., 1986a; Baker et al., 1986b; Baker et al., 1986c). This virus is widely distributed in most countries with intensive cattle production (Paton et al., 1998; Valarcher et al., 1999; Norström et al., 2000; Obando et al., 1999; Sorden et al., 2000; Uttenthal et al., 2000; Woldemeskel et al., 2000) including Brazil, with the first case in this country being diagnosed in 1995 in the nasotracheal secretions of calves from the southern and southeastern states of the country (Arns et al., 2003). Moreover, although serological tests for BRSV show ~95% positivity (Gonçalves et al., 1993), not much is known about the real distribution and participation of this virus in the loss of production in Brazilian herds. There are frequent difficulties in the laboratory diagnosis of infections by respiratory syncytial viruses (RSVs), due to limited growth of virus and in cell cultures or in most experimental animals, as well the high viral instability under environmental conditions. Currently, the diagnosis of BRSV infections is most commonly done by clinical and histopathological examinations and by the detection of virus-specific antibodies in serum using methods such as seroneutralization, complement fixation, indirect immunofluorescence and ELISA (Westenbrink et al., 1985; Westenbrink et al., 1987; Driemeier et al., 1997). However, difficulties with these approaches include the long time needed to obtain results (Dubovi, 1993), reports of asymptomatic infections that are serologically undetectable (Collins et al., 1996), evidence indicating the existence of latent infections (Ames, 1993), and a decrease in the efficiency of serological diagnosis.

The aim of this work was develop a test of BRSV detection to improve the diagnosis of this virus in Brazil. An immunohistochemistry (IHC) was standardised initially using chicken

embryo related (CER) cells infected with a Brazilian strain of the virus (BRSV-25-BR). Tissues from mice and calves experimentally infected with a Brazilian isolate of BRSV and lungs from calves suffering of respiratory disease were screened using IHC test. The test could be a promising assay for diagnosis and epidemiological analysis of BRSV in Brazil.

Material and Methods

Virus

The Brazilian strain BRSV-25-BR, isolated in the Laboratório de Virologia Animal at the Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brazil (LVA-IB-UNICAMP) (Arns et al., 2003), was used. This isolate was obtained from the nasotracheal secretions of a calf from a state in southern Brazil, by passages in MDBK (Madin Darby bovine kidney) and CER (chicken embryo related) cells.

Coverslip preparation

For the initial standardisation, cells from the continuous cell line CER were cultured in coverslips 13 mm in diameter (Thermanox[®]; Nunc, Inc., IL, USA). The monolayers were subsequently inoculated with the strain BRSV-25-BR ($10^{4.3}$ DICC₅₀/ml, multiplicity of infection 0,001-0,01) and the plates then incubated at 37°C until the initial cytopathic effect (ECP), detection (after 2 days), at which point the cells were fixed with 80% acetone for 30 min at 4°C. Negative controls were prepared with coverslips containing only CER cells.

Animal infection

Mice

Four-week-old specific-pathogen-free (SPF) female balb/c mice, purchased from the Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP), were used. The mice were distributed in two groups, one containing 16 animals and the other 8 animals (negative control). Water and food with good quality were provided to the animals *ad libitum*. All mice in the first group were intranasally inoculated with 100 µl of the virus at an infectious dose of $10^{4.3}$ DICC₅₀/ml. The negative controls received the same volume of supernatant from uninfected CER cells. The animals were observed daily for clinical signs. The animals were euthanised, using humanitarian procedures avoiding totally any surplus suffering. Lung and tracheal tissues were collected from the infected and control groups on the 3, 5, 7 and 10 days post-infection (dpi) (4 mice/day) and processed for immunohistochemistry (IHC). These inoculations were done triplicate, at different periods of time, resulting in a total of 48 virus-infected and 24 mock-infected mice.

Calves

Three five-month-old calves (nos. 139, 151 and 165) seronegative for BRSV were used. The calves were maintained in isolation in the Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CPVDF, El Dourado do Sul - RS Brazil). Water and food with good quality were provided to the animals *ad libitum*. All fundamental ethical principles were respected during animal manipulations. For infection, the calves were anaesthetised with 1% acepromazine (0.1 mg/kg) and intratracheally (i.t.) inoculated with 20 ml of the virus BRSV-25-BR strain ($10^{4.3}$ DICC₅₀/ml). Six days later, which correspond to the peak of virus shedding, the animals were

ethanised, using humanitarian procedures avoiding totally any surplus suffering, and the lung and tracheal tissues were collected and processed for IHC.

Field cases

Lungs from two calves with respiratory symptoms were received from the CPVDF. The calves were serologically negative for bovine herpesvirus type 1, bovine viral diarrhoea virus and bovine leukaemia virus, but their serological status for BRSV was unknown. The first calf (B1) was one year old and had anorexia, apathy, fever, copious sero-mucous nasal discharge, dyspnoea, tracheal estertors and pulmonary sibyls and pain in the ventral thoracic region. The second calf (B2) was seven months old, showed mild and recurrent respiratory symptoms. The lung from this animal showed no macroscopic injury.

Section preparation

Tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Co., MO, USA), embedded in paraffin wax, and sections 4 µm thick were cut and mounted on microscope slides.

Immunohistochemistry (IHC)

The coverslips were re-hydrated in PBS-T [8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, 50µl Tween 20, H₂O] or tissue sections were de-paraffinated in xylene and ethanol. After treatment with PBS-T containing 3% H₂O₂ for 15 min at room temperature, the sections were boiled in citrate buffer, pH 6.0, in a microwave, 3 X 3 min and then blocked with 3% normal goat serum and incubated overnight at 4° C with a solution of monoclonal antibodies

against HRSV F and N proteins (primary antibody, NCL-RSV3; Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK) at a dilution of 1:600 in PBS-T containing 1% normal goat serum. Biotinylated anti-mouse IgG antibody (Vector Laboratories, Inc., CA, USA) was subsequently added to the sections, which were then incubated for 1h at 37° C. The signal was amplified by incubation with an avidin-biotinylated peroxidase system (Vectastain® Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc.) for 1h at 37° C. The reaction was developed by adding diaminobenzidine (DAB substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories, Inc.) to detect the immunoreactive sites. The sections were counter-stained with Harris' haematoxylin and mounted in Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany) for examination by light microscopy.

Vector® M.O.M. solution (Vector Laboratories, Inc.) was used for all blocking steps, and the reagent dilutions for reactions in mouse tissue were done according to the manufacturer recommendations.

Results

IHC in cultured cells

IHC detected BRSV antigens in all BRSV-infected coverslips and showed no positive reaction in uninfected cells. Some of CER cells showed an atypical sign on nuclei (*figure 1*).

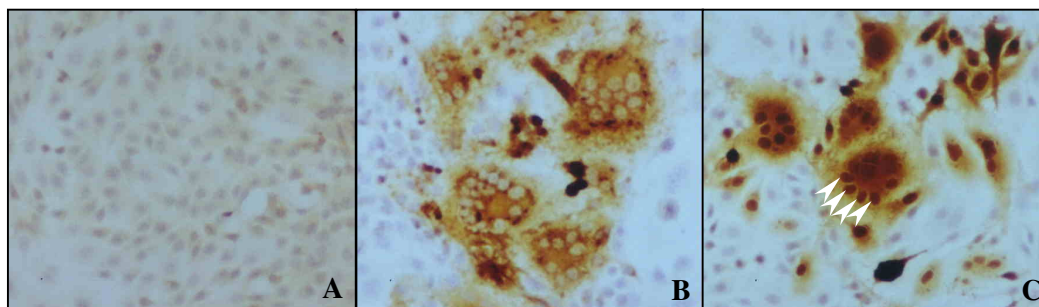


Figure 1. Immunohistochemical detection of BRSV antigens in BRSV infected CER cells **A:** negative control, **B:** positive reaction with syncytial formation, and **C:** positive reaction with atypical staining (arrows) (100X).

IHC of mouse tissues and histological changes

Infected Balb/c mice showed no clinical signs after virus inoculation. However, macroscopic lesions involving severe hemorrhage were observed in the lung sections of one infected mouse (euthanised at 10 dpi) (data not shown). Histopathological examination revealed on infiltration of mononuclear cells with marked thickening of the alveolar walls and mucosal edema, periarterial edema, a mononuclear infiltrate in the lamina propria, multifocal proliferative tracheitis, and hyperplasia of the tracheal mucus glands (data not shown). IHC gave a positive reaction in tracheal tissue from mice in 3, 5 and 7 dpi and in lung samples from mice euthanised 5 and 7 dpi (*figure 2*).

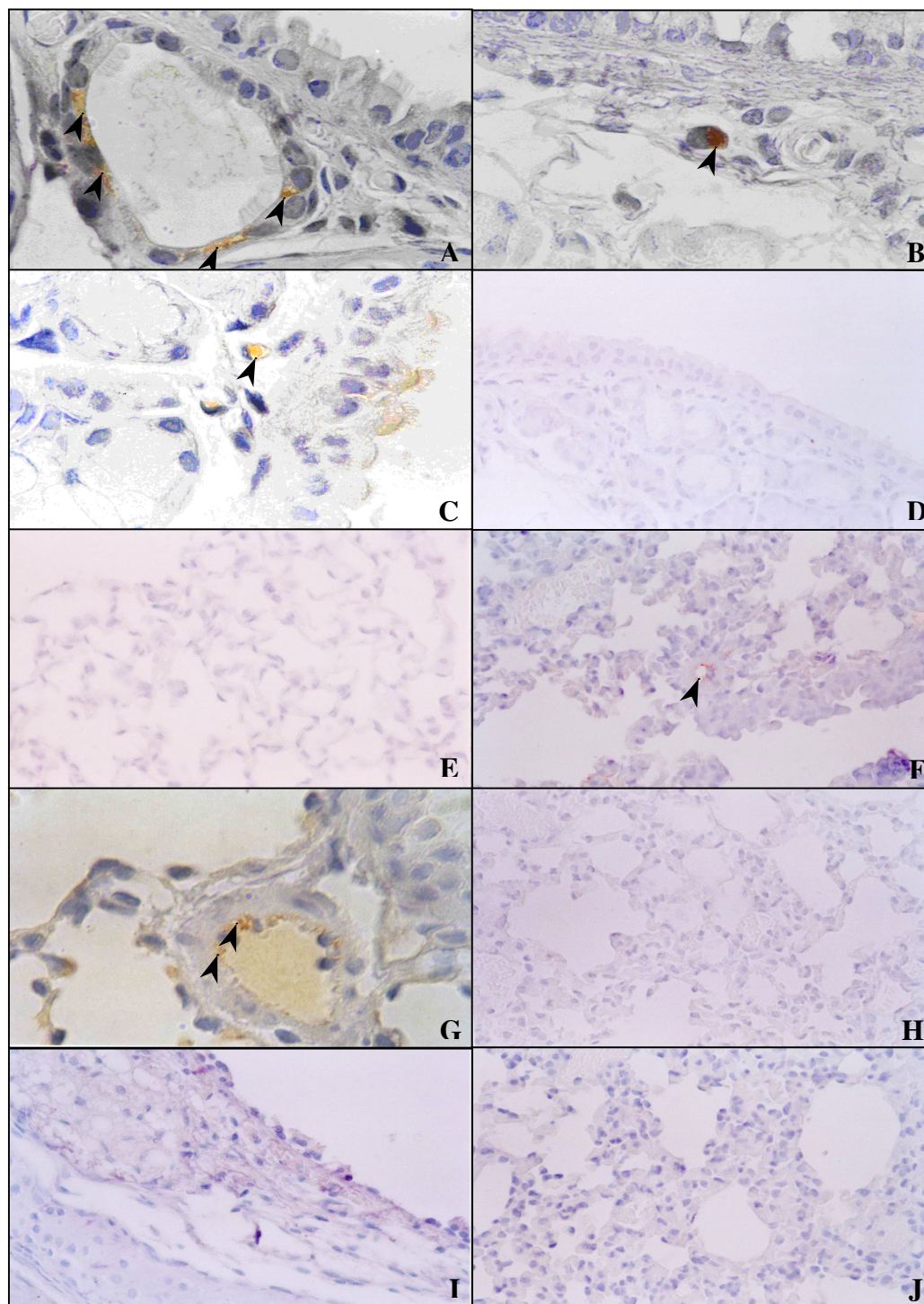


Figure 2: Immunohistochemical detection of BRSV antigens in mouse tissues. **A-D:** Tracheal tissue from infected mice 3 (**A**), 5 (**B**), 7 (**C**) and 10 (**D**) dpi. **E-H** lung from infected mice 3 (**E**), 5 (**F**), 7 (**G**) and 10 (**H**). **I:** negative control of trachea, **J:** negative control of lung (**A**, **B**, **C**, **E** and **G**: 100X; **D**, **F**, **H**, **I** and **J**: 40X).

Calf tissues

Three five-month-old calves (nos. 139, 151 and 165) seronegative for BRSV were anaesthetised with 1% acepromazine (0.1 mg/kg) and intratracheally inoculated with 20 ml of viral antigen containing $10^{4.3}$ DICC₅₀/ml of virus. Macroscopic lesions compatibles with BRSV-infection were seen in two calves (nos. 139 e 165). The lesions presents in the calf no. 139 were mild, characterised by interstitial pneumonia and emphysema. The calf no. 165 showed more severe interstitial multifocal pneumonia, severe interstitial and subpleural emphysema, and consolidated lung areas (Almeida RS, Spilki FR, Roehe PM and Arns CW, manuscript submitted).

BRSV antigens were detected in the lungs of only one of experimentally infected calf (no. 165). None of the tracheal samples was positive for BRSV antigens (*figure 3*). The lungs from two calves suspected to have BRSV were positive for BRSV antigens by IHC (*figure 4*). One of them (B1) was subsequently isolated (data not shown).

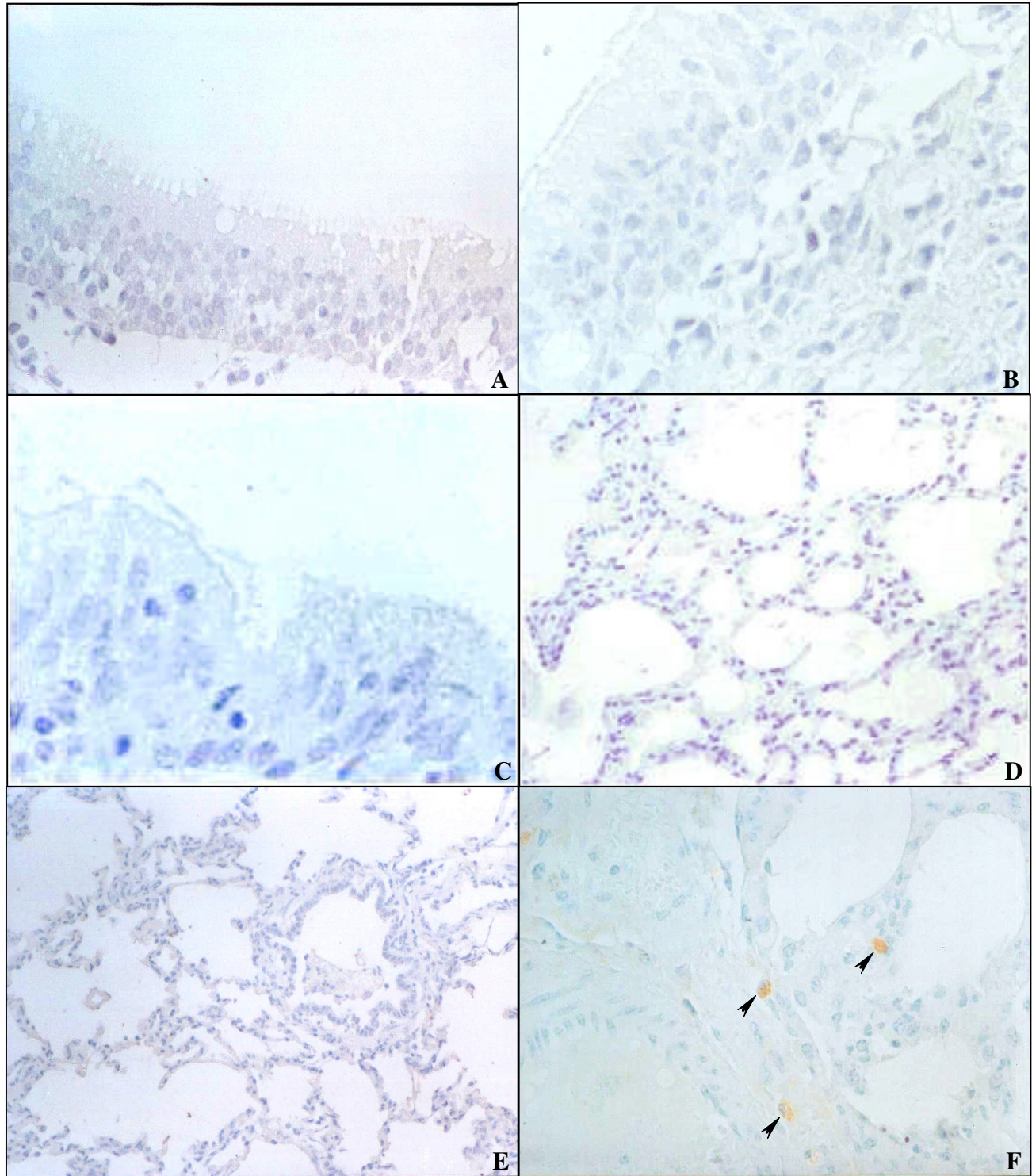


Figure 3: Immunohistochemistry in experimentally BRSV-infected bovine tissues. **A-C:** Tracheal tissue from calves 139 (**A**), 151 (**B**) and 165 (**C**). **D-F:** Lung tissue from calves 139 (**D**), 151 (**E**) and 165 (**F**).

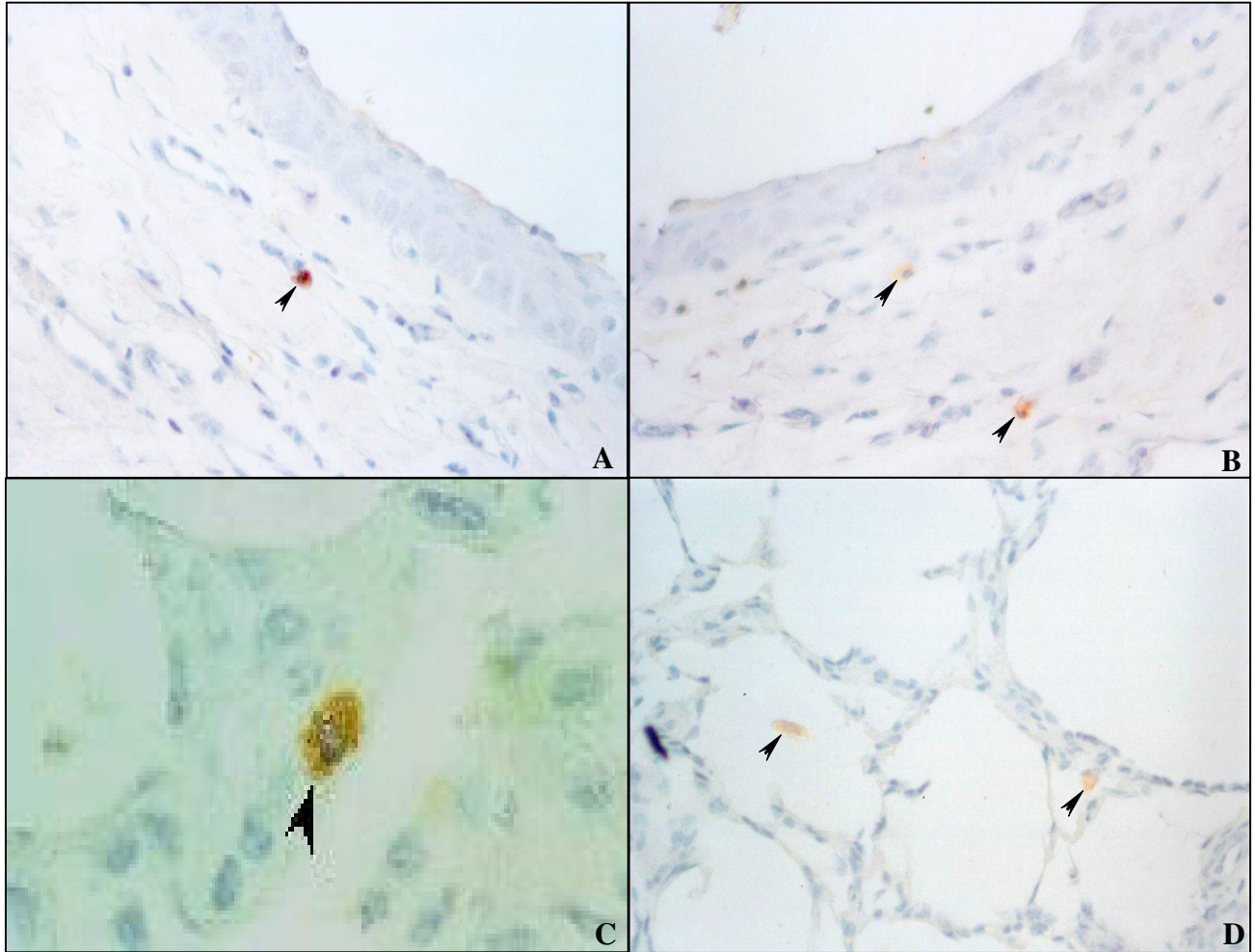


Figure 4: Immunohistochemistry in bovine tissues suspected to have BRSV. **A** and **B:** tracheal tissue from calf B1. **C, D:** lung tissue from calves B1 (**C**) and B2 (**D**). (**A, B** and **D:** 40X; **C:** 100X).

Discussion

Brazil has the largest commercial bovine herd in the world (180 million animals), a production of 7 million tons of meat (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2003) and more than 20 million litres of milk per year (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003). Maintaining the health of the Brazilian herd is therefore of considerable economic importance. However, very little is known about the significance of BRSV infections in Brazil. This situation probably reflects the erroneous belief that the losses caused by BRSV are not a significant problem in extensive production, which corresponds the main exploration way of bovine Brazilian herds. However, a serological analysis of Brazilian cattle indicated that BRSV has already infected 75% of the bovines on 65 farms in several southern Brazilian states (Campalans & Arns, 1997), ~25% of viral antigens detected by immunodetection in 41 cases examined by Flores et al. (2000), and >95% of Brazilian cattle ≤ 3 years old, with 70% of the calves being infected within the first year of life (Gonçalves et al., 1993). The mortality rate for confirmed acute infections ranges from 5% to 20% (Campalans & Arns, 1997).

BRSV was isolated for the first time in Brazil in 1995 from nasotracheal secretion samples of calves in southern Brazil (Arns et al., 2003). So far, only one strain of the virus had been isolated in this country.

The immunohistochemistry test described here generated a very strong signal in BRSV-infected cells, with no background reaction. In addition, no non-specific reactions were seen in the negative control coverslips.

During the standardisation of IHC test in CER cell cultures was noted in all reactions some infected cells with nuclei or perinuclear region also stained intensely, in addition to the cytoplasm. This could represent an abnormal reaction since BRSV is an RNA virus and,

therefore, does not require the nucleus for replication. Studies with monoclonal and polyclonal antibodies have detected N viral protein presents in the cytoplasmic and perinuclear regions of cells infected with porcine reproductive and respiratory viruses and coronaviruses (Chen et al., 2002; Rowland et al., 1999). Since a monoclonal antibody specific for the RSV N protein was used, it is possible that the same phenomenon seen in other studies also occurred here. The interaction of viruses with the nucleus, nuclear subdomains and proteins is not appear to be restricted to viruses that use the nucleus as a site of replication. Many positive and negative strand RNA viruses whose primary site of replication is the cytoplasm sequester nuclear factors in order to facilitate their replication and, by altering the nuclear-cytoplasmic trafficking, can disrupt host cell functions and cellular responses to viral infections. Successful replication and avoidance of the host response to infection are a prerequisite for the successful persistence of a virus (reviewed in Hiscox, 2003). However, the perinuclear reaction could be triggered by viral glycoproteins present in the rough endoplasmic reticulum where they are produced. More studies should be done to analyze the significance of this result.

Only a few cells were positive in infected Balb/c mice. Masot et al. (2000) reported that immunodetection requires a large number of molecules in order to obtain positive reactions. This result also agreed with Collins et al (1996) whom noted that although several of experimental species have been used as models for lower respiratory tract infection by RSV, in most cases, the animals are only semi-permissive to virus replication and the disease does not occur. In Balb/c mice, the most commonly used model the inoculation of 10^4 plaque forming units into the respiratory tract resulted in an infection that yielded only 10^4 plaque forming units per gram of lung tissue at the peak of virus replication (Collins et al, 1996). In RSV-infected cotton rats, which are more permissive than mice, virus detection using *in situ* hybridisation analysis in lung tissues showed that only a small fraction of the cells were

infected (Murphy et al., 1990). In another study in which Balb/c mice were infected with BRSV and sacrificed 3, 5, 7 and 10 days post-infection, a positive immunohistochemistry reaction was detected in only three lung samples from mice 5 days post infection using a different protocol from that described here (Almeida et al., 2004 in press).

Although the IHC assay gave a positive reaction in the two suspected animals tested, only one lung sample from experimentally infected calves was positive. The BRSV has been detected by some authors using immunoenzymatic techniques around 6 days after experimental infection (McNulty et al., 1983; West et al., 1998; West et al., 1999; Schreiber et al., 2000; Tjørnehøj et al., 2003), which comprises the BRSV spread peak (Elazhary et al., 1980; Thomas et al., 1984; van der Poel et al., 1996; van der Poel, 1997; West et al., 1998; Valarcher et al., 1999; Tjørnehøj et al., 2003). However we were unable to detect the BRSV, by the standardised IHC described in this study, in two inoculated animals, although these animals were positive by RT-nested-PCR (R.S. Almeida, F.R. Spilki, P.M. Roehe, C. W. Arns, submitted). This is in agreement with other studies, which demonstrated that the PCR techniques usually show high sensitivity (Jacobs et al., 1975; Elazhary et al., 1980; Thomas et al., 1984; Castleman et al., 1985; van der Poel et al., 1996; van der Poel et al., 1997; West et al., 1998; Valarcher et al., 1999; Tjørnehøj et al., 2003). In this view, it is possible that the IHC is not sensitive enough to detect the virus in some circumstances. West et al. (West et al., 1998) found 4 calves of 12 negative by PCR (nasal secretions) on day 2 that were positive by virus isolation. However, this trend was reverse on days 6-8, with 9 animals positive by PCR that were negative by isolation and 5, of the same 9, also yielded negative results by antigen ELISA. The PCR carried out by these authors has found to be more sensitive later in the infection (6-8 days post-infection) than the enzyme immunoassay used. It is possible that similar fact has happened here. However, it remains to be determined. Other authors found

negative antigenic diagnosis by direct immunofluorescence during BRSV outbreaks (Baker et al., 1986b; Kimman et al., 1986; Schreiber et al., 2000) showing that these negative reactions are not so rare in natural BRSV infection, being possible the same incident during experimental infections. Negative results by immunodetection were also obtained during works realized by Flores et al. (Flores et al., 2000) in tissues from cases with clinical and histological findings compatible with BRSV aetiology.

The experimental inoculation route seems to be crucial for the induction of disease (Tjørnehøj et al., 2003). The exact mode of transmission during a natural BRSV-infection has not been unambiguously defined. In studies realized by Tjørnehøj et al., (2003) indicated that the inoculation with aerosol for 10 min is probably quite close to the field exposure. The inoculation protocol adopted here can have originated an infection degree, which was possible to be detected only by a more sensitive technique (as PCR) and not by IHC. An evidence that fortifies this possibility it is the fact that the only one positive sample was originated from the animal clinically the most severely affected after BRSV inoculation. Furthermore, two cases of natural infection were detected by the technique.

Another point is that mentioned by Masot et al. (1993) whom reported that the BRSV-detections were more effective in cells belonging to damaged lung areas and it was not a concern in this study.

The innovation of the technique standardised here was the application of monoclonal antibodies directed to conserved proteins of human respiratory syncytial virus, which are commercially available and, consequently, are not necessary to be produced as the monoclonal antibodies specific to BRSV antigens.

Even though the IHC technique presently standardised requires final adjustments, it represents a possibility for substitution to the laborious BRSV isolation and a good alternative to the laboratorial diagnosis of this virus in Brazil.

Acknowledgements

The authors thank Joyce Camargo and Geneci Davi for technical assistance. This work was supported by FAPESP.

References

- Almeida, R.S., H.G. Domingues, L.T. Coswig, R.C.F. D'Arce, R.F. Carvalho and C.W Arns, 2004: Detection of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected balb/c mice. *Vet. Res.* **35**, 1-9 (in press)
- Ames, T.R., 1993: The epidemiology of BRSV infection. *Vet. Med.* 881-885.
- Arns, C.S., J. Campalans, S.C.B. Costa, H.G.Domingues, R.C.F. D'Arce and R.S. Almeida, 2003: Characterization of bovine respiratory virus isolated in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 213-218.
- Baker, J.C., T.R. Ames, and R.J.F. Markham, 1986a: Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 240-245.
- Baker, J.C., R.E. Werdin, and T.R. Ames, 1986b: Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a beef herd. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 246-253.

- Baker, J.C., R.E. Werdin, T.R. Ames, R.J.E. Markhan, and V.L. Larson, 1986c: Study on the etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 246-253.
- Campalans, J., and C.W. Arns, 1997: Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. *Virus Reviews & Research.* **2**, 50-56.
- Castleman, W.L., J.C. Lay, E.J. Dubovi, and D.O. Slauson, 1985: Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves: light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavage lung cells. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 547-553.
- Chen, H., T. Wurm, P. Britton, G. Brooks, and J.A. Hiscox, 2002: Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J. Virol.* **76**, 5233-5250.
- Collins P.L., K. McIntosh and R.M. Chanock, 1996. Respiratory syncytial virus. In: Fields BN (Editor). *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Cook, P.M., R.P. Eglin, and A.J. Easton, 1998: Pathogenesis of pneumovirus infections in mice: detection of pneumonia virus of mice and human respiratory syncytial virus mRNA in lung of infected mice by *in situ* hybridization. *J.Gen. Virol.* **79**, 2411-2417.
- Driemeier, D., M.J.P. Gomes, V. Moojen, C.W. Arns, G. Vogg, L. Kessler and U.M. Costa, 1997: Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Vet. Brasil.* **17**, 77-81.
- Dubovi, E.J., 1993: Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective. *Vet. Med.* 888-893.

- Elazhary, M.A.S.Y., M. Galina, R.S. Roy, M. Fontaine, and P. Lamothe, 1980: Experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus (Quebec strain). *Can. J.Comp. Med.* **44**, 390-395.
- Flores, E.F., R. Weiblen, M. Medeiros, S.A. Botton, L.F. Irigoyen, D. Driemeier, L.F. Schuch and M. Moraes, 2000: A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Pesquisa Vet. Brasil.* **20**, 139-143.
- Gonçalves, I.P.D., H.C. Jost, A.D. Soglio, A.T. Simanke, I. Hotzel, and V. Moojen, 1993: Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural.* **23**, 389-390.
- Hiscox, J.A., 2003: The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Res.* **95**, 13-22.
- Jacobs, J.W. and N. Edington, 1975: Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. *Veterinary Science.* **18**, 299-306.
- Kimman, T.G., G.M. Zimmer, P.J. Straver, and P.W. Leeuwen, 1986: Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 143-147.
- Kimman, T.G., P.J. Straver, and G.M. Zimmer, 1989: Pathogenesis of naturally acquire bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings. *Am. J. Vet. Res.* **50**, 684-693.
- Masot, A.T., C. Gómez-Tejedor, I. Tovar, A. Gázquez, and E. Redondo, 1993: Location of bovine respiratory syncytial virus antigens in the lung of experimentally-infected lambs:

- comparative study using indirect fluorescent antibody test, avidin-biotin-peroxidase complex and transmission electron microscopy. *Eur. J. Histochem.* **37**, 75-82.
- Masot, A.T., C. L. Kelling, O. López, J.H. Sur, and E. Redondo, 2000: In situ hybridization detection of bovine respiratory syncytial virus in the lung of experimentally infected lambs. *Vet. Pathol.* **37**, 618-625.
- McNulty, M.S., D.G. Bryson, and G.M. Allan, 1983: Experimental respiratory syncytial virus infection pneumonia in young calves: microbiologic and immunofluorescent findings. *Am. J. Vet. Res.* **44**, 1656-1659.
- Murphy, B.R., G.A. Prince, L.A. Lawrence, K.D. Croen, and P.L. Collins, 1990: Detection of respiratory syncytial virus (RSV) infected cells by in situ hybridization in the lungs of cottons rats immunized with formaline-inactivated virus or purified RSV F and G glycoproteins subunit vaccine and challenged with RSV. *Virus Res.* **16**, 153-162.
- Norström, M., D.U. Pfeiffer, and J. Jarp, 2000: A space-time cluster investigation of an outbreak of acute respiratory disease in Norwegian cattle herds. *Prev. Vet. Med.* **47**, 107-119.
- Obando, C., C. Baule, C. Pedrique, C. Veracierta, S. Belak, M. Merza, and J. Moreno-Lopez, 1999: Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. *Acta Vet. Scand.* **40**, 253-262.
- Paton, D.J., K.H. Christiansen, S. Alenius, M.P. Cranwell, G.C. Pritchard, and T.W. Drew, 1998: Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.* **142**, 385-391.
- Rowland, R.R., R. Kervin, C. Kuckleburg, A. Sperlich, and D.A. Benfield, 1999: The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein

- to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res.* **64**, 1-12.
- Schreiber, P., J.P. Matheise, F. Dessy, M. Heimman, J.J. Letesson, P. Coppe and A. Collard, 2000: High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. *J. Vet. Med. B.* **47**, 535-550.
- Sorden, S.D., R.W. Kerr, and E.D. Jansen, 2000: Interstitial pneumonia in feedlot cattle: concurrent lesions and lack of immunohistochemical evidence for bovine respiratory syncytial virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**, 510-517.
- Thomas, L.H., E.J. Stott, A.P. Collins, and J. Jebbet, 1984: Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus. *Brit. J. Exp. Pathol.* **65**, 19-28.
- Tjørnehøj, K, Å. Uttenthal, B. Viuff, L.E. Larsen, C. Røntved, and L. Rønsholt 2003: An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves, *Res. Vet. Sci.* **74**, 55-65.
- Uttenthal, A., L.E. Larsen, J.S. Philipsen, K. Tjørnehøj, B. Viuff, K.H. Nielsen and T.K. Nielsen, 2000: Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. *Vet. Microbiol.* **76**, 329-341.
- Valarcher, J.F., H. Bourhy, J. Gelfi and F. Schelcher, 1999: Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1858-1862.

- van der Poel, W.H., J.A. Kramps, W.G. Middel, J.T. van Oirschot, and A. Brand, 1993: Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infection: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Arch.Virol.* **133**, 309-321.
- van der Poel, W.H., R.S. Schrijver, W.G. Middel, J.A. Kramps, A. Brand, and J.T. van Oirschot, 1996: Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passage bovine respiratory syncytial virus, *Vet. Quart.* **18**, 81-86.
- van der Poel, W.H., J.P.M. Langedijk, J.A. Kramps, W.G. Middel, A. Brand, and J.T. van Oirschot, 1997: Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus, *Arch. Virol.* **142**, 1681-1696.
- West, K., J. Borgdan, A. Hamel, G. Nayar, P.S. Morley, D.M. Haines, and J.A. Ellis, 1998: A comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens. *Can. J. Vet. Res.* **62**, 245-250.
- West, K., L. Petrie, D.M. Haines, C. Konoby, E.G. Clark, K. Martin, and J.A. Ellis, 1999: The effect of fomalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves. *Vaccine.* **17**, 809-820.
- Westenbrink, F., J.M.A. Brinkhof, P.J. Straver, J. Quak, and P.W. De Leeuw, 1985: Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralization tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infection. *Res.Vet. Sci.* **38**, 334-340.
- Westenbrink, F., and T.G. Kimman, 1987: Immunoglobulin M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections. *Am. J. Vet. Res.* **48**, 1132-1137.

Woldemeskel, M., E. Kebede, L. Yigezu, and L.N. Potgieter, 2000: Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from Ethiopia. Dtsch Tierarztl Wochenschr. **107**, 454-466.

Artigo 3

Detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) isolate by a RT-nested-PCR in experimentally infected calves

R.S. Almeida, F.R. Spilki, P.M. Roehe, C. W. Arns

enviado para publicação sob a forma de *Short Communication* para a revista

Veterinary Microbiology

Detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) isolate by a RT-nested-PCR in experimentally infected calves

Renata S. ALMEIDA^a, Fernando R. SPILKI^b, Paulo M. ROEHE^b, Clarice W. ARNS^{a,*}

^aLaboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, CEP 13081-970, Campinas - SP, Brazil

^bDM/ICBS- UFRGS; CPVDF, Estrada do Conde 6000, CEP 92990-000, Eldorado do Sul – RS, Brazil

^{*}Corresponding author. Tel: +55-19-37886267; fax: +55-19-37886276; e-mail: arns@obelix.unicamp.br

Abstract – An RT-nested-PCR was standardised to detect bovine respiratory syncytial virus (BRSV), using a Brazilian isolate, following initial tests in infected chicken embryo related (CER) cells, three calves were experimentally infected. One animal had lesions characterized by interstitial multifocal pneumonia, severe interstitial and subpleural emphysema, and lung consolidated areas. Lung and tracheal tissues collected six days after infection were analysed by RT-nested-PCR. Primers specific for the BRSV G and F glycoproteins genes yielded amplification fragments of 371 bp and 481 bp, respectively, from the RNA of the cell-propagated virus. Using RNA extracted from organs of infected calves, RT-nested-PCR amplified the fragment of the G gene in all tracheal samples but in only two of three lung samples analysed. These results suggest that RT-nested-PCR could be a promising assay for diagnosis and epidemiological analysis of BRSV in Brazil.

Bovine respiratory syncytial virus/RT-nested-PCR/calves/experimental infection/F and G genes/Brazilian strain.

1. Introduction

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), which belongs to the Pneumovirus genus of the *Paramyxoviridae* family, is an important pathogen of respiratory tract disease in cattle. The laboratorial diagnosis of infections caused by respiratory syncytial viruses is often difficult because of the limited growth of the virus in cell cultures and in the most experimental animals, and also because of instability of the virus. Currently, the diagnosis of BRSV infections is most commonly done by detecting specific antibodies in serum (Westenbrink et al., 1985; Westenbrink & Kimman, 1987). However, the time needed to obtain the results (Dubovi, 1993) and the fact that some infections are serologically undetectable (Collins et al., 1996, pp. 1313-1351) means that there is a need for a quick, sensitive and specific method for the diagnosis of BRSV infections.

BRSV is widely distributed in many countries (Baker et al., 1986, van der Poel et al., 1993, Paton et al., 1998, Obando et al., 1999, Norström et al., 2000, Sorden et al., 2000, Uttenthal et al., 2000, Woldemeskel et al., 2000), including Brazil, with the first virus detection in 1993 by immunofluorescence test in trachea and lung tissues and the first virus isolation in 1995 from nasotracheal secretions of calves from the southern and southeastern states of the country (Gonçalves et al., 1993, Arns et al., 2003). However, little is known about the role of BRSV in respiratory disorders in Brazilian cattle. Moreover, although serological tests for BRSV show ~95% positivity (Gonçalves et al., 1993), not much is known about the real distribution and participation of this virus in the loss of production in Brazilian herds. In this work, a RT-nested-PCR was developed to detect BRSV in cultured cells and in tissues of experimentally infected calves. This assay could be useful in the diagnosis of BRSV and in epidemiological studies of this virus in Brazilian cattle.

2. Methods and results

Monolayers of chicken embryo related (CER) cells were inoculated with Brazilian strain BRSV-25-BR ($10^{4.3}$ DICC₅₀/mL) isolated in the Laboratório de Virologia Animal of the Instituto de Biologia at UNICAMP (Arns et al., 2003). RNA was extracted from infected cultures after two days using phenol guanidine isothiocyanate (TRIzol, InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA) and chloroform. Total RNA was precipitated with the same volume of 100% isopropanol followed by centrifugation. The pellet was washed with 70% ethanol and diluted in 25 µL of water containing 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma-Aldrich Co., MO, USA). Negative controls were mock-infected cells. The RT-nested-PCR was standardised to amplify a 481 bp fragment of corresponding to part of the F gene and/or a 371 bp fragment corresponding to part of the G gene of BRSV. The outer and inner primers were those described by Vilcek et al. (1994). cDNA was synthesized using a commercial SuperScriptTM II RNase H Reverse Transcriptase kit (InvitrogenTM, CA, USA). The final reaction volume of 50 µL consisted of 5 µL of 10X amplification buffer, 2 µL of each dNTP (10 mM); 10 pmol of primer B1 (F gene) or B5A (G gene), 10 pmol of primer B2A (F) or B6A (G), 0.6 µL of the enzyme PlatinumTM Pfx DNA Polymerase (2.5U/µL; InvitrogenTM, CA, USA), 1 µL of MgSO₄ (50 mM); 2 µL of cDNA, and water to complete the final volume. After an initial denaturation at 94°C for 2 min, 25 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and elongation at 72°C for 1 min. The second PCR was done using 2 µL of the first PCR product, with the primers now being B3 and B4A (F) or B7A and B8 (G), for 35 cycles that included denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 45 s and elongation at 72°C for 1 min. A final elongation step of 7 min was done in both PCRs.

To guarantee that the amplicons from the RT-nested-PCR standardised with virus multiplied in vitro corresponded to the F and G genes of BRSV, the fragments were sequenced in an automatic sequencer ABI 377-96 (Perkin-Elmer, CA, USA). The sequences confirmed that the fragments were from the F and G genes.

To assess sensitivity of the RT-nested-PCR, the cDNA synthesized for F and G genes was quantified spectrophotometrically, serially diluted (10^{-1} - 10^{-3}) and then, amplified by RT-nested-PCR. The assay amplified the fragment corresponding to the G gene in both pure material and material diluted 10^{-2} (containing 0.024 µg of cDNA), while the fragment corresponding to protein F was only amplified from pure (undiluted) material (2.45 µg; Fig. 1).

Three five-month-old calves (nos. 139, 151 and 165) seronegative for BRSV were anaesthetised with 1% acepromazine (0.1 mg/kg) and intratracheally inoculated with 20 mL of viral antigen containing $10^{4.3}$ DICC₅₀/mL of virus. Macroscopic lesions compatibles with BRSV-infection were seen in two calves (nos. 139 e 165). The lesions presents in the calf no. 139 were mild, characterised by interstitial pneumonia and emphysema. The calf no. 165 showed more severe interstitial multifocal pneumonia, severe interstitial and subpleural emphysema, and consolidated lung areas (Fig. 2). Lung and trachea tissues from the calves were analysed by RT-nested-PCR using the same protocol but only with primers directed to the gene for G protein. All three tracheal samples were successfully amplified whereas only two lung samples (from calves 139 and 151) were positive (Fig. 3).

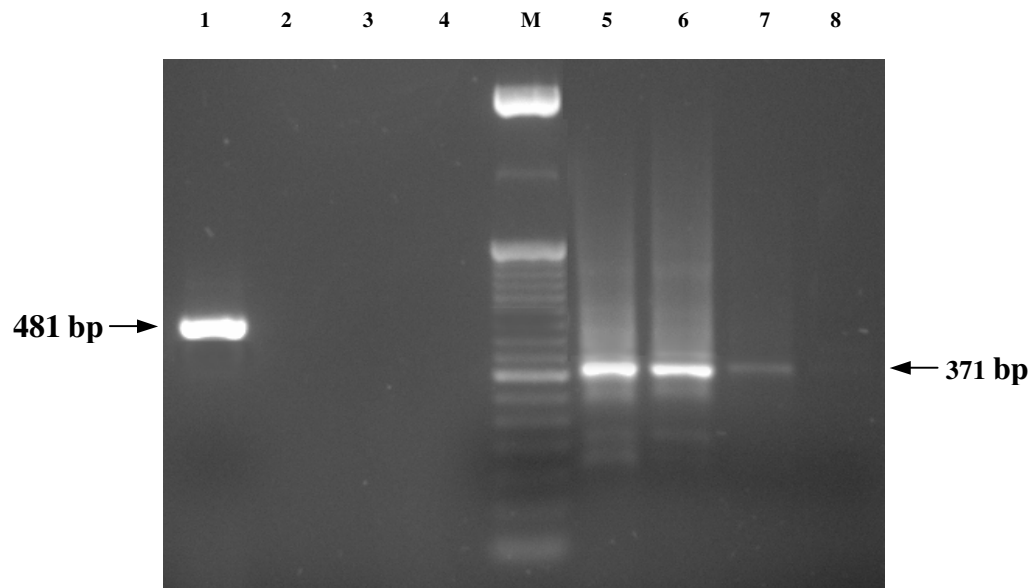


Figure 1. Sensitivity of the RT-nested-PCR. Lane 1, pure gene F cDNA (1225 $\mu\text{g/mL}$); lane 2, gene F cDNA diluted 1:10; lane 3, gene F cDNA diluted 1:100; lane 4, gene F cDNA diluted 1:1000; lane M, molecular weight marker; lane 5, pure gene G cDNA (1197.5 $\mu\text{g/mL}$); lane 6, gene G cDNA diluted 1:10; lane 7, gene G cDNA diluted 1:100; lane 8, gene G cDNA diluted 1:1000.

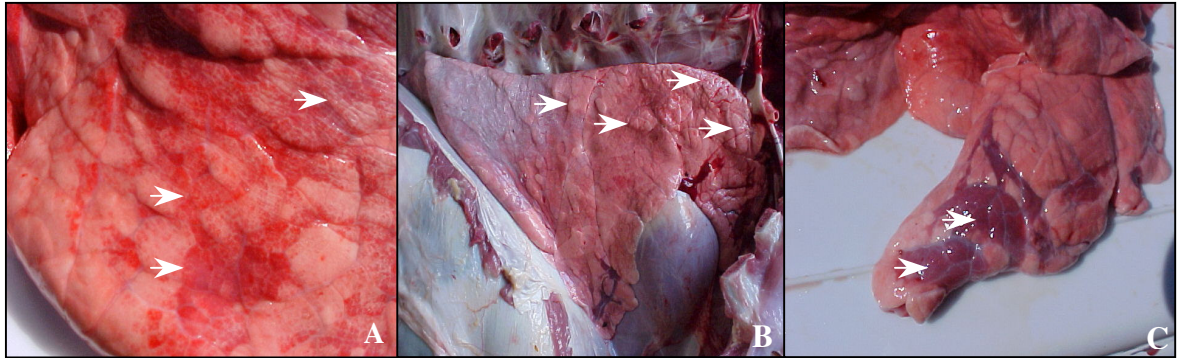


Figure 2. Macroscopic lesions in experimentally infected calves. A, interstitial pneumonia and subpleural emphysematous bullae; B, areas of emphysema; C, consolidated areas.

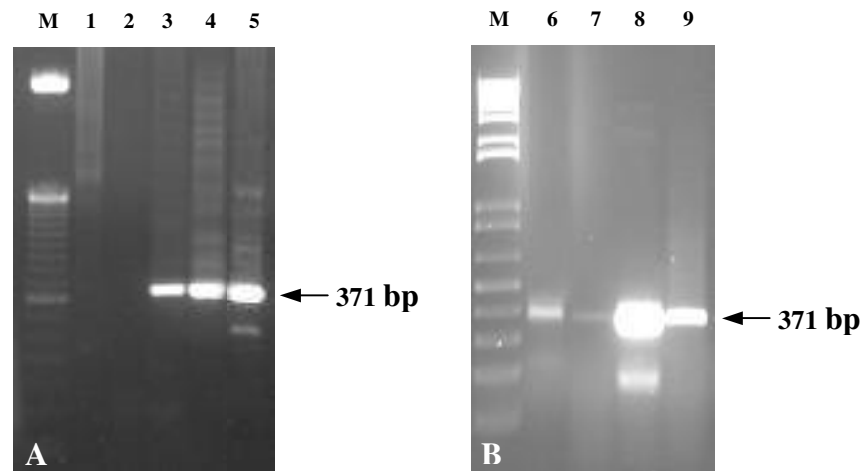


Figure 3. RT-nested-PCR of tissues from experimentally infected calves. Lane M, molecular weight marker; lane 1, negative control; lanes 2-4: lungs of infected calves 165 (2), 151 (3) and 139 (4); lanes 5 and 6, positive control; lanes 7-9: tracheal tissue of infected calves 139 (7), 151 (8) and 165 (9).

3. Discussion

Serological analysis of Brazilian cattle indicated that BRSV has already infected 75% of the bovines on 65 farms in several southern Brazilian states (Campalans & Arns, 1997) and >95% of Brazilian cattle ≤ 3 years old, with 70% of the calves being infected within the first year of life (Gonçalves et al., 1993). The mortality rate for confirmed acute infections ranges from 5% to 20% (Campalans & Arns, 1997). However, very little is known about the significance of BRSV infections in Brazil. BRSV was isolated for the first time in the country in 1995 from nasotracheal secretion samples of calves in southern Brazil (Arns et al., 2003). So far, only one strain of the virus had been isolated in this country.

As shown here, the experimental infection of calves, done for the first time in Brazil, resulted in BRSV disease in one of three inoculated animals. An RT-nested-PCR standardised using G gene as the target was able to detect BRSV in bovine tissue samples. The sensitivity of the RT-nested-PCR was at least 100 times greater in amplifying the G gene fragment compared to the F gene fragment. Although there are no reports of similar results for PCRs used to detect RSV, this phenomenon may reflect inherent properties of the primers, annealing temperature, G-C content of the target sequences, and secondary structures of the RNA, among others. Even so, more studies must be done. Based on this difference sensitivity and on the fact that positive results were obtained only with primers to the F gene in Balb/c mouse tissue (R. S. Almeida, F.R. Spilki, P.M. Roehle, C. W. Arns, submitted), only G gene was used as a target for RT-nested-PCR in bovine tissues since the technique was more sensitive and consequently more useful as a diagnostic tool.

The RT-nested-PCR amplified a fragment the G gene in all bovine tracheal samples but in only two of the three lung samples. Interestingly, the animal with a respiratory syndrome characterized by signs and lesions compatible with a BRSV infection was the only one in which it was not possible to detect the virus in lung tissue. In some cases, respiratory signs may persist or there may be serological evidence of the virus without detection of BRSV (Belknap et al, 1995, Vilcek et al., 1994). In addition, BRSV may not be detected by PCR even when isolated (West et al., 1998). These data suggest that antigen detection may only occur during a short period, that coincides with the acute phase of the respiratory disease (Valarcher et al., 1999). Valarcher et al. (1999) detected BRSV by an RT-nested-PCR for the N gene up to 13 days post-infection in bronchoalveolar lavage fluid of experimentally infected calves with moderate to severe clinical signs. Similarly, West et al. (1998) detected the virus up to the 8th day post-infection in nasal suabes from experimentally infected calves and found the PCR to be more sensitive later in the infection (6-8 days post-infection), showing same clinical situation by RT-PCR for the F gene. In contrast, others have been unable to detect BRSV by RT-PCR of the F gene for more than 6 days after infection (Elvander, 1996). Moreover, respiratory disease caused by BRSV enhances bacterial colonization, adherence and alters the specific and non-specific defence mechanisms of the respiratory tract (Larsen, 2000). Thus, an animal with intense signs of respiratory disease may have secondary infections by bacteria, the presence of which may inhibit the PCR reaction and make it difficult to detect BRSV in lung tissue.

In conclusion, an RT-nested-PCR was standardised for the detection of BRSV in tracheal and lung tissues of experimentally infected calves. This technique should be promising for detecting and diagnosing natural BRSV infections in cattle, as well as for epidemiological

studies. The information thus gained will increase the knowledge of the distribution of this virus in the Brazilian bovine herd.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP. The authors thank Joyce Camargo and Geneci Davi for technical assistance.

References

- Arns, C.S., Campalans, J., Costa, S.C.B., Domingues, H.G, D'Arce, R.C.F, Almeida, R.S., 2003. Characterization of bovine respiratory virus isolated in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 213-218.
- Baker, J.C., Ames, T.R., Werdin, R.E., 1986b. Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a beef herd. *Am. Res. Res.* 47, 246-253.
- Belknap, E.B., Ciszewski, D.K., Baker, J.C., 1995. Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in calves and lambs. *J. Vet. Diagn. Investig.* 7, 285-298.
- Campalans, J., Arns, C.W., 1997. Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. *Virus Rev. & Res.* 2, 50-56.
- Collins P.L., McIntosh K., Chanock R.M., 1996. Respiratory syncytial virus. In: Fields, B.N. (Ed.), *Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1313-1351.

- Dubovi, E.J., 1993. Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective. *Vet. Med.* 888-893.
- Elvander, M., 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.* 138, 101-105.
- Gonçalves, I.P.D., Jost, H.C., Soglio, A.D., Simanke, A.T., Hotzel, I., Moojen, V., 1993. Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural.* 23, 389-390.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [www.ibge.gov.br/estatística/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria]. Accessed July 15, 2003.
- Larsen, L.E., 2000. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet. Scand.* 41, 1-24.
- Norström, M., Pfeiffer, D.U., Jarp, J., 2000. A space-time cluster investigation of an outbreak of acute respiratory disease in Norwegian cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 47, 107-119.
- Obando, C., Baule, C., Pedrique C., Veracierta, C., Belak, S., Merza, M., Moreno-Lopez, J., 1999. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. *Acta Vet. Scand.* 40, 253-262.
- Paton, D.J., Christiansen, K.H., Alenius, S., Cranwell, M.P., Pritchard, G.C., Drew, T.W., 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.* 142, 385-391.
- Sorden, S.D., Kerr, R.W., Jansen, E.D., 2000. Interstitial pneumonia in feedlot cattle: concurrent lesions and lack of immunohistochemical evidence for bovine respiratory syncytial virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 510-517.

- Uttenthal, A., Larsen L.E., Philipsen, J. S., Tjørnehøj, K., Viuff, B., Nielsen, K.H., Nielsen, T.K., 2000. Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. *Vet. Microbiol.* 76, 329-341.
- Valarcher, J.F., Bourhy, H., Gelfi, J., Schelcher, F., 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1858-1862.
- van der Poel, W.H., Kramps, J.A., Middel, W.G., Van Oirschot, J.T., Brand, A., 1993. Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infection: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Arch. Virol.* 133, 309-321.
- Vilcek, S., Elvander, M., Ballagi-Pordany, A., Belak, S., 1994. Development nested PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.* 32, 2225-2231.
- West, K., Borgdan, J., Hamel, A., Nayar, G., Morley, P.S., Haines, D.M., Ellis, J.A., 1998. A comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens. *Can. J. Vet. Res.* 62, 245-250.
- Westenbrink, F., Brinkhof, J.M.A., Straver, P.J., Quak, J., De Leeuw, P.W., 1985. Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralization tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infection. *Res. Vet. Sci.* 38, 334-340.
- Westenbrink, F., Kimman, T.G., 1987. Immunoglobulin M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1132-1137.

Woldemeskel M., Kebede, E., Yigezu L., Potgieter, L.N., 2000. Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from Ethiopia. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 107, 454-466.

8. OUTROS RESULTADOS

Neste estudo, um novo isolado brasileiro de BRSV, detectado previamente pela técnica de IHQ (Artigo 2), originado de amostras teciduais pertencentes a um bovino (denominado B1) de um ano de idade apresentando histórico de problemas respiratórios descrito no Anexo 1 (Figura 1) e procedente do Rio Grande do Sul, foi igualmente detectado por RT-nested-PCR e, subsequentemente, partes dos genes F, G e SH do genoma viral foram seqüenciadas.

Para a detecção por RT-nested-PCR, aproximadamente 100 mg de tecido (traqueal ou pulmonar) foram submetidos à extração do RNA pelo uso de isotiocianato de guanidina fenol (TRIzol, Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) e clorofórmio. A RT-nested-PCR foi padronizada para amplificar um fragmento de 371 bp, correspondente à parte do gene G do BRSV e usando *primers* externos e internos descritos por Vilcek et al. (1994). Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit comercial SuperScript™ II Rnase H Reverse Transcriptase (Invitrogen™, California, USA). O programa do ciclo da primeira PCR foi estabelecido por um período de denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos and extensão a 72°C por 1 minuto. Vinte cinco ciclos de amplificação foram executados. A Segunda PCR foi efetuada usando o seguinte ciclo termal: denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Trinta e cinco ciclos de amplificação foram realizados. O último ciclo de extensão foi prolongado em 7 minutos em ambas as reações. Resultados positivos foram obtidos com o tecido pulmonar (Figura 2).

Posteriormente, o vírus foi isolado, em um trabalho que foi realizado paralelo a este, e alguns fragmentos dos genes F, G e SH foram amplificados neste estudo, igualmente usando uma técnica de RT-nested-PCR, para serem seqüenciados. A RT-nested-PCR executada para

fins de seqüenciamento foi realizada no *Danish Veterinary Institute* (Copenhagen, Dinamarca) utilizando os *primers* desenhados pelo Dr. Lars Eric Larsen (Figura 1 do Anexo 2), e o seqüenciamento foi realizado no *National Veterinary Institute* (Uppsala, Suécia). Os fragmentos foram seqüenciados diretamente do produto da PCR purificado pelo uso de um kit commercial (QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e de acordo com recomendações do fabricante. Foi utilizado o seqüenciador automático 3100 Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems, California, EUA). Os fragmentos seqüenciados foram submetidos à análise de similaridade de seqüências, análise filogenética e alinhados com outros isolados de BRSV usando dados armazenados no GeneBank (*National Center for Biotechnology Information* 2003) (Figuras 1-9 do Anexo 3). As análises foram capazes de classificar o vírus detectado como BRSV pertencente ao subgrupo B.

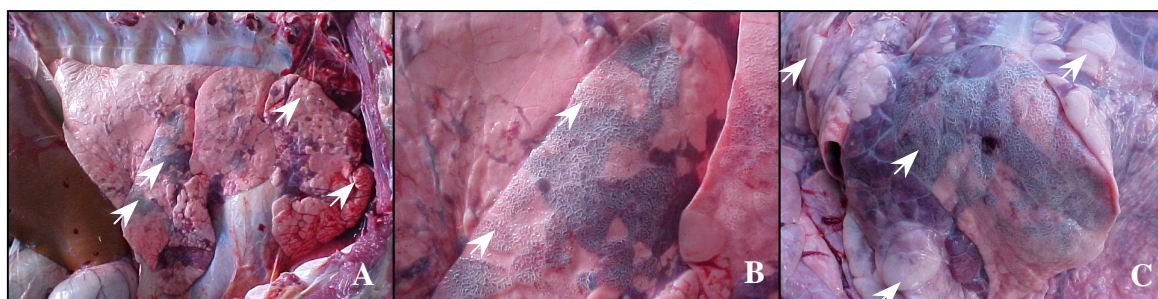


Figure 1. Lesões macroscópicas do bovino B1 infectado. **A e C:** áreas de hemorragia, consolidação pulmonar e enfisema intersticial; **B:** enfisema subpleural caracterizado pela formação de bolhas na pleura.

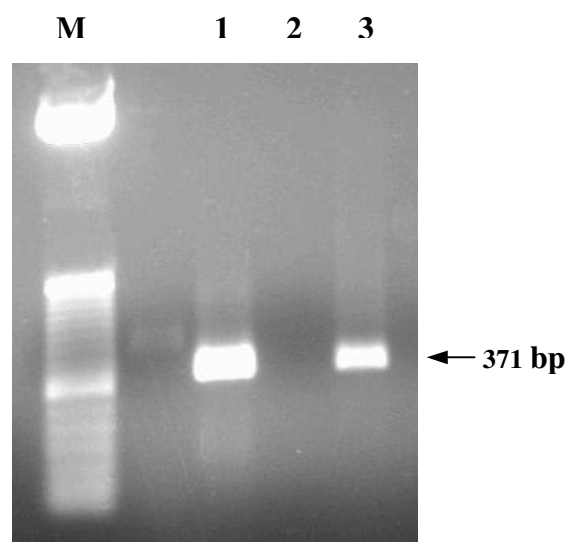


Figure 2. RT-nested-PCR do tecido pulmonar do bovino B1. **Linha M:** marcador de peso molecular; **Linha 1:** controle positivo para o gene G; **Linha 2:** controle negativo; **Linha 3:** pulmão do bovino B1.

A amostra de pulmão do animal infectado B1 e as amostras de pulmão e traquéia dos bovinos infectados experimentalmente foram submetidas, além de à técnica de IHQ padronizada neste estudo (Artigo 2), à técnica de IHQ desenvolvida no *Royal Veterinary and Agricultural University*. A técnica foi executada conforme protocolo descrito brevemente: Os cortes de tecido foram desparafinizados por aquecimento a 70°C durante 10 a 15 minutos e banhos decrescentes de xilol e etanol. Após um pré-tratamento com protease a 0,018% durante 5 minutos em temperatura ambiente, os cortes foram bloqueados por 10 minutos com TBS [Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5] contendo 5% de soro normal de suíno e incubado *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal bovino biotinilatado, específico para BRSV, diluído 1:600 em TBS. A seguir, as lâminas foram incubadas com strepto-avidina a 0,9% (DAKO, Glostrup, Denmark) por 30 minutos a 37°C seguido por nova incubação com fosfatase alcalina biotinilatada (DAKO) a 0,9% igualmente durante 30 minutos a 37°C. A reação foi revelada

pela adição de Fast RedTM (KemEnTec, Copenhagen, Denmark), na proporção de 1 tablete para cada 2 mililitros de TBS, durante 10-15 minutos. Após a lavagem com TBS, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris as lâminas montadas com Glycergel (DAKO) para visualização ao microscópio.

Obteve-se resultado positivo na traquéia de 2 dos 3 bovinos experimentalmente infectados (139 e 165) (Figura 3) e no pulmão do bovino B1 suspeito (Figura 4).

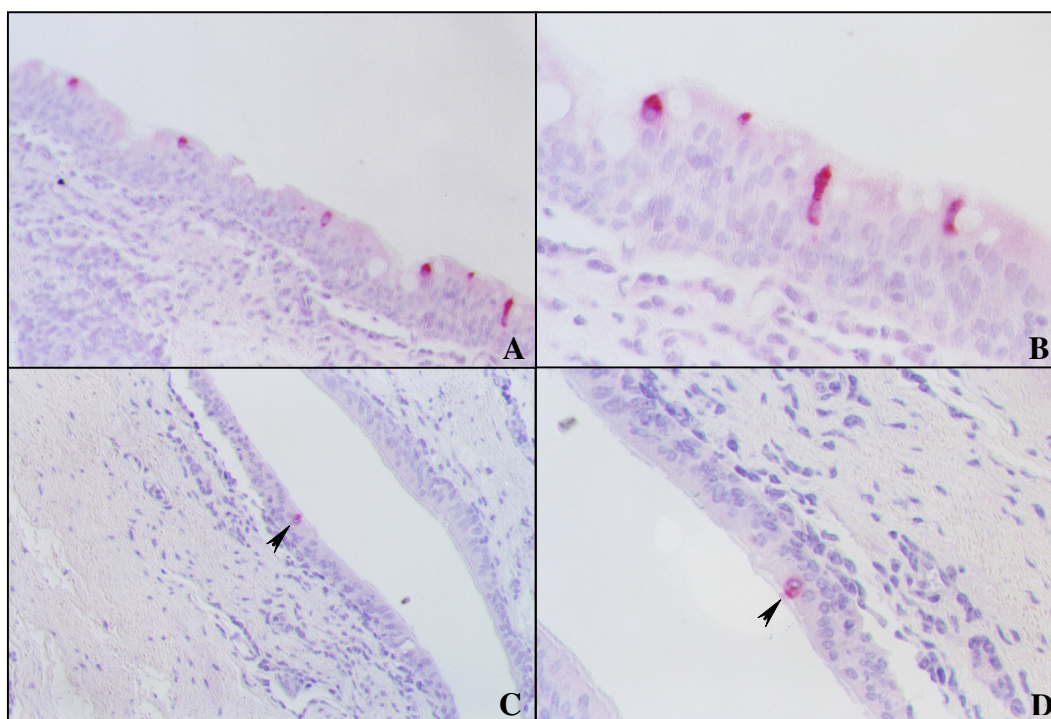


Figura 3: IHQ das traquéias dos bovinos experimentalmente. **A e B:** Bovino 139. **C e D:** Bovino 165 (setas).

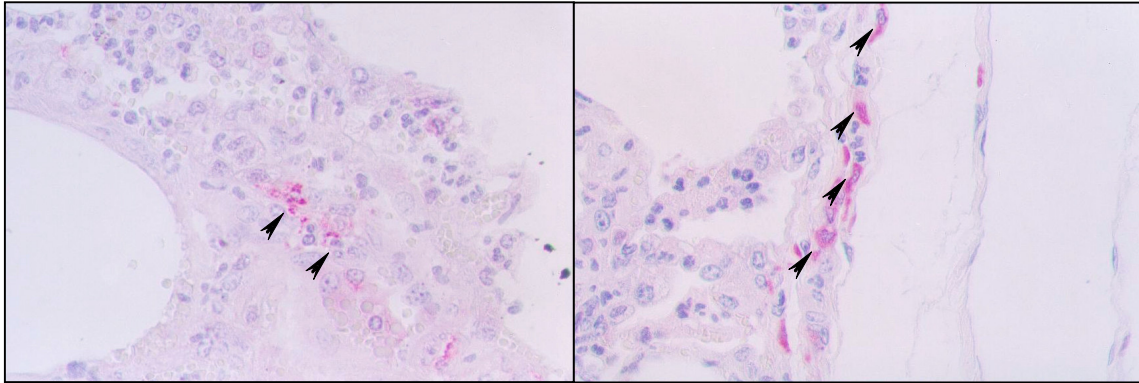


Figura 4: IHQ do pulmão do bovino B1 suspeito (as setas demonstram as células positivas marcadas).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o presente estudo tenha permitido a detecção do BRSV em camundongos Balb/c infectados experimentalmente pelas técnicas de RT-nested-PCR e IHQ e estabelecido a possibilidade de uso deste modelo experimental para estudos com este vírus, este procedimento apresentou dificuldades. Os resultados aqui obtidos demonstraram que a utilização destes animais para infecções por BRSV sem nenhum artifício pode ser laboriosa e, muitas vezes, sem sucesso. No entanto, a dificuldade de reprodução da infecção e de detecção viral em camundongos reflete, ao menos em parte, o que ocorre seguinte à infecção experimental, e muitas vezes até mesmo à infecção natural, pelo BRSV em bovinos. A utilização de camundongos imunossuprimidos ou *knockout* pode representar uma alternativa para obter melhores resultados no que diz respeito à intensidade de replicação com estes modelos experimentais, o que deverá futuramente ser analisado.

A sensibilidade da técnica de RT-nested-PCR padronizada, 100 vezes superior para amplificar o fragmento do gene G em relação ao fragmento do gene F, pode explicar a amplificação somente do primeiro nos tecidos dos camundongos experimentalmente infectados (Artigo1). Provavelmente, o RNA viral extraído deste material foi suficiente somente para permitir a amplificação do gene G. Embora não existam relatos de resultados semelhantes relacionados aos RSVs na literatura, este tipo de achado pode ocorrer devido a condições inerentes aos iniciadores, temperatura de anelamento, conteúdo de G-C das seqüências alvos, estruturas secundárias do RNA, entre outros.

O bovino infectado experimentalmente que demonstrou sintomatologia respiratória mais avançada (animal 165) apresentou resultado positivo no RT-nested-PCR somente a partir da traquéia (Artigo 3). É possível que infecções secundárias ou o estado avançado de

destruição do tecido pulmonar não tenham permitido a detecção viral, por esta técnica, a partir dos pulmões.

Apesar do sinal obtido em tecidos de camundongos ter sido mais intenso com a técnica de IHQ desenvolvida na Royal Veterinary and Agricultural University com relação à IHQ padronizada neste estudo, esta última mostrou-se mais sensível, uma vez que foi capaz de detectar como positivas amostras de pulmão oriundas de animais sacrificados nos dias 3, 5, 7 e 10 dias pós-infecção (dpi) (Artigo 2), em comparação ao resultado positivo obtido somente nos camundongos sacrificados aos 5 dpi da técnica desenvolvida na Royal Veterinary and Agricultural University (Artigo 1). No entanto, foi possível observar a marcação de células positivas na traquéia do bovino nº 139 e poucas células isoladas na traquéia do bovino nº 165 infectados experimentalmente pela técnica utilizando Fast RedTM, o que não foi obtido pela IHQ deste estudo. Como se pode observar, a técnica de IHQ aqui desenvolvida mostrou bom desempenho nos tecidos de camundongos infectados, mas falhou na detecção de antígenos do vírus no tecido dos bovinos infectados experimentalmente, embora tenha sido capaz de desenvolver sinal forte nos tecidos dos bovinos suspeitos. A forma de infecção pode ser uma explicação coerente para este comportamento, uma vez que Tjørnehøj et al., (2003) mencionaram que a inoculação através de instilação de aerossóis por 10 minutos é provavelmente a forma de infecção que mais se aproxima da exposição que os animais recebem a campo, inoculação esta diferente da que foi aplicada neste estudo. É provável, portanto, que os bovinos inoculados experimentalmente não tenham recebido vírus suficiente ou da forma adequada para que a replicação tenha gerado infecção detectável, ou amplamente detectável pelas técnicas de IHQ aqui utilizadas. De qualquer forma, foi possível verificar que a técnica de RT-nested-PCR padronizada mostrou-se mais sensível para detecção do BRSV do

que a técnica de IHQ padronizada ou até mesmo do que a técnica de IHQ desenvolvida na *Royal Veterinary and Agricultural University*, tanto para tecidos murinos quanto bovinos.

Poucas são as informações disponíveis no Brasil sobre o papel do BRSV em desordens respiratórias. No entanto, evidências da presença do vírus no País foram confirmadas por análises sorológicas (Gonçalves et al., 1993, Campalans & Arns, 1997), pela detecção viral em espécimes histológicos (Flores et al., 2000) e, neste estudo, por IHQ e RT-nested-PCR. Apesar de tais evidências, o Brasil possuía, até o momento, somente um isolado de BRSV (Arns et al., 2003). Esta situação mostra que existe uma necessidade urgente em estudar este vírus mais intensivamente no Brasil, no sentido de obter mais isolados de amostras de campo que possam ser usados em análises epidemiológicas e na produção de vacinas com isolados autóctones. A estirpe de BRSV detectada, seqüenciada parcialmente e classificada neste trabalho, e isolada paralelamente em outro estudo, representa o segundo isolado brasileiro de BRSV. Este, juntamente com o primeiro isolado no Brasil BRSV-25-BR (Arns et al., 2003) é representante do subgrupo B do BRSV. A presença do subgrupo B no Brasil é um achado interessante visto que este subgrupo não era detectado no âmbito mundial desde 1976 até ser isolado aqui em 1995 (Arns et al., 2003) e 2003, e, portanto, acreditava-se que o subgrupo não mais circulava entre os rebanhos. Por essa razão, no Brasil são utilizadas vacinas contra o BRSV que apresentam um padrão internacional, ou seja, provavelmente desenvolvidas com antígenos especificamente do subgrupo A ou AB o que poderia explicar, ao menos em parte, o fraco desempenho destas vacinas nos rebanho do País. As diferenças na seqüência nucleotídica encontradas nas estirpes brasileiras devem ser avaliadas quanto à influência na patogenicidade e outras características do vírus. Portanto, o novo isolado de BRSV detectado neste estudo juntamente com o isolado BRSV-25-BR brasileiro, constitui ferramenta fundamental para a

avaliação do perfil dos isolados brasileiros de BRSV, estimar a origem destes isolados e redefinir as necessidades locais com relação ao conteúdo das vacinas.

10. CONCLUSÕES

Embora camundongos Balb/c já tenham sido utilizados em estudos de infecção experimental pelo BRSV, tais estudos não foram capazes de detectar o vírus após a infecção dos animais. Portanto, foi possível detectar, pela primeira vez, o BRSV em tecidos traqueais e pulmonares de camundongos Balb/c infectados experimentalmente estabelecendo estes animais como possíveis modelos experimentais para a infecção por este vírus.

Ambas técnicas de RT-nested-PCR e IHQ padronizadas foram capazes de detectar o BRSV tanto em tecidos de camundongos quanto em tecidos de bovinos. No entanto, a técnica de RT-nested-PCR mostrou-se mais sensível para detecção do vírus do que a técnica de IHQ padronizada, tanto para tecidos murinos quanto bovinos.

A infecção experimental de bovinos pelo BRSV foi realizada com sucesso, uma vez que os animais apresentaram sintomatologia compatível e as amostras de tecido coletadas permitiram a detecção de produtos virais pelas técnicas de RT-nested-PCR e IHQ.

Foi detectada uma nova estirpe brasileira de BRSV, a partir de amostras de tecidos de um bovino suspeito a qual foi isolada em um estudo paralelo a este. Parte dos genes F, G e SH da referida estirpe foi seqüenciada e a análise filogenética do gene G permitiu sua classificação dentro do subgrupo B do BRSV.

Foi detectada marcação nuclear atípica em células CER infectadas por BRSV pela técnica de IHQ padronizada.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (2000). Effector mechanisms of cell-mediated immunity, in A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober (eds) *Cellular and molecular immunology*, W.B. Saunders Company, pp. 291-308.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (2000). Effector mechanisms of humoral immunity, in A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober (eds) *Cellular and molecular immunology*, W.B. Saunders Company, pp. 309-339, 2000.
- Alwan, W.H. and Openshaw, P.J. (1993). Distinct patterns of T- and B-cell immunity to respiratory syncytial virus induced by individual viral protein, *Vaccine* **11**: 431-437.
- Ames, T.R. (1993). The epidemiology of BRSV infection, *Veterinary Medicine* **88**: 881-885.
- Anderson, K., King, A.M., King, R.A. and Wertz, G.W. (1992). Polylactisaminoglycan modification of the respiratory syncytial virus small hydrophobic (SH) protein: a conserved feature among human and bovine respiratory syncytial viruses, *Virology* **191**: 417-430.
- Arns, C.S., Campalans, J., Costa, S.C.B., Domingues, H.G., D'Arce, R.C.F. and Almeida, R.S. (2003). Characterization of bovine respiratory virus isolated in Brazil, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **36**: 213-218.
- Atreya, P.L., Peeples, M.E. and Collins, P.L. (1998). The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication, *Journal of Virology* **72**: 1452-1461.

- Babiuk, L.A., Lawman, M.J.P. and Ohmann, H.B. (1988). Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease, *Advances in Virus Research* **35**: 219-242.
- Baker, J.C., Ames, T.R. and Markham R.J.F. (1985). Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle, *American Journal of Veterinary Research* **46**: 891-892.
- Baker, J.C., Frey, M.L. (1985). Bovine respiratory syncytial virus, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **1**: 259-275.
- Baker, J.C., Ames, T.R. and Markham R.J.F. (1986). Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd, *American Journal of Veterinary Research* **47**: 240-245.
- Barr, J., Chambers, P., Pringle, C.R. and Easton, A.J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses, *Journal of General Virology* **72**: 677-685.
- Bastien, N., Taylor, G., Thomas, L.H., Wyld, S.G., Simard, C. and Trudel, M. (1997). Immunization a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host, *Vaccine* **15**: 1385-1390.
- Bastien, N., Trudel, M. and Simard, C. (1999). Complete protection of mice from respiratory syncytial virus following mucosal delivery of synthetic peptide vaccines, *Vaccine* **17**: 832-836.
- Belak, S. and Pordany, A.B. (1993). Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology, *Veterinary Research Communications* **17**: 55-72.

- Belknap, E.B., Baker, J.C., Patterson, J.S., Walker, R.D., Haines, D.M. and Clark, E.G. (1991). The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves, *Journal of Infectious Disease* **163**: 470-476.
- Belknap, E.B., Ciszewski, D.K., Baker, J.C.(1995). Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in calves and lambs, *Journal of Veterinar Diagnostic.Investigation* **7**: 285-298.
- Bohlender, R.E., McCune, M.W. and Frey M.L. (1982). Bovine respiratory syncytial virus infection, *Modern Veterinary Practice* **63**: 613-618.
- Bourgeois, C., Bour, J.B., Aho, L.S. and Pothier, P. (1998). Prophylactic administration of a complementarity-determining region derived from a neutralizing monoclonal antibody is affective against respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice, *Journal of Virology* **72**: 807-810.
- Brodersen, B.W. and Kelling, C.L. (1998). Effect of concurrent experimently induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection on respiratory tract and enteric disease in calves, *American Journal Veterinary Research* **59**: 1423-1430.
- Bryson, D.G., McFerran, J.B., Ball, H.J. and Neill, S.D. (1978). Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves. (1) Epidemiological, clinical and microbiological findings, *The Veterinary Record* **103**: 485-489.
- Bryson, D.G., McNulty, M.S., Logan, E.F. and Cush, P.F. (1983). Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: clinical and pathologic findings, *American Journal Veterinary Research* **44**: 1648-1655.
- Buchholz, U.J., Finke, S. and Cozelmann, K.K. (1999). 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 acts as a functional BRSV promoter genome, *Journal of Virology* **73**: 251-259.

- Campalans, J. and Arns, C.W. (1997). Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil, *Virus Review & Research* **2**: 50-56.
- Cane, P.A., Matthews, D.A. and Pringle, C.R. (1991). Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory viruses, *Journal of General Virology* **72**: 2091-2096.
- Cannon, M.J. (1987). Microplate immunoperoxidase detection of infection respiratory syncytial virus in the lungs of infected mice, *Virological Methods* **16**: 293-301.
- Castleman, W.L., Lay, J.C., Dubovi, E.J. and Slauson, D.O. (1985). Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves: light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavage lung cells, *American Journal of Veterinary Research* **46**: 547-553.
- Chanock, R.M., Roizman, B. and Myers, R. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **66**: 281-290.
- Chanock, R.M., Kim, H.W., Vargosko, A.J., Deleva, A., Johnson, K.M., Cumming, C. and Parrot, R.H. (1961). Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchilitis, pneumonia, and minor respiratory disease in children, *The Journal of American Medical Association* **176**: 653.
- Chen, H., Wurm, T., Britton, P., Brooks, G. and Hiscox, J.A. (2002). Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell, *Journal of Virology* **76**: 5233-5250.
- Collins, J.K., Jensen, R., Smith, G.H., Flack, D.E., Kershen, R., Bennett, B.W., Jones, R.L. and Alexander, A.F. (1988). Association of a bovine respiratory syncytial virus with atypical

- interstitial pneumonia in feedlot cattle, *American Journal of Veterinary Research* **49**: 1045-1049.
- Collins, P.L., Hill, M.G. and Johnson, P.R. (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro, *Journal of General Virology* **71**: 3015-3020.
- Collins, P.L. and Mottet, G. (1993). Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus, *Journal of General Virology* **74**: 1445-1450.
- Collins, P.L., McIntosh, K. and Chanock, R.M. (1996). Respiratory syncytial virus, in B.N. Fields (ed), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, pp. 1313-1350.
- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. [www.cna.org.br]. Accessed July 15, 2003.
- Cook, P.M., Eglin, R.P. and Andrew, J.E. (1998). Pathogenesis of pneumovirus infections in mice: detection of pneumonia virus of mice and human respiratory syncytial virus mRNA in lungs of infected mice by *in situ* hybridization, *Journal of General Virology* **79**: 2411-2417.
- Costa, M., García, L., Yunus, A.S., Rockemann, D.D., Samal, S.K. and Cristina, J. (2000). Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay, *Veterinary Research* **31**: 241-246.
- Driemeier, D., Gomes, M.J.P., Moojen, V., Arns, C.W., Vogg, G., Kessler, L. and Costa, U.M. (1997). Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil, *Pesquisa Veterinária Brasileira* **17**: 77-81.

- Dubovi, E.J. (1993). Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective, *Veterinary Medicine* 888-893.
- Elazhary, M.A.S.Y., Galina, M., Roy, R.S., Fontaine, M. and Lamothe, P. (1980). Experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus (Quebec strain), *Canadian Journal of Comparative Medicine* **44**: 390-395.
- Elazhary, M.A.S.Y., Silim, A. and Dea, S. (1984). Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus-1, and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goats in Quebec, *American Journal of Veterinary Research* **45**: 1960-1962.
- Ellis, J.A., Belden, T.R., Haven, T.R. and Cavender, J. (1992). 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, *Veterinary Immunology and Immunopathology* **34**: 21-34.
- Ellis, J.A., Philibert, H., West, K., Clark, E., Martin, K. and Haines, D. (1996). Fatal pneumonia in adult dairy cattle associated with active infection with bovine respiratory syncytial virus, *Canadian Veterinary Journal* **37**: 103-105.
- Elvander, M. (1996). Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus, *The Veterinary Record* **138**: 101-105.
- Evans, J.E., Cane, P.A. and Pringle, C.R. (1996). Expression and characterization of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus, *Virus Research* **43**: 155-161.
- Florent, G. and Marneffe, C. (1986). Enzyme linked immunsorbent assay used to monitor serum antibodies to bovine respiratory disease viruses, *Veterinary Microbiology* **11**: 309-317.

- Flores, E.F., Weiblen, R., Medeiros, M., Botton, S.A., Irigoyen, L.F., Driemeier, D., Schuch, L.F. and Moraes, M. (2000). A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry, *Pesquisa Veterinária Brasileira* **20**: 139-143.
- Freymuth, F., Eugene, G., Vabret, A., Petitjean, J., Gennetay, E., Brouard, J., Duhamel, J.F. and Guillois, B. (1995). Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay, *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 3352-3355.
- Fulton, R.W., Confer, A.W. Burge, L.J., Perino, L.J., Doffay, J.M., Payton, M.E. and Mock, R.E. (1995). Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza-3 and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140, *Vaccine* **13**: 725-733.
- Furze, J., Wertz, G., Lerch, R. and Taylor, G. (1994). Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus, *Journal of General Virology* **75**: 363-370.
- Furze, J., Roberts, S.R., Wertz, G. and Taylor, G. (1997). Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strain share a high degree of genetic homogeneity, *Virology* **231**: 48-58.
- Gaddum, R.M., Cook, R.S., Furze, J.M., Ellis, S.A. and Taylor, G. (2003). Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8⁺ T lymphocytes, *Immunology* **108**: 220-229.
- Garcia, J. Garcia-Barreno, B., Vivo, A. and Melero, J.A. (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein, *Virology* **195**: 243-247.

- Garcia-Barreno, B., Delgado, T. and Melero, J.A. (1996). Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for cytoplasmic inclusions, *Journal of Virology* **70**: 801-808.
- Gershwin, L.J., Dungworth, D.L., Himes, S.R. and Friebertshauser, K.E. (1990). Immunoglobulin E responses and lung pathology resulting from aerosol exposure of calves to respiratory syncytial virus, *International Archives of Allergy and Immunology* **92**: 293-300.
- Gershwin, L.J., Woolums, A.R., Gunther, R.A., Anderson, M.L., Larochelle, D.R.B.G.A., Friebertshauser, K.E. and Singer R.S. (1998). A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus patophysiology, *Vaccine* **16**: 1225-1236.
- Gershwin, L.J., Gunther, R.A., Anderson, M.L., Woolums, A.R., McArthur-Vaughan, K., Randel, K.E., Boyle, G.A., Friebertshauser, K.E. and McInturff P.S. (2000). Bovine respiratory syncytial virus-specific IgE is associated with interleukin-2 and -4, and interferon- γ expression in pulmonary lymph of experimentally infected calves, *American Journal of Veterinary Research* **61**: 291-298.
- Gillette, K.G. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for serum antibody to bovine respiratory syncytial virus: comparison with complement fixation and neutralization test, *American Journal of Veterinary Research* **44**: 2251-2255.
- Gimenez, H.B., Chisholm, S., Dornan, J., Cash, P. (1996). Neutralizing and enhancing activities of human respiratory syncytial virus-specific antibodies, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **3**: 280-286.

- Gonçalves, I.P.D., Jost, H.C., Soglio, A.D., Simanke, A.T., Hotzel, I. and Moojen, V., (1993). Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil, *Ciência Rural* **23**: 389-390.
- Grubbs, S.T and Potgieter, L.N. (2001). Prevalence of ovine and bovine respiratory syncytial virus in cattle determined with a synthetic peptide-based immunoassay, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **13**: 128-132.
- Haines, D.M., Clark, E.G. and Chelack, B.J. (1989). The detection of bovine respiratory syncytial virus in formalin fixed bovine lung with commercially available monoclonal antibodies and avidin biotin complex immunohistochemistry, *Canadian Journal of Veterinary Research* **53**: 366-368.
- Hardy, R.W. and Wertz, G.W. (1998). The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances read through of intergenic junctions during viral transcription, *Journal of Virology* **72**: 520-526.
- Henkel, J.H., Aberle, S.W., Kundi, M. and Popow-Kraupp, T. (1997). Improved detection of respiratory syncytial virus in nasal aspirates by seminested RT-PCR, *Journal of Medical Virology* **53**: 366-371.
- Himes, S.R. and Gershwin, L.J. (1992). Bovine respiratory syncytial virus fusion protein gene: sequence analysis of cDNA and expression using a baculovirus vector, *Journal of General Virology* **73**: 1563-1567.
- Howard, C.J., Stott, E.J., Thomas, L.H., Gourlay, R.N. and Taylor G. (1987). Protection against respiratory disease in calves induced by vaccines containing respiratory syncytial virus, parainfluenza type 3 virus, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma dispar*, *The Veterinary Record* **121**: 372-376.

- Huang, Y.T. and Wertz, G.W. (1982). The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species, *Journal of Virology* **43**: 150-157.
- Inaba, Y, Tanaka, Y., Sato, K., Omori, T. and Matumoto, M. (1972). Bovine respiratory syncytial virus. Studies on an outbreak in Japan. 1968-1969, *Japanese Journal of Microbiology* **16**: 373-383.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
[www.ibge.gov.br/estatística/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria]. Accessed July 15, 2003.
- Ito, Y., Tanaka, Y., Inaba, Y. and Omori, T. (1973). Structure of bovine respiratory syncytial virus, *Archiv fur die Gesamte Virusforschung* **40**: 198-204.
- Jackson, M. and Stott, R. (1996). Different patterns of cytokine induction in cultures of respiratory syncytial (RS) virus-specific human TH cell lines following stimulation with RS virus and RS virus proteins, *Journal of Medical Virology* **49**: 161-169.
- Jacobs, J.W. and Edington, N. (1975). Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus, *Veterinary Science* **18**: 299-306.
- Johnson, J.L., Pommer, J.L., Hudson, D.B. and Doster, A.R. (1982a). Pulmonary emphysema in weaned calves: Laboratory diagnosis, *Bovine Proceedings* **14**: 122-126.
- Johnson, R.A., Prince, G.A., Suffin, S.C., Horswood, R.L. and Chanock, R.M. (1982b). Respiratory syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats, *Infection and Immunity* **37**: 369-373.
- Johnston, S.L.G. and Siegel, C.S. (1990). Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation cultures, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus, *Journal of Clinical Microbiology* **28**: 2394-2397.

- Keles, I., Woldehiwet, Z. and Murray, R.D. (1998). Replication of bovine respiratory syncytial virus in bovine and ovine peripheral blood lymphocytes and monocytes and monocytic cell lines, *Veterinary Microbiology* **61**: 237-248.
- Keister, D.M. (1981). Outbreak of respiratory disease in a feedlot in eastern Kansas, *Veterinary Medicine & Small Animal Clinician* **76**: 1039-1042.
- Kimman, T.G., Zimmer, G.M., Straver, P.J. and Leeuwen, P.W. (1986). Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples, *American Journal of Veterinary Research* **47**: 143-147.
- Kimman, T.G., Westenbrink, F., Schreuder, B.E. and Straver, P.J. (1987). Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection in calves with and without maternal antibodies, *Journal of Clinical Microbiology* **25**: 1097-1106.
- Kimman, T.G., Straver, P.J. and Zimmer, G.M. (1989). Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings, *American Journal of Veterinary Research* **50**: 684-693.
- Kimman, T.G. and Westenbrink, F. (1990). Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus, *Archives of Virology* **112**: 1-25.
- Kimman, T.G., Zimmer, G.M., Westenbrink, F., Mars, J., Leeuwen, E. and van Leeuwen, E. (1988). Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease, *Veterinary Research* **123**: 104-109.
- Kimpen, J.L., Rich G.A., Mohar, C.K. and Ogra, P.L. (1992). Mucosal T cell distribution during infection with respiratory syncytial virus, *Journal of Medical Virology* **36**: 172-179.

- Kubota, M., Fukuyama, S., Takamura, K., Izumida, A. and Kodama, K. (1992). Field trials on a live bovine respiratory syncytial virus vaccine in calves, *Journal of Veterinary Medicine Science* **54**: 957-962.
- Kumar, M., Behera, A.K., Matsuse, H., Lockey, R.F and Mohapatra, S.S. (2000). Intranasal IFN- γ gene transfer protects BALB/c mice against respiratory syncytial virus infection, *Vaccine* **18**: 558-567.
- Larsen, L.E., Uttenthal, Å., Arctander, P., Tjørnehøj, K., Viuff, B., Røntved, C., Rønsholt, L., Alexndersen, S. and Blixenkrone-Møller, M. (1998). Serological and genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) indicate 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 adaption and passages in cell culture or calves, *Veterinary Microbiology* **62**: 265-279.
- Larsen, L.E., Jensen, N.E., Tjørnehøj, K., Viuff, B. and Uttenthal, Å. (1999). Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle, *Journal of Vetetrinary Investigation* **11**: 416-422.
- Larsen, L.E. (2000). Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review, *Acta Veterinaria Scandinavica* **41**: 1-24.
- Lekeux, P. (1995). Bovine respiratory disease complex: An European perspective, *Bovine Practice* **29**: 71-75.
- Lerch, R.A., Anderson, K. and Wertz G.W. (1990). Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of

- bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus, *Journal of Virology* **64**: 5559-5569.
- Lerch, R.A., Anderson, K., Amann, V.L., Wertz, G.W. (1991). Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus, *Virology* **181**: 118-131.
- Mallipeddi, S.K., Samal, S.K. and Mohanty, S.B. (1990). Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus infected-cells, *Archives of Virology* **115**: 23-36.
- Mallipeddi, S.K. and Samal, S.K. (1992). Sequence comparison between the phosphoprotein mRNA of human and bovine respiratory syncytial viruses identifies a divergent domain in the predicted protein, *Journal of General Virology* **73**: 2441-2444.
- Mallipeddi, S.K. and Samal, S.K. (1993). Analysis of the ovine respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein gene defines a subgroup of ungulate RSV, *Journal General Virology* **74**: 2787-2791.
- Mars, M.H., Bruschke, C.J.M. and Oirschot J.T. (1999). Airborne transmission of BHV1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions, *Veterinary Microbiology* **66**: 197-207.
- Martin, H.T. (1983). Indirect haemagglutination test for the detection and assay of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, *The Veterinary Record* **113**: 290-293.
- Masot, A.J., Kelling, C.L., Lopez, O., Sur, J.H and Redondo, E. (2000). In situ hybridization detection of bovine respiratory syncytial virus in lung of experimentally infected lambs, *Veterinary Pathology* **37**: 618-625.

- Masson, C, Delverdier, M., Schelcher, F., Abella, N., Valarcher, J.F., Espinasse, J. and Cabanie, P. (1993). Mise en évidence immunopéroxydasique du virus respiratoire syncytial bovin (B.R.S.V.) sur coupes en paraffine de tissu pulmonaire bovin, *Revue de Médecine Vétérinaire* **144**: 99-104.
- Matheise, J.P., Walravens, K., Collard, A., Coppe, P. and Letesson, J.J. (1995). Antigenic analysis of F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition, *Archives of Virology* **140**: 993-1005.
- Matumoto, M. Inaba, Y., Kurogi, H., Sato, K., Omori, T., Goto, Y. and Hirose, O. (1974). Bovine respiratory syncytial virus: Host range in laboratory animals and cell cultures. *Archiv für die Gesamte Virusforschung* **44**: 280-290.
- McInnes, E., Collins, R.A. and Taylor, G. (1998). Cytokine expression in pulmonary and peripheral blood mononuclear cells from calves infected with bovine respiratory syncytial virus, *Research in Veterinary Science* **64**: 163-166.
- McNulty, M.S., Bryson, D.G. and Allan, G.M. (1983). Experimental respiratory syncytial virus infection pneumonia in young calves: microbiologic and immunofluorescent findings, *American Journal of Veterinary Research* **44**: 1656-1659.
- Mohanty, S.B., Davidson, J.P., Sharabrin, O.I. and Forst, S.M. (1981). Effect of vaccinal serum antibodies on bovine respiratory syncytial virus infection in calves, *American Journal Veterinary Research* **42**: 881-883.
- Morris, J.A., Blount, R.E. and Savage, R.E. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **92**: 544-549.

- Murphy, B.R., Prince, G.A., Lawrence, L.A., Croen, K.D. and Collins, P.L. (1990). Detection of respiratory syncytial virus (RSV) infected cell by in situ hybridization in the lungs of cotton rats immunized with formalin-inactivated virus or purified RSV F and G glycoproteins subunit vaccine and challenged with RSV, *Virus Research* **16**: 153-162.
- Nelson, L.D., Kelling, C.L. and Anderson, G.A. (1992). Antibody response of calves to immunoaffinity-purified bovine respiratory syncytial virus VP70 after vaccination and challenge exposure, *American Journal of Veterinary Research* **53**: 1315-1321.
- Norström, M., Pfeiffer, D.U. and Jarp, J. (2000). A space-time cluster investigation of an outbreak of acute respiratory disease in Norwegian cattle herds, *Preventive Veterinary Medicine* **47**: 107-119.
- Obando, C., Baule, C., Pedrique C., Veracierta, C., Belak, S., Merza, M. and Moreno-Lopez, J. (1999). Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela, *Acta Veterinaria Scandinavica* **40**: 253-262.
- Oberst, R.D., Hays, M.P., Hennessy, K.J., Stine, L.C., Evermann, J.F. and Kelling, C.L. (1993). Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridizations, *Journal of Clinical Microbiology* **31**: 1237-1240.
- Olchoway, T.W.J., Trevor, R., Ames, T.R. and Molitor, T.W. (1994). Interaction of bovine respiratory syncytial virus with bovine alveolar macrophages *in vivo*: effects of virus infection upon selected cell functions, *Canadian Journal of Veterinary Research* **58**: 42-48.
- Olmsted, R.A. and Collins, P.L. (1989). The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species, *Journal of Virology* **63**: 2019-2029.

- Paccaud, M.F. and Jacquire, C. (1970). A respiratory virus of bovine origin, *Archiv fur die Gesamte Virusforschung* **303**: 27-42.
- Pastey, M.K. and Samal, S.K. (1997). Analysis of respiratory syncytial virus envelope glycoprotein in cell fusion, *Journal of General Virology* **78**: 1885-1889.
- Paton, A.W., Paton, J.C., Lawrence, A.J., Goldwater, P.N. and Harris, R.J. (1992). Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification, *Journal of Clinical Microbiology* **30**: 901-904.
- Paton, D.J., Christiansen, K.H., Alenius, S., Cranwell, M.P., Pritchard, G.C. and Drew, T.W. (1998). Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales, *The Veterinary Record* **142**: 385-391.
- Peixoto, P.V., Mota, R.A., Brito, M.F., Corbellini, L.G., Driemeier, D. and Souza, M.I. (2000). Infecção natural pelo vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) no estado de Alagoas, *Pesquisa Veterinária Brasileira* **20**: 171-175.
- Pirie, H.M., Petrie, L., Allan, E.M. and Pringle, C.R. (1981). Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus, *The Veterinary Record* **109**: 87-97.
- Prince, G.A., Horswood, R.L., Camargo, E., Koenig, D. and Chanock, R.M. (1983). Mechanisms of immunity to respiratory syncytial virus in cotton rats, *Infection and Immunity* **42**: 81-87.
- Potgieter, N.D. and Aldridge, P.L. (1977). Use of indirect fluorescent antibody test in the detection of bovine respiratory syncytial virus antibodies in bovine serum. *American Journal of Veterinary Research* **38**: 1341-1343.
- Richardson, C., Hull, D., Greer, P., Hasel, K., Berkovich, A., Englund, G, Berllini, W., Rima, B. and Lazzarini, R. (1986). The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion

- protein of measles virus (Edmonton strain): A comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses, *Virology* **155**: 508-523.
- Richman, S.R., Pedreira, F.A. and Tauraso, N.M. (1971). Attempts to demonstrate haemagglutination and hemadsorption by respiratory syncytial virus, *Applied Microbiology* **21**: 1099-1100.
- Rowland, R.R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A. and Benfield D.A. (1999). The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence, *Virus Research* **64**: 1-12.
- Samal, S. and Zamora, M. (1991). Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus, *Journal of General Virology* **72**: 1715-1720.
- Schlender, J., Zimmer, G., Herrler, G. and Conzelmann, K. (2003). Respiratory Syncytial Virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection, *Journal of Virology* **77**: 4609-4616.
- Schreiber, P., Matheise, J.P., Dessy, F., Heimman, M., Letesson, J.J., Coppe, P. and Collard, A. (2000). High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine, *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **47**: 535-550.

- Schrijver, R.S., Kramps, J.A., Middel, W.G., Langedijk, J.P. and van Oirschot, J.T. (1995). Bovine respiratory syncytial virus replicates minimally in bovine alveolar macrophages, *Archives of Virology* **140**: 1905-1917.
- Schrijver, R.S., Daus, F., Kramps, J.A., Langedijk, J.P., Buijs, R., Middel, W.G., Taylor, G., Furze, J., Huyben, M.W. and van Oirschot, J.T. (1996a). Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strain detected in lung tissues, *Veterinary Microbiology* **53**: 253-260.
- Schrijver, R.S., Langedijk, J.P., van der Poel, W.H., Middel, W.G., Kramps, J.A. and van Oirschot, J.T. (1996b). Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **3**: 500-506.
- Schrijver, R.S., Langedijk, J.P., Keil, G.M., Middel, W.G., Maris-Veldhuis, M., van Oirschot, J.T. and Rijsewijk, F.A.M. (1997). Immunization of cattle with BHV 1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV, *Vaccine* **15**: 1908-1916.
- Sharma, A.K., Woldehiwet Z., (1991). Bovine respiratory syncytial virus: a review, *Veterinary Bulletin* **61**: 1117-1131.
- Sharma, A.K. and Woldehiwet, Z. (1996). Replication of bovine respiratory syncytial virus in ovine peripheral blood lymphocytes and monocytes in vitro, *Veterinary Microbiology* **48**: 125-134.
- Smith, M.H., Frey, M.L. and Dierks, R.E. (1975). Isolation, characterization, and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus, *Archives of Virology* **47**: 237-247.

- Sorden, S.D., Kerr, R.W. and Jansen, E.D. (2000). Interstitial pneumonia in feedlot cattle: concurrent lesions and lack of immunohistochemical evidence for bovine respiratory syncytial virus infection, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **12**: 510-517.
- Stewart, R.S. and Gershwin, L.J. (1989). Detection of IgE antibodies to bovine respiratory syncytial virus, *Veterinary Immunology and Immunopathology* **20**: 313-323.
- Stine, L.C., Hoppe, D.K. and Clayton, L.K. (1997). Sequence conservation in the attachment glycoproteins and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. *Veterinary Microbiology* **54**: 201-221.
- Stott, E.J., Thomas, L.H., Collins, A.P., Crouch, S., Jebbett, J., Smith, G.S., Luther, P.D. and Caswell, R. (1980). A survey of virus infections of the respiratory syncytial virus tract of cattle and their association with disease, *Journal of Hygiene* **85**: 257-270.
- Stott, E.J. and Taylor, G. (1985). Respiratory syncytial virus: brief review, *Archives of Virology* **84**: 1-52.
- Sullender, W.M., Mufson, M.A., Anderson, L.J. and Wertz, G.W. (1991). Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses, *Journal of General Virology* **65**: 5425-5434.
- Tantivanich, S., Suphanaranonda, K., Balachanda, K. and Anderson, R. (1995). Detection of respiratory syncytial virus from clinical specimens: comparison between reverse transcription polymerase chain reaction and tissue culture, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health* **26**: 685-688.
- Taylor, G., Stott, E.J., Hughes, M. and Collins, A.P. (1984). Respiratory syncytial virus in mice, *Infection and Immunity* **43**: 649-655.

- Taylor, G., Stott, E.J., and Thomas, L.H. (1987). Lymphocyte transformation of calves to respiratory syncytial virus, *Journal of Medical Virology* **22**: 333-344.
- Taylor, G., Thomas, L.H. and Stott, E.J. (1989). Effect of vaccination on cell populations in lung washes from calves after infection with respiratory syncytial virus, *Research in Veterinary Science* **47**: 231-235.
- Taylor, G., Thomas, L.H., Wyld, S.G., Furze, J., Sopp, P. and Howard, C.J. (1995). Role of T-lymphocytes subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves, *Journal of Virology* **69**: 6658-6664.
- Thomas, L.H., Stott, E.J., Collins, A.P. and Jebbet, J. (1984). Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus, *British Journal of Experimental Pathology* **65**: 19-28.
- Thomas, L.H., Cook, R.S., Howard, C.J., Gaddum, R.M. and Taylor, G. (1996). Influence of selective T-lymphocytes depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus, *Research in Veterinary Science* **61**: 38-44.
- Tjørnehøj, K., Uttenthal, Å., Viuff, B., Larsen, L.E., Røntved, C. and Rønsholt, L. (2003). An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves, *Research in Veterinary Science* **74**: 55-65.
- Uttenthal, A., Jensen, N.P. and Blom, J.Y. (1996). Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. *The Veterinary Record* **139**: 114-117.

- Uttenthal, A., Larsen L.E., Philipsen, J. S., Tjørnehøj K., Viuff, B., Nielsen and K.H., Nielsen, T.K. (2000). Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins, *Veterinary Microbiology* **76**: 329-341.
- Valarcher, J.F., Bourhy, H., Gelfi, J. and Schelcher, F. (1999). Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections, *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 1858-1862.
- Valarcher, J.F., Bourhy, H., Lavenu A., Bourges-Abella N., Roth M., Andreoletti O., Ave P. and Schelcher, F. (2001). Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus, *Virology* **291**: 55-67.
- van der Poel, W.H., Kramps, J.A., Middel, W.G., van Oirschot, J.T. and Brand, A. (1993). Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infection: a longitudinal epidemiological study in dairy herds, *Archives of Virology* **133**: 309-321.
- van der Poel, W.H.M., Mouritz, M.C.M. Nielsen, M., Frankena, K., van Oirschot, J.T. and Schukken, Y.H. (1995). Bovine respiratory syncytial virus reinfections and decreased milk yield in dairy cattle, *Veterinary Quarterly* **17**: 77-81.
- van der Poel, W.H., Schrijver, R.S., Middel, W.G., Kramps, J.A., Brand, A. and van Oirschot, J.T. (1996). Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passage bovine respiratory syncytial virus, *Veterinary Quarterly* **18**: 81-86.
- van der Poel, W.H., Langedijk J.P.M., Kramps J.A., Middel W.G., Brand, A. and van Oirschot, J.T. (1997). Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus, *Archives of Virology* **142**: 1681-1696.

- Vaux Peretz, F., Chapsal, J.M. and Meignier, B. (1992). Comparison of ability of formalin-inactivated respiratory syncytial virus, immunopurified F, G and N protein and cell lysate to enhance pulmonary changes in Balb/c mice, *Vaccine* **10**: 113-118.
- Verhoeff, J. and van Nieuwstadt, A.P.K.M.I. (1984). Prevention of bovine respiratory syncytial virus infection and clinical disease by vaccination, *The Veterinary Record* **115**: 488-492.
- Vilcek, S., Elvander, M., Ballagi-Pordany, A. and Belak, S. (1994) Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples, *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 2225-2231.
- Viuff, B., Uttenthal, A., Tegtmeier, C. and Alexandersen, S. (1996). Site of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridization, *Veterinary Pathology* **33**: 383-390.
- Wellinver, R., Wong, D. and Sun, M. (1981). The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection, *New England Journal of Medicine* **305**: 841-847.
- West, K., Borgdan, J., Hamel, A., Nayar, G., Morley, P.S., Haines, D.M. and Ellis, J.A. (1998). A comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens, *Canadian Journal of Veterinary Research* **62**: 245-250.
- West, K., Petrie, L., Haines, D.M., Konoby, C., Clark, E.G. Martin, K. and Ellis, J.A. (1999). The effect of fomalin-inativated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves, *Vaccine* **17**: 809-820.
- Westenbrink, F. and Kimman, T.G. (1987). Immunoglobulin M-especific enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections, *American Journal of Veterinary Research* **48**: 1132-1137.

Westenbrink, F., Brinkhof, J.M.A., Straver, P.J., Quak, J. and De Leeuw, P.W. (1985).

Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralization tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infection, *Research in Veterinary Science* **38**: 334-340.

Woldemeskel, M., Kebede, E., Yigezu, L. and Potgieter, L.N. (2000). Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from Ethiopia, *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **107**: 454-466.

Zamora, M. and Samal, S.K. (1992). Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from na F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that on human respiratory syncytial virus, *Journal of General Virology* **73**: 737-741.

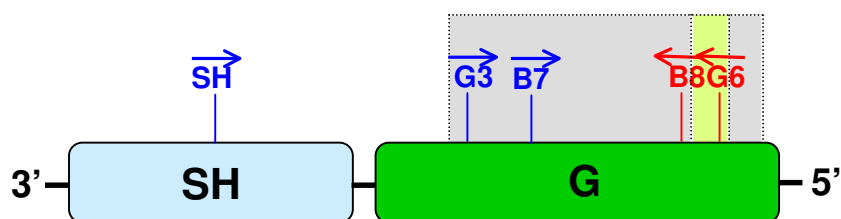
12. ANEXO 1

Descrição dos achados de necropsia encontrados no bovino B1 infectado pelo BRSV.

Bovino 1 (B1): O animal foi trazido ao CPVDF 45 dias antes do aparecimento dos sinais clínicos incluído em um lote de terneiros destinados à produção de vacina contra tristeza parasitária bovina. O animal era soronegativo para BHV-1, BVDV e BLV conforme testes realizados antes da compra; o status sorológico para o BRSV era desconhecido. O animal, então com 1 ano de idade, foi inoculado com *Babesia bigemina* sobrevivendo sem maiores problemas ao desafio e doação de sangue para a vacina. Por volta de 20 dias após a extração do sangue para vacina, o animal começou a apresentar anorexia, apatia, febre passageira, corrimento nasal seromucoso abundante, dispnéia grave e extertores traqueais, recumbência e intensa dor à palpação da região ventral do tórax e região ventral mais cranial do abdômen, próximo ao apêndice xifóide. À auscultação podiam ser notados sibilos na região dorsal da área pulmonar. Instituiu-se terapia de reposição de fluidos e antibióticos de amplo espectro; todavia, o quadro agravou-se e no 5º dia após o início dos sinais clínicos decidiu-se pela eutanásia do animal. Na necropsia pode ser observada pneumonia intersticial multifocal, especialmente nos lobos craniais e região dorsal dos lobos caudais; abaulamento dos bordos do pulmão e enfisema subpleural grave e intersticial acentuado estava disseminado no parênquima pulmonar acompanhado ainda de espessamento marcado dos septos interlobulares. Havia ainda espessamento dos anéis traqueais, pleurite não-catarral e acentuada hipertrofia do miocárdio do ventrículo direito. No exame histopatológico pôde-se observar células sinciciais em grande quantidade localizadas principalmente nos bordos dos lóbulos pulmonares, presentes nos alvéolos e bronquíolos. Havia ainda hipertrofia da camada muscular peribronquiolar e focos de alterações inflamatórias mononucleares com áreas focais de infiltração por eosinófilos.

13. ANEXO 2

Primer	Sequence	Protein	Position	Direction
G3	CCA CCC TAG CAA TGA TAA CCT CTT GAC	G	145-169	Forward
B7A	CAT CAA TCC AAA GCA CCA CAC TGT C	G	281-305	Forward
B8	GCT AGT TCT GTG GTG GAT TGT TGT C	G	651-627	Reverse
G6	AAG AGA GGA TGC CTT GCT GCT GTG G	G	747-726	Reverse
SH1	GGA TCC GAT CAA TCA ATA ACA AGA GC	SH	272-298	Forward



Porção extracelular



Região variável (*mucina-like*)



Região central conservada

Figure 1: Sequência, proteínas relacionadas, posição e direção dos *primers* utilizados nos seqüenciamento do isolado B1.

14. ANEXO 3

```

Bl:          137  cacagagcacaaccacaaaatcaactcacacatcaacccaaagcaccacactgtcccaacc 196
|||||
391-2:       288  cacagagcacaactacaaatcaactcacacatcaattcaaagcaccacactgtcccaact 347
G protein 92   T E H N Y K S T H T S I Q S T T L S Q L

Bl:          197  accaaacatagacaccactagtggaactacatacggtcacccaatcaacagaacccaaaa 256
|||
391-2:       348  actaaacatagacactactagaggaattacatatggtcactcaaccaacgaaacccaaaa 407
G protein 112  L N I D T T R G I T Y G H S T N E T Q N

Bl:          257  cagaaaaatcaaaagccaatctactccacttgccacccgaaaactaccaatcaacccact 316
|||||
391-2:       408  cagaaaaatcaaaagccaatccactctaccgcgccaccagaaaaccaccaatcaatccatc 467
G protein 132  R K I K G Q S T L P A T R K P P I N P S

Bl:          317  ggaaagcaamnnnnngaaaaccaccaagaccacaacaactcccaaacactccctcatgt 376
|||
391-2:       468  gggaagcatccccctgaaaaccatcaagaccacaacaacttccaaacactccctcatgt 527
G protein 152  G S I P P E N H Q D H N N F Q T L P Y V

Bl:          377  gccctgcagcacatgcgaaggcaatcctgctgttcaccactctgccaaatcgggctgga 436
|||
391-2:       528  gccttgcagtacatgtgaaggtaatcttgcttgcttatcactctgccatattgagacgga 587
G protein 172  P C S T C E G N L A C L S L C H I E T E

Bl:          437  gagagcaccaagcagagctcccacaatcaccc 468
|||||
391-2:       588  gagagcaccaagcagagcccccataatcaccc 619
G protein 192  R A P S R A P T I T

Score = 352 bits (183), Expect = 5e-94
Identities = 280/332 (84%)
Strand = Plus / Plus

```

Figure 1: Alinhamento de seqüências entre um fragmento do genoma da proteína G do isolado B1 e similar fragmento do isolado 391-2 (Lerch et al., 1990) representante do subgrupo A, mostrando 84% de homologia.

B1:	137	cacagagcacaccacacaatcaactcacacatcaacccaaagcaccacactgtcccaacc	196
RB 94:	273	cacagagcacaaactacaatcaactcacacatcaatccaaagcaccacactgtcccaact	332
G protein	92	T E H N Y K S T H T S I Q S T T L S Q L	
B1:	197	accaaacatagacaccactagtggaaactacatacggtcacccaatcaacagaacccaaaa	256
RB 94:	333	actaaacatagacaccactagaggaaactacatacagtcacccaaccgatgaaacccaaaa	392
G protein	112	L N I D T T R G T T Y S H P T D E T Q N	
B1:	257	cagaaaaatcaaaagccaatctactccacttgccacccgaaaaactaccaatcaaccact	316
RB 94:	393	cagaaaaatcaaaagccaatccactctaccggccaccagacaaccaccaatcaaccatc	452
G protein	132	R K I K S Q S T L P A T R Q P P I N P S	
B1:	317	ggaaagcaanmnnnnngaaaaccaccaagaccacacaactcccaaactccctcatgt	376
RB 94:	453	gggaagtaacccccctgaaaaccaccaagaccacacaactcccaaactccctcatgt	512
G protein	152	G S N P P E N H Q D H N N S Q T L P Y V	
B1:	377	gccttgagcacatgcgaaggcaatcctgcctgttcaccactctgccaatcgggctgga	436
RB 94:	513	gccttgagtagatgtgaaggtaatcttgcttgcctcatcactctgccaatcgggctgga	572
G protein	172	P C S T C E G N L A C S S L C Q I G L E	
B1:	437	gagagcaccaagcagagctcccacaatcacc	468
RB 94:	573	gagagcaccaagcagagccccacaatcacc	604
G protein	192	R A P S R A P T I T	
Score = 421 bits (219), Expect = e-115			
Identities = 292/332 (87%)			
Strand = Plus / Plus			

Figure 2: Alinhamento de seqüências entre um fragmento do genoma da proteína G do isolado B1 e similar fragmento do isolado RB 94 (Prozzi et al., 1997) representante do subgrupo AB, mostrando 87% de homologia.

```

B1:      129 ctacttcccacagagcacaccacaatatcaactcacacatcaacccaaagcaccacactg 188
          |||
220-60:  271 ctacttcccacagagcacaccacaatatcaactcacacatcaacccaaagcaccacactg 330
G protein 89 L L P T E H N H K S T H T S T Q S T T L

B1:      189 tcccaaccaccaaacatagacaccactagtggaaactacatacgggcacccaatcaacaga 248
          |||
220-60:  331 tcccaaccaccaaacatagacaccactagtggaaactacatacgggcacccaatcaacaga 390
G protein 109 S Q P P N I D T T S G T T Y G H P I N R

B1:      249 acccaaacagaaaaatcaaaagccaatctactccacttgccacccgaaaactaccaatc 308
          |||
220-60:  391 acccaaacagaaaaatcaaaagccaatctactccacttgccacccgaaaactaccaatc 450
G protein 129 T Q N R K I K S Q S T P L A T R K L P I

B1:      309 aaccactggaaagcaamnnnnmgaaaaccaccaagaccacaacaactcccaaacactc 368
          |||
220-60:  451 aaccactggaaagcaacccccccgaaaaccaccaagaccacaacaactcccaaacactc 510
G protein 149 N P L E S N P P E N H Q D H N N S Q T L

B1:      369 cctcatgtgcctgcagcacatgcgaaggcaatcctgcctgttcaccactctgccaaatc 428
          |||
220-60:  511 cctcatgtgcctgcagcacatgcgaaggcaatcctgcctgttcaccactctgccaaatc 570
G protein 169 P H V P C S T C E G N P A C S P L C Q I

B1:      429 gggctggagagagcaccaagcagagctcccacaatcaccc 468
          |||
220-60:  571 gggctggagagagcaccaagcagagctcccacaatcaccc 610
G protein 189 G L E R A P S R A P T I T

Score = 627 bits (326), Expect = e-177
Identities = 333/340 (97%)
Strand = Plus / Plus

```

Figure 3: Alinhamento de seqüências entre um fragmento do genoma da proteína G do isolado B1 e similar fragmento do isolado 220-60 (Furze et al., 1990) representante do subgrupo B, mostrando 97% de homologia.

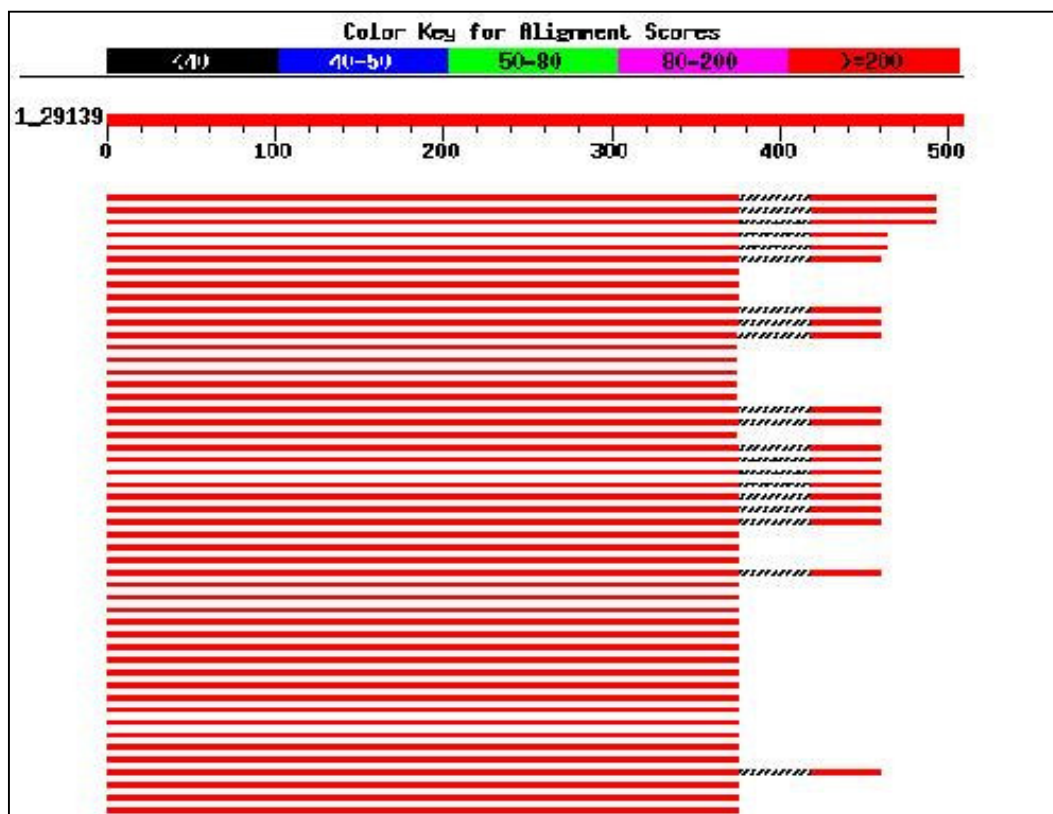


Figura 4: Alinhamento de parte da sequência do gene G do isolado B1 com seqüências de similar fragmento de isolados de BRSV depositados no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança. Em ordem, os números de acesso dos 20 isolados depositados no GeneBank com os quais a análise encontrou maior similaridade foram: [Y11205](#), [AF295544](#), [U57823](#), [Y08718](#), [Y08716](#), [U92101](#), [U55251](#), [AF248589](#), [U92109](#), [U92098](#), [U24713](#), [U92114](#), [U92111](#), [U92105](#), [U92100](#), [U92099](#), [U55252](#), [Y08719](#), [U24715](#), [AF248590](#).

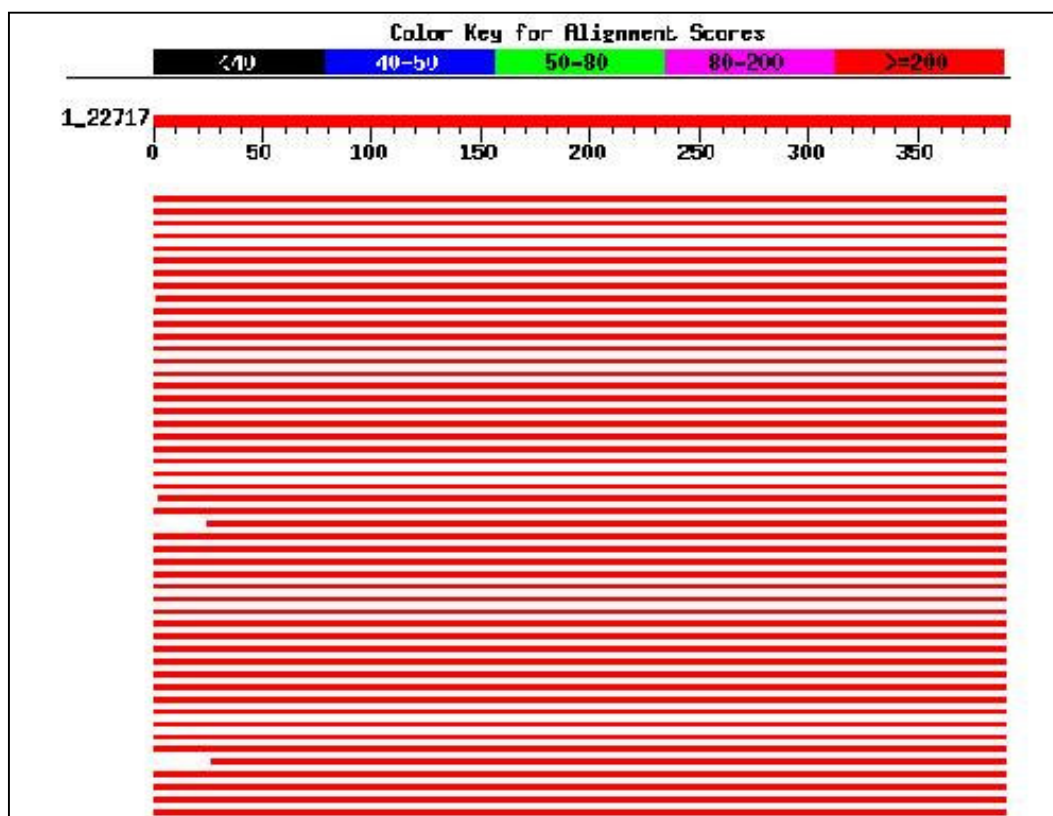


Figura 5: Alinhamento de parte da sequência do gene F do isolado B1 com sequências de similar fragmento de isolados de BRSV depositados no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança. Em ordem, os números de acesso dos 20 isolados depositados no GeneBank com os quais a análise encontrou maior similaridade foram: [Y11205](#), [AF295544](#), [U57823](#), [Y08718](#), [Y08716](#), [U92101](#), [AF248589](#), [U92109](#), [U24713](#), [AF188578](#), [U92114](#), [U92111](#), [U92105](#), [U92100](#), [U92099](#), [U92098](#), [U24715](#), [U24714](#), [U33539](#), [L27802](#).

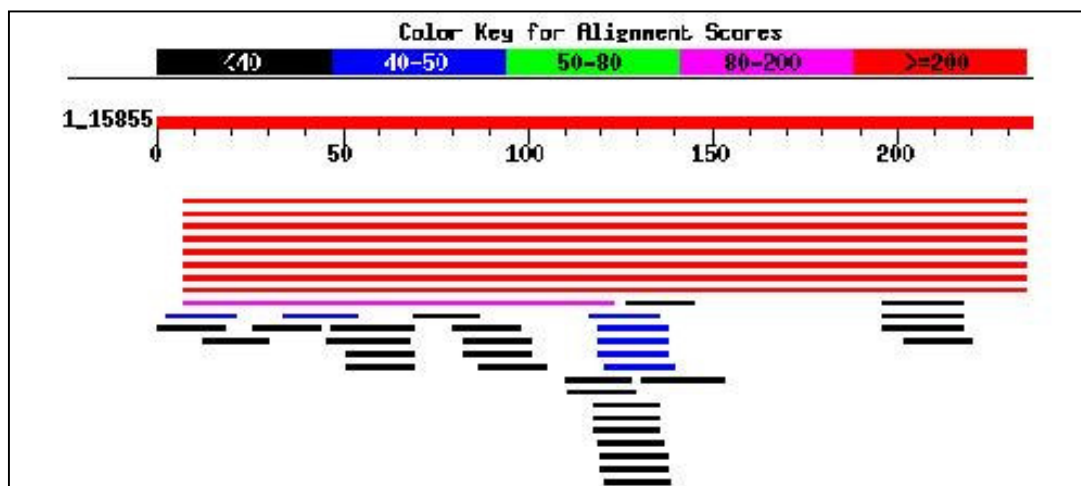


Figura 6: Alinhamento de parte da seqüência do gene F do isolado B1 com seqüências de similar fragmento de isolados de BRSV depositados no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança. Em ordem, os números de acesso dos 20 isolados depositados no GeneBank com os quais a análise encontrou maior similaridade foram: [AF295544](#), [M82816](#), [AF295543](#), [AF092942](#), [D00953](#), [AF124561](#), [Y17970](#), [M58350](#), [AF334398](#), [AE015939](#), [AC124902](#), [AL121928](#), [AC092316](#), [AL359853](#), [AC079168](#), [BX088722](#), [AY149472](#), [AC027687](#), [AC007906](#), [XM_286329](#).

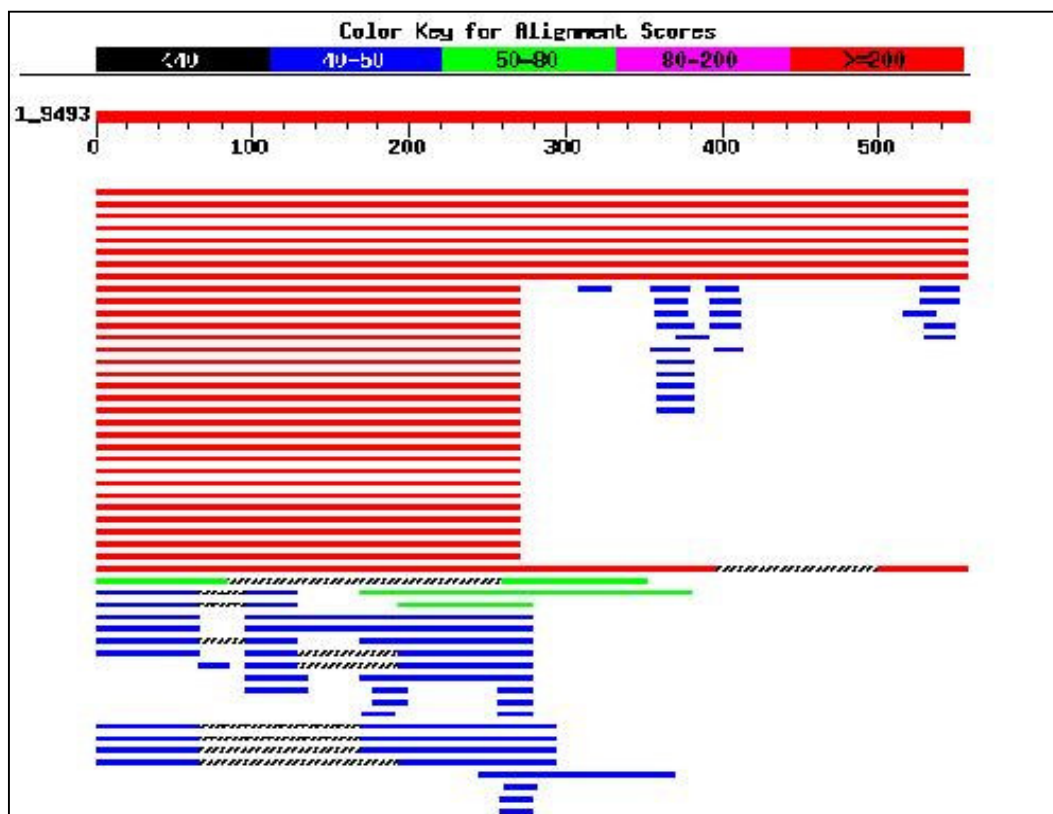


Figura 7: Alinhamento de parte da sequência do gene F do isolado B1 com sequências de similar fragmento de isolados de BRSV depositadas no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança. Em ordem, os números de acesso dos 20 isolados depositados no GeneBank com os quais a análise encontrou maior similaridade foram: [AF295544](#), [M82816](#), [D00953](#), [AF295543](#), [AF092942](#), [Y17970](#), [AF124561](#), [M58350](#), [AF188576](#), [AF188574](#), [AF188573](#), [AF188575](#), [AF188572](#), [AF188571](#), [AF188569](#), [AF188566](#), [AF188562](#), [AF188570](#), [AF188568](#), [AF188567](#).

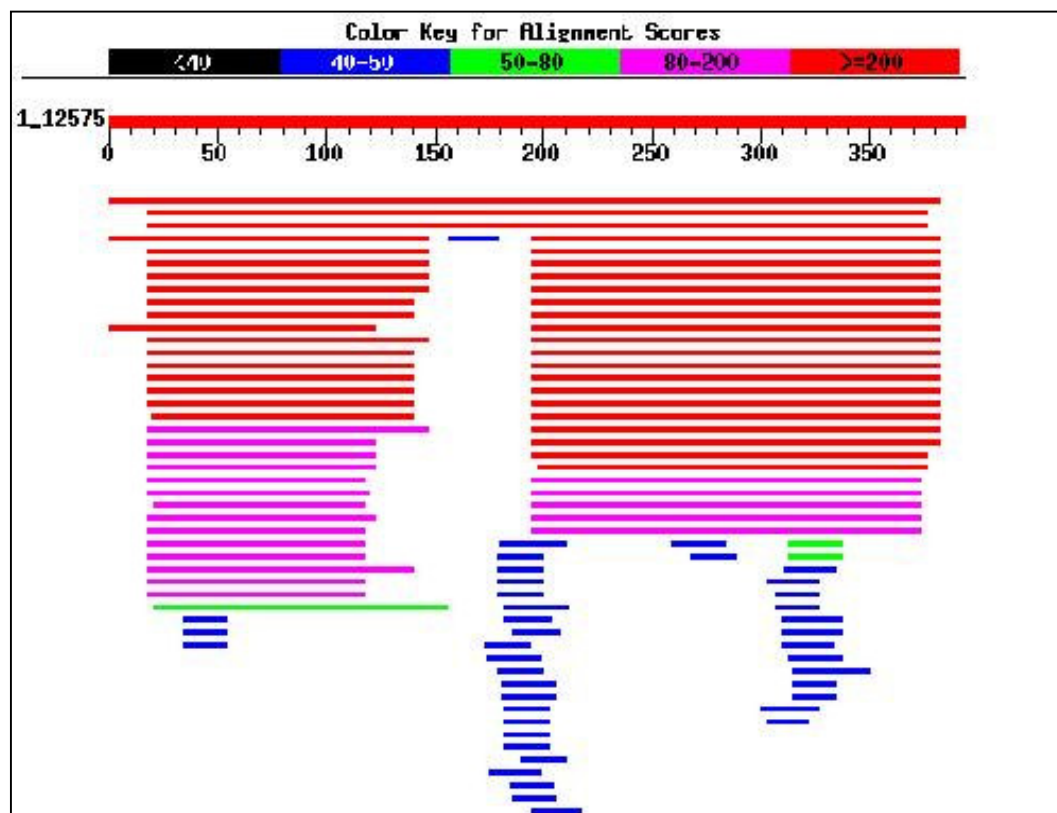


Figura 8: Alinhamento de parte da sequência do gene SH do isolado B1 com sequências de similar fragmento de isolados de BRSV depositados no GeneBank. A cor vermelha indica a maior semelhança. Em ordem, os números de acesso dos 20 isolados depositados no GeneBank com os quais a análise encontrou maior similaridade foram: [AF295544](#), [AF295543](#), [AF092942](#), [D01012](#), [AF248562](#), [AF248561](#), [AF248579](#), [AF248563](#), [AF248581](#), [AF248578](#), [AF248568](#), [AF248567](#), [AF248566](#), [AF248565](#), [AF248582](#), [AF248572](#), [AF248571](#), [AF248570](#), [AF248569](#), [AF248564](#).

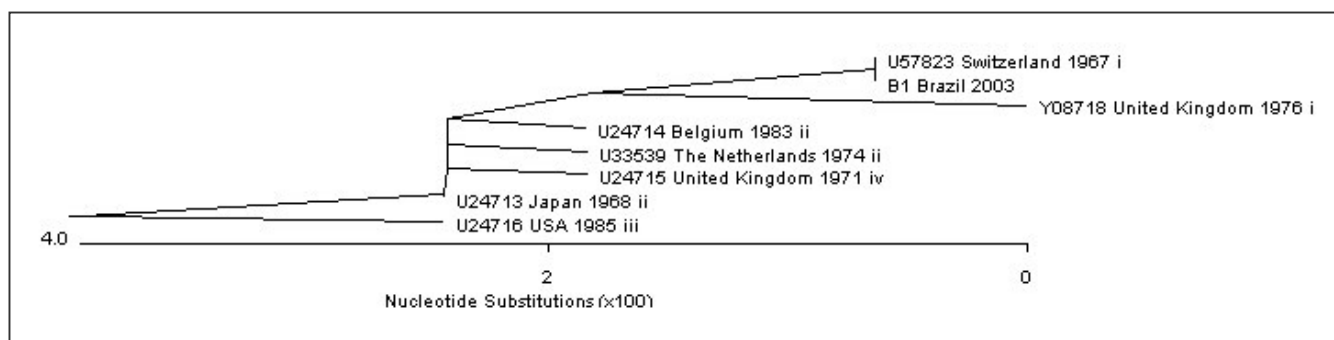


Figura 9: Análise filogenética utilizando o método Megaline do programa Star DNA baseada no gene que codifica para parte da porção extracelular da proteína G e na comparação com sete isolados de BRSV de diferentes origens depositados no GeneBank.