



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Helena Gallicchio Domingues

***“DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) EM AMOSTRAS
BRASILEIRAS”***

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.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

2005

Trabalho executado no Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e no Laboratório de Virologia no *The Danish Institute for Food and Veterinary Research* (DFVF), Copenhague, Dinamarca.

Campinas, 05 de julho de 2005.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Assinatura

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Assinatura

Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto

Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Assinatura

**“Não há fim, não há começo, o
que existe é uma infinita
paixão pela vida”.**

(Federico Fellini)

Aos meus queridos pais,

Nei e Diana,

dedico este trabalho.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns, pela orientação, crédito e apoio durante toda a elaboração desta tese e pela oportunidade e confiança em mim depositadas.

À FAPESP, pelo imprescindível auxílio financeiro prestado, incluindo a concessão de uma bolsa de doutorado para execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, pelas valiosas sugestões oferecidas, paciência e amizade mesmo nos momentos em que outros assuntos importantes consumiam seu tempo e energia.

Ao Prof. Dr. Lars Erik Larsen, do Instituto Dinamarquês de Veterinária (DFVF), por permitir que parte deste experimento fosse realizado sob sua supervisão, em que sua experiência, conselhos, grande receptividade e imensa paciência foram indispensáveis para a finalização deste estudo. Agradeço ainda pela valiosa ajuda prestada mesmo a distância e pela amizade que se formou após esse período.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB da UNICAMP que, por sua amizade e ensinamentos, contribuíram para a realização desta tese.

Aos meus pais, que souberam incentivar, valorizar e respeitar meu propósito de concluir esta dissertação, além do apoio “MÃEnutenção” e da “FAPAI”.

À minha amada irmã Manoela e querido cunhado Marco, pelo estímulo, amor, carinho, amizade, convivência, enfim por tudo que sempre fizeram por mim e principalmente por meus sobrinhos lindos.

Aos meus sobrinhos, Isabela “Peti” coração e Gabriel “Titi” bibico, por existirem e serem mais um motivo de alegria em minha vida.

À minha irmã Cláudia, pelo amor, incentivo e amizade.

Ao meu herói e amado avô, José Antônio, e minha estimada avó Dinah, *in memorian*, pelo carinho, companhia e por sempre acreditarem em mim: amo vocês. Vô, rumo aos 100!

À minha querida Didi, que sempre foi minha mãe, pai, confidente, amiga, enfim, acho que não existe uma única palavra para descrever o que ela significa para mim.

À supersecretária Caroline, que em nenhum momento me deixou desamparada e sempre esteve pronta para resolver qualquer problema.

Aos meus "pustipais", Paulo e Cláudia, e às minhas "pusti-irmãs", Mariana e Stefânia, pelo amor, carinho, amizade, compartilhando momentos alegres e tristes, sendo minha família aqui em Campinas, ou seja, tendo assumido o real sentido desta palavra.

Ao meu "irmão dinamarquês" e grande amigo Ivan, por todo o carinho, importantes correções, apoio, estímulo, amizade, mesmo após minha estadia na Dinamarca, e se tornando parte de minha família.

À família Martins, Marco e Virgínia, pelo carinho e pelos agradáveis momentos de convívio.

À minha grande amiga Lelê que, desde que nos conhecemos, esteve ali "para o que der e vier", sempre com muito bom humor e alto astral e sendo, com muito orgulho, mais uma integrante da família Domingues.

Aos amigos da Negosvaldo, JB, Celso, Sazima, Áurea, César e Gustavinho, pela grande amizade, momentos de muita alegria e descontração durante minha estadia em Campinas. "Podres", não perderemos contato nunca.

À amiga Gi que, mesmo em momentos de "altos e baixos" e muita correria, esteve ali sempre disposta a ouvir e ajudar.

Aos amiguinhos do Chess, especialmente aos do "DC" Krikor, Felipe, Elisa, Willian, PH e

Anike, grandes amigos que proporcionaram momentos *outside age* de desopilação total.

Ao amigo Ninê, que faz parte daquele círculo de amizades *outside age*, cuja amizade e convivência foram e sempre serão indispensáveis.

Às amigas do Lab, Lia, Luciane, Jacqueline e Zizi, que mesmo à distância sempre se fizeram presentes de forma amigável e carinhosa.

Aos amigos e colegas de laboratório, Regina, Fernando, Rodrigo, Helena, Renata e Caio que, além de amigos, foram sempre muito profissionais, dando conselhos, idéias e indubitável ajuda durante todo o processo de desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e grandes colegas de laboratório do DFVF, Hue, Mette, Mai, Franciszka, Bitten, Flemming e Britta, cuja receptividade e paciência durante o período de execução do trabalho na Dinamarca geraram uma amizade que dura até hoje e que foram indispensáveis para este trabalho se tornar possível.

Aos funcionários Geneci e Paula, pela valiosa contribuição e colaboração na fase experimental deste trabalho.

A todos os funcionários do Instituto de Biologia, em especial a Ana, Lourdes e Lúcia, que de alguma forma contribuíram e participaram deste trabalho.

Ao pessoal do NTAV-UCS, Maurício, Gelson, Ana Rita, Gabi, Paulinho, Beth e Solange, por terem sido maravilhosos comigo sempre “resolvendo probleminhas” para mim e me aceitando como parte do grupo do NTAV em Caxias do Sul no momento de conclusão da parte escrita deste trabalho.

Aos meus amigos de Caxias do Sul, que nunca me deixaram sozinha e que ocupam um lugar especial na minha vida.

Enfim, a todos que sempre acreditaram em mim e que de alguma maneira acreditaram neste trabalho. MUITÍSSIMO obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1.HISTÓRICO	17
2.2. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO BRSV	18
2.3. MULTIPLICAÇÃO VIRAL	19
2.4. GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DOS BRSV	21
2.4.1. <i>Proteína F:</i>	21
2.4.2. <i>Proteína G:</i>	22
2.4.3. <i>Proteína SH:</i>	24
2.5. SUBGRUPOS DE BRSV.....	25
2.6 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES POR BRSV	26
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DE BRSV	30
4.1.1. <i>Cultivos celulares</i>	30
4.1.2. <i>Amostras-padrão de vírus</i>	30
4.1.3. <i>Amostras de Bovinos</i>	31
4.1.4. <i>Técnica de RT-PCR</i>	32
4.2. ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA BRSV EM CULTIVOS DE CÉLULAS	37
4.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	38
4.3.1. <i>Análise por Enzimas de Restrição (REA)</i>	38
4.3.2. <i>Análise dos Amplicons por Seqüenciamento Genômico</i>	40
5. RESULTADOS	41
5.1. DETECÇÃO DO BRSV	41
5.1.1. <i>Teste de RT-PCR</i>	41
5.2. ISOLAMENTO VIRAL	42
5.3. ANÁLISE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (REA)	44
5.3.1 <i>Adaptação da técnica</i>	44
5.3.2 <i>Análise por REA das amostras detectadas</i>	46
5.3.2. <i>Resultados da análise por seqüenciamento.</i>	48
6. DISCUSSÃO	53
7.CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS	59

RESUMO

No presente estudo, técnicas para a detecção do vírus respiratório sincicial bovino, BRSV, visando ao diagnóstico e caracterização molecular deste patógeno, foram adaptadas e aplicadas em amostras coletadas de animais sem levar em consideração a presença de sinais e sintomas clínicos característicos de infecções causadas por esse agente. Foi coletado um total de 278 amostras de secreções nasais e fragmentos pulmonares de rebanhos bovinos provenientes dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Utilizando a técnica de RT-PCR detectou-se a presença de BRSV em sete amostras, duas de secreções nasais e cinco de fragmentos de pulmões. As amostras positivas foram submetidas ao isolamento viral e um novo isolado, denominado BRSV-108-BR, foi obtido após nove passagens em cultivos de células. Os fragmentos de 603 pb correspondentes ao segmento genômico da proteína G das amostras de BRSV em estudo, obtidos com a técnica de RT-PCR, foram submetidos à análise por enzimas de restrição-REA e ao seqüenciamento, visando sua caracterização molecular. Com a técnica de REA foram identificadas variações genéticas entre as amostras de BRSV detectadas, sugestivas de que duas amostras pertenciam ao subgrupo AB e cinco, ao subgrupo B de BRSV. Entretanto, a análise filogenética realizada pelo alinhamento das seqüências obtidas com seqüências disponíveis no GeneBank revelou que todas as amostras detectadas pertenciam ao subgrupo B. Com este estudo sugerimos que a técnica de REA possui utilidade limitada para classificação de BRSV em subgrupos, podendo ser utilizada como um instrumento prévio na caracterização das amostras, sendo, todavia, estritamente necessária uma análise baseada no seqüenciamento do gene da proteína G para caracterização de BRSV em subgrupos.

ABSTRACT

In this study techniques to detect the bovine respiratory syncytial virus (BRSV), aiming at the diagnosis and molecular characterization of this pathogen, were adapted and applied in samples collected from animals regardless of the presence of clinical signs and symptoms characteristic of infections caused by this agent. A total of 278 samples of nasal secretion and pulmonary fragments of bovine herds from the States of São Paulo and Rio Grande do Sul. By using the RT-PCR technique it was detected the presence of BRSV in seven samples, two of the nasal secretion samples, and five of the pulmonary fragments samples. The positive samples were submitted to viral isolation, and a new isolate named BRSV-108-BR was obtained after nine passages in cell cultivations. 603 pb fragments corresponding to the genomic segment of the G protein of the BRSV samples in study and obtained through the RT-PCR technique were submitted to restriction enzyme analysis (REA) and sequencing, aiming at their molecular characterization. With the REA technique, genetic variations were identified among the detected BRSV samples, suggesting that two samples belonged to the BSRV AB subgroup and five belonged to the BRSV B subgroup. However, phylogenetic analysis carried out by sequence alignment obtained with sequences available at the GeneBank revealed that all samples detected belonged to subgroup B. With this study we suggest that the REA technique to classify BRSV subgroups has a limited usefulness, serving only as a prior instrument to characterize the samples. Nevertheless, a subsequent analysis based on G protein sequencing is extremely necessary to characterize samples in one of the different BRSV existing subgroups.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 185,5 milhões de animais, totalizando 15% dos bovinos do globo, sendo seguido pela China (135 milhões) e Estados Unidos (97 milhões). A pecuária bovina é um dos segmentos mais importantes do setor agropecuário brasileiro, pois além de ser uma atividade econômica presente em todo o território nacional, é uma exploração tipicamente desbravadora que emprega mais de sete milhões de pessoas. Assim, poder-se-ia esperar que o Brasil ocupasse um lugar de grande destaque internacional em termos de produção animal em sistemas pastoris. Entretanto, isso não ocorre devido a grandes perdas de animais (<http://www.paginarural.com.br/>).

Dentre as principais causas de enfermidades de bovinos, não apenas no Brasil bem como no mundo, evidenciam-se as doenças de origem respiratória (Baker *et al.*, 1986; Van der Poel *et al.*, 1993, Paton *et al.*, 1998; Obando *et al.*, 1999; Norström *et al.*, 2000; Uttenthal *et al.*, 2000; Woldemeskel *et al.*, 2000). Essas podem ser classificadas em dois grupos, sendo o primeiro constituído por doenças causadas por um único agente e o outro representado pela síndrome respiratória bovina, que é multifatorial (Lekeux, 1995; Larsen, 2000). Embora várias espécies de microrganismos possam estar associadas a desordens respiratórias, o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) é o agente mais comumente encontrado em animais que apresentam as formas severas da doença e é um importante iniciador da síndrome respiratória, especialmente em bezerros (Lekeux, 1995; Baker *et al.*, 1986, Samal & Zamora, 1991; Ames, 1993; Collins *et al.*, 1996a; Van der Poel *et al.*, 1995).

O BRSV é um pneumovírus pertencente à família *Paramixoviridae*, ordem *Mononegavirales*, muito semelhante ao vírus respiratório sincicial humano (HRSV) e aos vírus respiratórios sinciciais de ovinos e caprinos (ORSV e CRSV) (Murphy *et al.*, 1995; Trudel *et al.*, 1989).

Muitos aspectos da patogênese, epidemiologia e imunologia relacionados às infecções por BRSV permanecem indefinidos. Clinicamente, o vírus causa uma típica pneumonia que gera alterações hiperêmicas na cavidade nasal, traquéia e brônquios dos animais infectados (Kimman *et al.*, 1988; Jacobs & Edington, 1975), além de exsudato mucopurulento, hemorragia e enfisema (Belknap *et al.*, 1995; Woolums *et al.*, 1999). Os sintomas clínicos da enfermidade em estágio inicial são semelhantes àqueles de outras doenças respiratórias, tais como aumento de temperatura, apatia e inapetência. Todavia, quando a doença apresenta sintomatologia mais severa, pode estar associada a infecções secundárias, tornando bastante difícil o diagnóstico diferencial (Kimman *et al.*, 1988; Sharma & Woldehiwet, 1990; Larsen, 2000). Os achados histopatológicos revelam bronquite, bronquiolite, peribronquiolite e pneumonia intersticial difusa, entre outros. Entretanto, o principal achado é a presença de células sinciciais nos epitélios bronquiolar e alveolar (Bryson *et al.*, 1983; Sharma & Woldehiwet, 1990; Baker & Frey, 1985; Driemeier *et al.*, 1997).

As taxas de morbidade da infecção pelo BRSV variam dependendo da exposição prévia ou não dos animais ao vírus. As formas mais graves geralmente são apresentadas por bezerros de 2 a 5 meses de idade, com taxas de mortalidade entre 5 a 10% dos animais infectados (Inaba *et al.*, 1972; Bryson *et al.*, 1978). No entanto, a infecção subclínica pelo BRSV é um evento comum, uma vez que são altos os percentuais de animais com títulos de

anticorpos específicos contra o BRSV. Recentes estudos sorológicos em rebanhos bovinos brasileiros de diferentes regiões geográficas demonstraram uma alta prevalência de anticorpos específicos contra BRSV (Campalans & Arns, 1997; Domingues *et al.*, 2002). Contudo, a detecção do BRSV ainda é um desafio devido às dificuldades inerentes ao isolamento do vírus dadas principalmente pela labilidade da partícula viral (Dubovi, 1993).

O diagnóstico laboratorial do BRSV é feito por métodos de isolamento do vírus, detecção de antígenos virais, testes sorológicos e histopatológicos. O método clássico utilizado para diagnosticar infecções causadas por BRSV é o isolamento em cultivo celular, método este demorado e restrito para amostras recém coletadas (Dubovi, 1993). Métodos de detecção em amostras clínicas como as técnicas imunoenzimáticas como ELISA, imunofluorescência e imunohistoquímica também vêm sendo amplamente aplicadas com bons resultados (Lokensgard *et al.*, 1992; Grubbs & Potgieter, 2001).

Atualmente, técnicas moleculares para o diagnóstico de BRSV como o RT-PCR, com base na detecção do ácido nucléico viral, têm mostrado ser métodos promissores (Furze *et al.*, 1994).

Apesar dos achados sorológicos obtidos no Brasil por Campalans & Arns (1997), que demonstraram a circulação do BRSV nos rebanhos bovinos brasileiros, não existem estudos conclusivos que definam pelos subgrupos circulantes. Ainda, técnicas moleculares como a RT-PCR, que são mais sensíveis e específicas para a caracterização dos isolados virais, não foram empregadas de maneira sistemática. Assim, no presente estudo foram utilizadas técnicas moleculares para a detecção e caracterização molecular de BRSV em amostras de bovinos, com e sem sintomatologia clínica, na tentativa de se obter o perfil das amostras de BRSV que acometem o rebanho bovino brasileiro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

Em 1955 foi detectado um episódio de doença respiratória em uma colônia de chimpanzés de laboratório em Washington. O novo agente foi isolado e previamente denominado como “agente da coriza dos chimpanzés” (Morris *et al.*, 1956). No mesmo ano, partículas virais antigênica e morfológicamente idênticas foram isoladas de duas crianças com sintomatologia respiratória (Chanock *et al.*, 1957). Esse agente foi então denominado vírus respiratório sincicial humano (HRSV), em virtude do efeito citopatogênico (formação de sincícios) produzido em culturas celulares (Chanock & Finberg, 1957). Subseqüentemente, o vírus foi detectado em inúmeras ocasiões na década de 60, estabelecendo assim a importância do HRSV como agente de doença respiratória em crianças de todo o mundo (Chanock *et al.*, 1961; Beem *et al.*, 1961).

Posteriormente, anticorpos neutralizantes contra HRSV foram detectados em soros de bovinos (Dogget *et al.*, 1968), sugerindo que bovinos poderiam ser hospedeiros susceptíveis a um vírus antigenicamente relacionado ao HRSV. De fato, em 1967 e 1968 foi isolado no Japão um vírus semelhante ao HRSV de um surto de doença respiratória em bovinos (Inaba *et al.*, 1970), em 1969 na Bélgica (Wellemans & Leunen, 1971), em 1971 no Reino Unido (Jacobs & Edington, 1971), em 1971/72 nos Estados Unidos (Rosenquist, 1974; Smith *et al.*, 1975), em 1974/75 na Dinamarca (Bitsch *et al.*, 1976), em 1976 na Noruega (Oeedegaard & Krogsrud, 1977) e em 1979 na Suécia (Moreno Lopez, 1979).

No Brasil, o vírus foi detectado pela primeira vez por Gonçalves *et al.* (1993) por

imunofluorescência em cortes de tecidos congelados obtidos de pulmões de bezerros do estado do Rio Grande do Sul. O isolamento e a identificação viral foram obtidos por Arns *et al.* (2003) a partir de 33 amostras de secreções nasotraqueais de bezerros com sintomas respiratórios procedentes do Rio Grande do Sul que foram replicadas por passagens sucessivas em linhagens celulares, culminando com o isolamento de uma amostra, denominada BRSV-25-BR.

Desde então este agente tem sido associado a doenças respiratórias em bovinos de todo o mundo e têm-se acumulado evidências de que o BRSV é um importante patógeno para bovinos (Baker *et al.*, 1986).

2.2. Estrutura e Organização genômica do BRSV

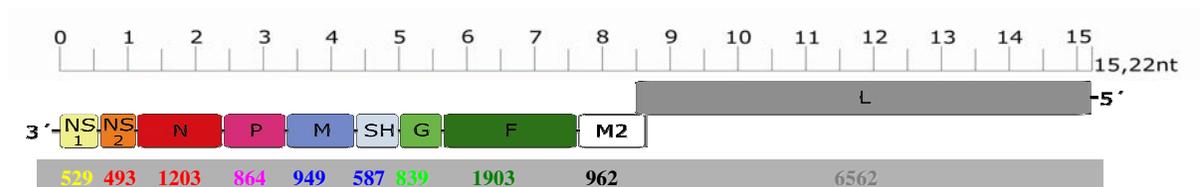


Figura 1. Estrutura genômica do vírus respiratório sincicial bovino-BRSV.

A ordem *Mononegavirales*, na qual está incluído o BRSV, compreende partículas virais dotadas de RNA fita simples (“mono”) de polaridade negativa (“nega”), com nucleocapsídeo helicoidal, ligado a um envelope viral derivado da membrana celular, dotado ainda de duas ou três glicoproteínas virais incorporadas (Murphy *et al.*, 1995). Os

vírions são pleomórficos, com tamanho variável (partícula esférica: 80-350nm, partículas filamentosas: 60-100nm e até 1µm de comprimento) (Collins, 1994; Murphy *et al.*, 1995). O tamanho do genoma do BRSV é de aproximadamente 15.000 nucleotídeos, o qual codifica 10 polipeptídeos no sentido 3' [NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L] 5' (Figura 1), cada um codificado por um único mRNA (Huang *et al.*, 1985; Mallipeddi *et al.*, 1990). Como todos os membros desta ordem, o RNA do BRSV é fortemente associado à nucleoproteína (N) a qual, juntamente com a fosfoproteína (P) e a polimerase viral (L), forma o complexo ribonucleoproteico (RNP). As duas maiores glicoproteínas de membrana viral são a proteína de ligação G e a proteína de fusão F. Outra glicoproteína de membrana, a SH (*small hydrophobic*) de função ainda não definida; todavia, parece aumentar a eficiência de fusão entre membranas promovida pela proteína F e, portanto, contribuir para a formação de sincícios (Pastey & Samal, 1997).

O BRSV está estreitamente relacionado com o HRSV e com os vírus respiratórios sinciciais de ovinos (ORSV) e caprinos (CRSV) (Trudel *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1995).

2.3. Multiplicação Viral

Presume-se que a proteína de ligação do BRSV, a glicoproteína G, entre em contato com um ou mais receptores celulares, fazendo a adsorção do vírus à superfície celular. Após, a proteína de fusão viral (F) medeia a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, onde a replicação viral é realizada sem qualquer envolvimento do núcleo celular (Collins *et al.*, 1996b).

O RNA genômico é molde tanto para a síntese de mRNA, o qual é subseqüentemente traduzido em novas proteínas virais, como para a síntese dos antigenomas. Os antigenomas, por sua vez, servem como molde para a síntese de um novo RNA genômico. O genoma viral é transcrito em 10 mRNA por uma RNA polimerase RNA-dependente de origem viral e cada mRNA codifica uma única proteína (Banerjee *et al.*, 1991).

A polimerase viral (proteína L) liga-se ao RNA genômico na região líder 3' do genoma e inicia a transcrição. O transcrito de RNA líder é liberado e o primeiro sinal de iniciação do gene é dado, e o primeiro mRNA, codificante para a proteína NS1, é transcrito. A transcrição do mRNA para a proteína NS1 termina quando a polimerase alcança o sinal de finalização, e a polimerase continua ao longo do genoma até o próximo sinal de iniciação, onde a transcrição do mRNA da próxima janela de leitura (*Open Read Frame - ORF*) se inicia (no caso a proteína NS2). A transcrição sequencial das ORFs codificantes para todas as proteínas dos vírus respiratórios sinciciais (RSV) se dá da mesma forma. O mecanismo pelo qual a polimerase transita do sinal de finalização do gene da proteína M2 para o sinal de iniciação do gene L é desconhecido. Foi sugerido que a polimerase “saltaria” para o início do gene L, encontrando assim um novo sinal de iniciação (Collins *et al.*, 1996b). Os vírions maduros são liberados da célula infectada por brotamento. Entretanto, os vírus permanecem altamente associados à célula e, 90% ou mais das partículas virais, falham ao se desligarem da superfície celular (Collins, 1991), o que contribuiria para a pequena quantidade de vírus infecciosos recuperados em cultivos celulares (Wechsler *et al.*, 1985; Furze *et al.*, 1994).

2.4. Glicoproteínas de superfície dos BRSV

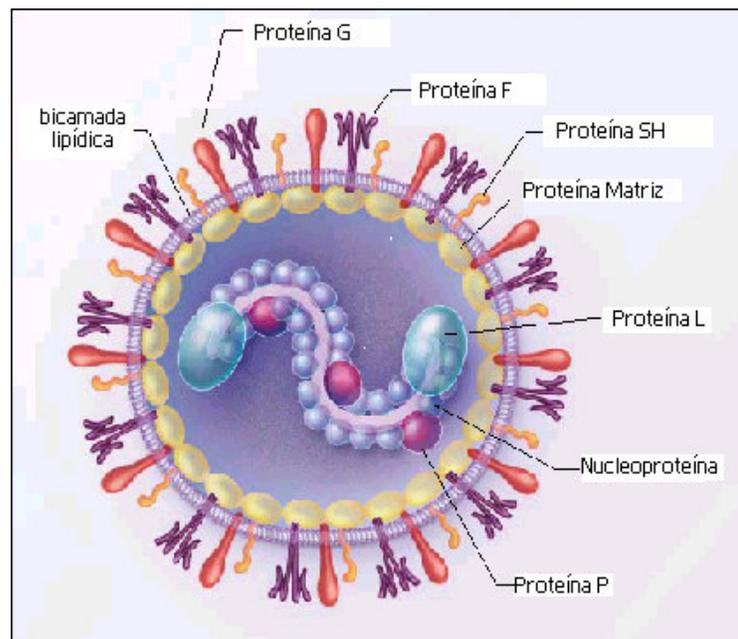


Figura 2 – Modelo da partícula do vírus respiratório sincicial (Hall, 2001).

2.4.1. Proteína F:

A proteína F está ancorada ao envelope na superfície dos vírions (Figura 2) e está diretamente envolvida com a fusão do vírus à membrana da célula-alvo e na formação do sincício em células infectadas (Matheise *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1986). Sincícios, células gigantes multinucleadas, são formados pela fusão das membranas das células infectadas com a célula vizinha, mediados pela proteína F, possivelmente em conjunção com as proteínas G e SH (Heminway *et al.*, 1994).

A proteína F do BRSV é distinta da proteína homóloga do HRSV, com apenas 71,5% de identidade nas seqüências de nucleotídeos e 81-84% de identidade para os aminoácidos. A proteína F de BRSV possui poucos sítios de glicosilação quando comparada ao HRSV (Lerch *et al.*, 1991; Himes & Gershwin, 1992). Entretanto, esta proteína é altamente conservada entre cepas de BRSV, com identidade de aminoácidos entre 97 e 99% (Himes & Gershwin, 1992). O mRNA correspondente à proteína F do BRSV compreende 1899 nucleotídeos excluindo a cauda poli (A). O gene contém uma única ORF que se inicia no nucleotídeo 14 e se estende até o códon de terminação no nucleotídeo 1736. Esta ORF prediz um polipeptídeo de 574 aminoácidos, com um peso molecular estimado em 63,8 kDa. O mesmo é traduzido como um precursor inativo da proteína F0, o qual é clivado mais tarde em duas proteínas, F1 e F2, sendo o sítio mais variável a região que precede o sítio de clivagem (Lerch *et al.*, 1991).

O transporte da proteína F para a superfície celular foi demonstrado como dependente da glicosilação da subunidade F1, enquanto a deleção dos sítios de glicosilação na subunidade F2 não causa nenhum impacto (Pastey & Samal, 1997).

2.4.2. Proteína G:

A proteína G (Figura 2) dos RSV permite a ligação entre o vírus e a célula hospedeira. O receptor celular para a proteína G não é conhecido, mas, provavelmente, pode ser encontrado em abundância na superfície da célula alvo, uma vez que parece não

ocorrer a saturação dos sítios das ligações da proteína G à membrana celular (Walsh *et al.*, 1984; Walter & Downing, 1993).

A proteína G de BRSV consiste em 257 aminoácidos e contém um domínio externo, um domínio transmembrana e um domínio interno ou domínio citoplasmático (Wertz *et al.*, 1985; Lerch *et al.*, 1990). Várias são as características que a tornam uma proteína viral distinta. A primeira é que ela não está relacionada com as proteínas de ligação dos outros vírus da família *Paramixoviridae*, tais como as proteínas hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) dos vírus da parainfluenza, ou à proteína hemaglutinina dos morbilivírus (Collins, 1991), não possuindo atividades homólogas de hemaglutinação e neuraminidase. Além disso, a proteína G tem uma alta concentração de carboidratos, cerca de 60%, quando comparada à proteína F, que apresenta aproximadamente 7% (Collins, 1994; McIntosh & Chanock, 1985). Outra característica importante é que 80% dos carboidratos da proteína G tem glicosilação semelhante à mucina (Collins, 1991), facilitando assim penetração dos RSV no muco que cobre o epitélio da mucosa e, subsequentemente, facilitam a ligação às células epiteliais (Lambert, 1988; Wertz *et al.*, 1989; Langedijk *et al.*, 1996; Sullender & Wertz, 1991; Walter & Downing, 1993).

A proteína G apresenta uma maior variação antigênica do que a proteína F, que é considerada antigenicamente conservada entre as cepas de HRSV e BRSV (Furze *et al.*, 1994; Sullender & Wertz, 1991). A variabilidade da proteína G entre os subgrupos dos vírus respiratórios (RSV) está mais concentrada no ectodomínio, enquanto os domínios citoplasmáticos e transmembrana são mais conservados (Johnson *et al.*, 1987). A alta quantidade de carboidratos pode explicar porque a proteína G aparece como menos imunogênica do que a proteína F (Ward *et al.*, 1983). Anticorpos protetores contra a

proteína G provavelmente funcionam inibindo a ligação dos vírus à célula (Levine *et al.*, 1987), mas muitos dos anticorpos monoclonais caracterizados direcionados contra a proteína G não possuem atividade neutralizante *in vitro* (Orvell *et al.*, 1987).

2.4.3. Proteína SH:

Existe uma terceira glicoproteína associada ao envelope viral dos RSV (Figura 2), a proteína SH (ou 1A), que só é encontrada nos membros da subfamília *Pneumovirinae*, nos vírus símio 5 (SV5) e nos vírus da caxumba. Essa é uma proteína integral de membrana com a porção C-terminal voltada para o lado extracelular da membrana (Collins & Mottet, 1993). Vários trabalhos examinando células infectadas com RSV revelaram várias formas da proteína SH (Anderson & Clement, 1992; Olmsted & Collins, 1989). Até o presente não se conhece a real função desta proteína, entretanto, parece colaborar com a proteína F mediando a fusão entre as membranas celular e viral. Acredita-se também que ela contribua para a formação de sincícios (Larsen, 2000). Entretanto, foi mostrado que a deleção do gene SH de partículas de SV5 não levou a uma alteração fenotípica notável He *et al.*, (1998) e Takeuchi *et al.* (1996) relataram a ocorrência de uma amostra selvagem do vírus da caxumba que não expressava a proteína SH.

2.5. Subgrupos de BRSV

Os BRSV têm muitas similaridades com os HRSV quanto à organização genômica, estrutura viral e antigenicidade (Collins, 1991). As cepas de HRSV são atualmente classificadas em subgrupos A e B dependendo da reatividade com anticorpos monoclonais (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985; Collins, 1994; Lerch *et al.*, 1990; Furze *et al.*, 1994). A proteína G desses subgrupos, ou subtipos, tem apenas 53% de identidade em seus aminoácidos (Johnson *et al.*, 1987), e a patogenicidade, assim como a antigenicidade das cepas, parece depender do subgrupo específico (McConnochie *et al.*, 1990).

Enquanto as proteínas F-, M-, N- e P- de BRSV reagem com monoclonais desenvolvidos contra os subgrupos A e B de HRSV, a proteína G não reage frente a nenhum monoclonal desenvolvido para HRSV (Baker *et al.*, 1992). Baseados nestes achados, Lerch *et al.* (1990) e Baker *et al.* (1992) concluíram que o BRSV deva ser considerado como um membro independente do gênero *Pneumovirus*.

Em 1992, Baker *et al.* descreveram diferenças antigênicas entre as cepas de BRSV, que foram divididas em dois diferentes subgrupos: A e B. Atualmente, o BRSV pode ser classificado em três diferentes subgrupos denominados A, B e AB ou Intermediário. Esta caracterização foi definida por pesquisas da reatividade a vários grupos de anticorpos monoclonais contra a proteína G (Furze *et al.*, 1994; Schrijver *et al.*, 1996; Prozzi *et al.*, 1997; Furze *et al.*, 1997; Larsen *et al.*, 1998), pela caracterização dos tamanhos moleculares das proteínas P e F (Baker *et al.*, 1992; Furze *et al.*, 1994) e pela análise de seqüências da proteína G (Larsen *et al.*, 1998; Furze *et al.* 1997). Entretanto, a importância biológica da existência de diferentes subgrupos de BRSV não é conhecida. Para HRSV foi sugerido que

cepas do subgrupo A são mais virulentas que as pertencentes ao subgrupo B (Kimman *et al.*, 1987).

Estudos de Schrijver *et al.* (1997) sugerem que tanto cepas do subgrupo A quanto AB podem ser altamente virulentas, embora não tenham verificado a presença de outros patógenos nos animais pesquisados.

2.6 Diagnóstico de infecções por BRSV

Vários são os métodos que podem ser utilizados para a detecção de BRSV. O método clássico para o diagnóstico de infecções provocadas por BRSV é o isolamento viral. No entanto, este método é demorado, laborioso e muitas vezes ineficiente quando não empregado imediatamente após a coleta das amostras (Pirie *et al.*, 1981; Thomas & Stott, 1981) e por muitas vezes requer várias passagens do material suspeito em cultura celular antes do efeito citopático viral se tornar evidente (Potgieter & Aldridge, 1977). Portanto, um diagnóstico baseado nesse procedimento ainda é um desafio (Dubovi, 1993).

Técnicas de diagnósticos do tipo ELISA para a detecção de antígenos virais têm sido desenvolvidas como alternativa para a detecção do BRSV (Lokensgard *et al.*, 1992; Grubbs *et al.*, 2001). Entretanto, a confiabilidade e exatidão do diagnóstico obtido por esta técnica dependem diretamente dos reagentes utilizados, sendo que a sensibilidade e a especificidade variam com a qualidade dos anticorpos anti-BRSV utilizados. 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; Osório *et al.*, 1989; Lokesgard *et al.*, 1992; Masot *et al.*, 1993; Schrijver *et al.*, 1996; Brodersen & Kelling, 1999; Flores *et al.*, 2000; Peixoto *et al.*, 2000).

Atualmente tem-se buscado a adaptação de técnicas moleculares para a detecção e identificação do BRSV com base na detecção do ácido nucléico viral (Belak & Pordany, 1993; Larsen *et al.*, 1999) sendo a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) a mais empregada (Paton *et al.*, 1992; Oberst *et al.*, 1993; Vilcek *et al.*, 1994; Tantivanich *et al.*, 1995; Viuff *et al.*, 1996; Henkel *et al.*, 1997; West *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 1999; Valarcher *et al.*, 1999; Masot *et al.*, 2000).

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

As possibilidades de se encontrar vírus em amostras clínicas são escassas devido aos baixos títulos e à dificuldade da replicação em sistemas celulares sensíveis. De acordo com Furze *et al.* (1997), a RT-PCR tem-se mostrado um excelente método de diagnóstico para BRSV, sendo citada como vantajosa sua boa sensibilidade e especificidade, pois possibilitam a produção de inúmeras cópias a partir de uma cópia viral na amostra, sem necessitar de formas viáveis da partícula viral para obtenção de resultados positivos.

As amostras utilizadas para a pesquisa do patógeno pela técnica de RT-PCR podem ser fragmentos de pulmões (que somente podem ser obtidas de animais mortos), lavagem pulmonar e/ou traqueal e ainda a utilização de secreções coletadas por suabes nasais, cuja

grande vantagem é a coleta de amostras de animais vivos. É importante ressaltar que os melhores animais para se coletar as amostras são aqueles que apresentarem os sinais clínicos mais brandos, muito embora não se deva descartar a amostragem de animais com sintomas mais avançados, haja vista que a carga viral atinge seu pico 2 a 3 dias após o início dos sinais clínicos severos (Belknap *et al.*, 1995).

A realização da RT-PCR, além de ser um bom teste para o diagnóstico de BRSV (Larsen *et al.*, 1999), permite ainda que técnicas para análise da variabilidade entre as amostras de BRSV tais como as técnicas de análise com enzimas de restrição (REA) e seqüenciamento sejam aplicadas.

A análise com enzimas de restrição é uma técnica essencial utilizada na biologia molecular para a manipulação do DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Como essas enzimas reconhecem seqüências específicas de quatro a oito nucleotídeos, variações na seqüência do DNA analisado podem ser detectadas através de eletroforese horizontal em gel de agarose, obtendo-se um perfil de restrição enzimática, com bandas em diferentes posições, de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados (Sambrook *et al.*, 1989; Zaha, 2000). A obtenção de diferenças nos perfis de restrição enzimática, como ganho ou perda de sítios de restrição ou, ainda, diferenças no tamanho dos fragmentos gerados e, assim, podem determinar diferentes cepas do patógeno pesquisado (Madigan *et al.*, 2000).

3. OBJETIVOS

Em face do exposto, no que se refere à ausência de informações com relação à classificação das amostras de BRSV circulantes no Brasil, o presente estudo teve como objetivo detectar e caracterizar molecularmente amostras de BRSV circulantes nos rebanhos bovinos brasileiros. Para tanto, as técnicas de RT-PCR, isolamento viral, cortes com enzimas de restrição e seqüenciamento foram aplicadas em amostras provenientes de secreções nasais e fragmentos pulmonares de rebanhos bovinos com e sem sintomatologia clínica, na tentativa de se obter o perfil das amostras de BRSV que acometem o rebanho bovino de nosso país.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Métodos utilizados para a detecção de BRSV

4.1.1. Cultivos celulares

Foram utilizadas linhagens contínuas de células *Chicken Embryo Related* (CER) cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning), na concentração de $1,3 \times 10^5$ células/mL (concentração inicial) em meio essencial mínimo Eagle (MEM-Cultilab®) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma Chemical Company®), por 24 horas a 37°C. Foram utilizadas também células da linhagem finita *Bovine Turbinate* (BT) na concentração de $2,0 \times 10^5$ cel/ml, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Lars Erik Larsen, do Instituto Dinamarquês de Veterinária. Essas células foram cultivadas e mantidas com os mesmos parâmetros descritos acima para a linhagem celular CER.

4.1.2 Amostras-padrão de vírus

Foram mantidas e utilizadas amostras pertencentes aos diferentes subgrupos de BRSV. Como representante do subgrupo A, o isolado BRSV Lehmkuhl 375 (Lehmkuhl *et al.*, 1979), proveniente dos Estados Unidos e adquirido através da American Type Culture Collection (ATCC) Catalogue of Animal Viruses & Antisera, Chlamydiae & Rickettsiae; 6th edition, 1990. A amostra BRSV-25-BR isolada no Laboratório de Virologia

Animal/IB/Unicamp foi utilizada como representante do subgrupo B (Arns *et al.*, 2003), e o isolado cedido pelo Dr. Lars Erik Larsen (BRSV-9402022), como representante do subgrupo AB (Larsen *et al.*, 1998). Todos os isolados foram propagados utilizando-se as linhagens celulares descritas no item 4.1.1, onde o meio de crescimento dos cultivos celulares foi eliminado e cada garrafa foi infectada com 0,01 a 0,1 DICC₅₀/mL da amostra viral a ser propagada. Após duas horas de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi eliminado e foram adicionados 25 mL de MEM por garrafa. A incubação foi realizada a 37°C, e as culturas foram observadas diariamente em microscópio invertido (Axiovert 100, Carl Zeiss) para observação do efeito citopático (ECP) característico do BRSV, isto é, formação de sincício e arredondamento celular (Buys *et al.*, 1989).

4.1.3. Amostras de Bovinos

Foram obtidas e analisadas 278 amostras provenientes de bovinos, dentre as quais 277 foram colhidas de animais adultos sem sintomatologia clínica da doença. Um total de 209 amostras foi colhido de secreções nasais de animais vivos de rebanhos localizados no estado de São Paulo e acondicionadas em tubos de 1,5mL livres de RNAses e DNAses, contendo 500µL de tiocianato de guanidina-fenol (TRIzol®, Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, USA). As 69 amostras restantes foram colhidas no Estado do Rio Grande do Sul, sendo 68 amostras provenientes de animais de abatedouros sem sintomatologia de doença respiratória, dentre essas amostras, 34 provinham de secreções nasais colhidas previamente ao abate e, 34 fragmentos de pulmões dos mesmos animais; e uma amostra de pulmão colhida de animal adulto com sintomatologia clínica de doença

respiratória. Essas amostras foram armazenadas em tubos de 1,5mL e 50 mL respectivamente e mantidas a -70°C até o momento do uso.

4.1.4.Técnica de RT-PCR

As 278 amostras obtidas, bem como sobrenadantes de cultivos celulares dos isolados BRSV-25-BR, BRSV-375, BRSV-9402022 e de células não infectadas (controle negativo), foram analisadas pela técnica de RT-PCR, seguindo método descrito por Almeida *et al.* (2004).

4.1.4.1. Extração do RNA Viral

O RNA do material de campo, bem como as amostras isoladas e os controles de células, foi submetido à extração viral utilizando-se diferentes protocolos, os quais variaram conforme a amostra utilizada.

4.1.4.1.1. Obtenção do RNA total

4.1.4.1.1.1. Amostras de cultivos de células

As monocamadas celulares não infectadas, bem como as infectadas com os diferentes isolados mencionados no item 4.1.1 que apresentavam aproximadamente 20% de

ECP, foram raspadas utilizando-se Cell Scraper II (Costar®), e a suspensão obtida foi transferida para tubos de 15mL (Costar®) e centrifugada a 720 x g durante 12 minutos. O sedimento foi então dissolvido com 1 mL de TRIzol®. A mistura foi transferida para tubos de 1,5 mL estéreis e livres de RNAses, e mantida por 10 minutos em temperatura ambiente.

4.1.4.1.1.2. Amostras de secreções nasais de bovinos

As amostras de secreções nasais que estavam em meio de transporte foram descongeladas e a seguir centrifugadas a 3.000 x g durante 10 minutos. Após retiraram-se os suabes coletores e acrescentaram-se 12,5µl de glicogênio.

4.1.4.1.1.3. Amostras provenientes de pulmões bovinos

Aproximadamente 200 mg de cada amostra de fragmento de pulmão foram macerados e dissolvidos com 1mL de TRIzol® e 12,5µL de glicogênio e deixados reagir por 10 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, foram acrescentados a todas as amostras 200 µL de clorofórmio gelado para cada mL de trizol usado, seguido de agitação vigorosa (vórtex) durante 15 segundos e repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Após realizou-se centrifugação a 4°C durante 20 minutos a 12.000 x g, e a fase transparente resultante, contendo o RNA total, foi transferida para outro tubo de 1,5 mL estéril e livre de RNAses. A seguir acrescentou-se v/v de isopropanol gelado, que foi seguido de repouso durante 10 minutos a -20° C. Para a precipitação completa do RNA total o material foi centrifugado por 20 minutos a 12.000 x g a 4° C. O sobrenadante resultante foi então descartado e o sedimento lavado com 1mL de etanol 70° em água contendo 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC), e foi deixado reagir por 10 minutos em gelo. Uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 x g a 4° C durante 5 minutos, em seguida descartou-se o sobrenadante e procedeu-se novamente à

centrifugação, utilizando-se os mesmos parâmetros acima citados. O etanol remanescente foi retirado com auxílio de ponteira, e o sedimento foi diluído em 25µL de água com DEPC e mantido 10 minutos a 55° C para inibir prováveis RNAses. Após uma alíquota de 5µl foi submetida à espectrofotometria.

4.1.4.1.2. Espectrofotometria do RNA total obtido

Previamente à realização da síntese de cDNA, o RNA total obtido de cada amostra foi mensurado por espectrofotometria. Brevemente, 5 µl do RNA total obtido foram diluídos em 445µl de água (1:100) e submetidos à leitura em aparelho Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech. A leitura foi procedida em 260 nm e 280 nm, calibrada previamente com água usada para diluição (Branco) e então realizado o cálculo de concentração e pureza do RNA.

Pureza: DO_{260} obtida / DO_{280} obtida (menos o *background* obtido da leitura com o Branco)

Concentração: $DO_{260} * 40 * \text{fator de diluição (1:100)} / 1000$

4.1.4.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA utilizou-se o *kit* comercial (Superscript II para RT-PCR,

Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, USA), seguindo recomendações do fabricante. Para um volume final de 11µl acrescentou-se a um tubo de 200µL, 1 µL de iniciador randômico (Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, USA) e 2µg de RNA total (a diferença para 10µl foi completada com água tratada com DEPC). A mistura foi incubada a 72°C por 10 minutos. Após, acrescentaram-se 2µl de DTT, 1 µl de dNTP e 4µl de tampão 5x da enzima e 1µl da enzima Transcriptase reversa-RT (Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, USA). Assim, o material foi incubado a 40°C por 60 minutos e 96 °C por 10 minutos.

4.1.4.3. Reação de PCR para Glicoproteínas G, F e SH.

Para um volume final de 50 µL foram acrescentados em tubo de 200 µL estéril os seguintes reagentes: 5 µL tampão PCR 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]; 1µl dNTP 10mM; 1 µL do iniciador B5A (10pmol) e 1 µL iniciador B6A para a glicoproteína G (Vilcek *et al*, 1994; Quadro 1), 1 µL do iniciador B1 (10pmol) e 1 µL do iniciador B2A para a glicoproteína F (Vilcek *et al*, 1994; Quadro 2) ou 1 µL iniciador SH1 (10pmol) e 1 µL iniciador G102 para a glicoproteína SH (Larsen *et al*. 1999; Quadro 3); 0,5µL da enzima Platinum (Pfx DNA Polimerase; Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, USA), contendo 2,5U/µL; 2 µL de MgCl²; 3µL cDNA e água destilada estéril com DEPC, até atingir o volume final. A mistura foi aquecida por 3 minutos a 94°C para sofrer desnaturação. A amplificação foi realizada em um termociclador PCR System 9700 (Gene Amp, Applied Biosystems®). O ciclo termal consistiu em desnaturação a 94°C durante 60 segundos, anelamento a 55°C durante 60 segundos e extensão a 72°C durante 90 segundos.

Foram realizados 32 ciclos de amplificação. O último ciclo de extensão foi prolongado por 10 minutos. Após a reação as amostras foram diluídas 1:6 em tampão de corrida da amostra (0,25% de azul de bromofenol, 40% p/v de sacarose em água), aplicadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo e separadas por eletroforese a 100 V por 1 hora. Os fragmentos obtidos foram visualizados e fotografados sob transiluminação ultravioleta.

Quadro 1. - Descrição dos iniciadores utilizados na RT-PCR para as proteínas F, G e SH.

Proteína	Iniciador	Seqüência (5'→3')	Descritos por	Posição	Tamanho (pb)
G	B5A	CCACCCTAGCAATGATAACCTTGAC	Vilcek <i>et al.</i> , 1994	145-169	603
	B6A	AAGAGAGGATGCCTTGCTGTGG		747-726	
F	B1	AATCAACATGCAGTGCAGTTAG	Vilcek <i>et al.</i> , 1994	114-135	711
	B2A	TTTGGTCATTCGTTATAGGCAT		824-803	
SH	SH1	GGATCCGATCAATCAATAACAAGAGC	Larsen <i>et al.</i> , 1999	272-298	539
	G102	CTTGGCTTTAGCATTTC		224-207	

4.2. Isolamento das amostras positivas para BRSV em Cultivos de Células

As amostras de pulmões que foram consideradas positivas pela técnica de RT-PCR foram submetidas ao isolamento viral. O material descongelado foi macerado e ressuspensão em tampão PBS [8.0 g de NaCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 1.28g Na_2HPO_4 , H_2O , 0,2 g KCl], centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C e filtrado em membranas de 0,48 μm (Corning®). O sobrenadante obtido foi inoculado em triplicata em placas de 24 orifícios contendo monocamadas de células CER com 24 horas de crescimento. As placas foram incubadas por 1 hora para adsorção viral e após adicionaram-se 2 mL/poço de MEM (Cultilab®) contendo 5% de antibióticos (penicilina 5×10^6 , estreptomicina 5g, fungizona 5g). A incubação foi realizada a 37°C em estufa de atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 (Forma Scientific®). Cada placa continha controle negativo (células sem inóculo) e controle positivo (células infectadas com a amostra BRSV-25-BR). As culturas foram observadas diariamente até o quinto dia após a inoculação para visualização do efeito citopático. Após esse período e a não detecção deste, foram efetuadas 10 passagens cegas. Todo o material foi submetido à técnica de RT-PCR após a 1ª, 5ª e 10ª passagens para verificação da presença do RNA viral, sendo o material negativo descartado após a 10ª passagem em cultivo celular.

4.3. Caracterização Molecular

4.3.1. Análise por Enzimas de Restrição (REA)

4.3.1.1. Escolha das Enzimas de Restrição

A seleção das enzimas foi realizada com base nas seqüências obtidas no Genbank referentes à proteína G dos diferentes subgrupos existentes de BRSV. Essas seqüências foram alinhadas e submetidas à análise utilizando o programa Ncb cutter 2.0 (via *web*), que forneceu uma lista de enzimas capazes de clivar e distinguir entre os subgrupos de BRSV. Dentre as enzimas disponíveis foram selecionadas as seguintes: *Hinf*I, *Pst*I e *Eco*NI (Invitrogen™ Carlsbad, Califórnia, USA), que clivam os subgrupos A, B e B/AB respectivamente (Figura 3).

4.3.1.2. Adaptação da técnica

A adaptação da técnica foi realizada utilizando os isolados BRSV-375, BRSV-25-BR e BRSV 9402022, descritos na literatura como pertencentes aos subgrupos A, B e AB respectivamente (Valarcher *et al.*, 2000; Arns *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 1998). Para tanto foi aplicada a técnica de RT-PCR utilizando os iniciadores para a proteína G (Quadro 1), amplificando assim um fragmento de 603pb correspondente à proteína G, que foram submetidos ao corte com enzimas de restrição previamente selecionadas. Os fragmentos foram então clivados utilizando-se a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989) e

seguindo instruções do fabricante. Em linhas gerais, a solução de reação foi preparada em tubos de 0,2ml (Eppendorff®), cada um contendo 17.5µl do *amplicom*, 0.5µl da enzima (10U/µl) e 2µl de tampão de reação (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl). Em seguida, as reações foram incubadas a 37°C durante 1 hora e meia.

Os produtos obtidos após a técnica na REA foram separados por eletroforese a 90V por uma hora e trinta minutos em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo, visualizados e fotografados sob transiluminação ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 1% contendo de etídeo e, em seguida, os perfis de restrição enzimática obtidos foram analisados.

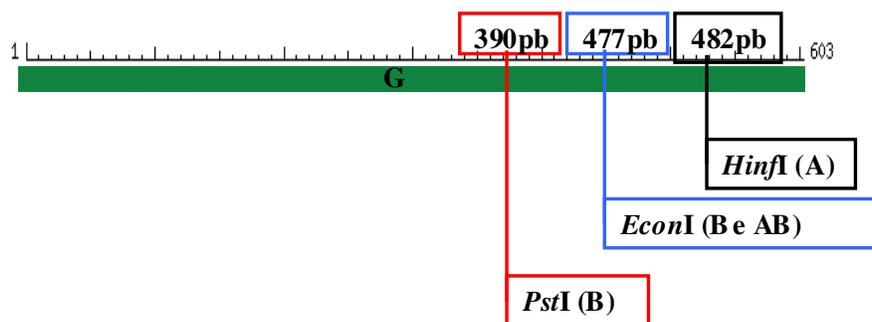


Figura 3. Esquema ilustrativo demonstrando as enzimas de restrição selecionadas e os produtos obtidos após clivagem do produto de 603 pb da proteína G dos diferentes subgrupos de BRSV.

4.3.1.3. Análise das amostras positivas para BRSV

Para caracterização das amostras de bovinos que foram detectadas como positivas pela técnica de PCR foram empregadas as enzimas de restrição previamente selecionadas (item 4.3.1.1.), seguindo os parâmetros utilizados após a adaptação da técnica (item 4.3.1.2.).

4.3.2. Análise dos *Amplicons* por Seqüenciamento Genômico

4.3.2.1. Purificação dos *amplicons*

Para purificação dos produtos da RT-PCR foi utilizado um *kit* comercial (Maligen Gel extraction Kit), seguindo as instruções do fabricante.

4.3.2.2. Seqüenciamento automático e análise das seqüências

Os fragmentos amplificados e previamente purificados (item 4.3.2.1) foram seqüenciados em seqüenciador automático 3100 Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA). O produto foi seqüenciado em ambos os sentidos, utilizando os mesmos iniciadores da RT-PCR, com o kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences®), de acordo com as recomendações do fabricante. Após, as seqüências foram visualizadas e manipuladas utilizando o programa BioEdit, versão 7.01 (Hall, 1999) e, então, submetidas à análise de similaridade de seqüências, análise filogenética e alinhamento com outras seqüências de BRSV armazenadas no GeneBank (National Center for Biotechnology Information 2004), usando o programa ClustalW, versão 1.83 (Thompson *et al.*, 1994).

5. RESULTADOS

5.1. Detecção do BRSV

5.1.1. Teste de RT-PCR

Foram detectadas sete amostras positivas para BRSV utilizando a técnica de RT-PCR, onde se observou a presença de fragmentos de 603pb, correspondentes à fração do segmento selecionado da proteína G. Dentre as amostras detectadas apenas uma amostra era de animal com sintomatologia clínica da doença, sendo as outras seis amostras de animais adultos sem sinais e sintomas característicos de infecção por BRSV. As amostras detectadas como positivas foram as amostras 404, 804, 5810, 3610, 4110, 4910, e BRSV-108-BR. Ressalta-se que as denominações das amostras não seguiram nenhum padrão específico.

As amostras positivas 404 e 804 eram provenientes de suabes nasais de animais do estado de São Paulo, e as amostras 3610, 4110, 4910, 5810 e BRSV-108-BR foram obtidas de pulmões de bovinos provenientes do estado do Rio Grande do Sul. Salienta-se que a amostra BRSV-108-BR provinha do único animal que apresentava sintomatologia clínica sugestiva de infecção por BRSV. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 4 e 5.

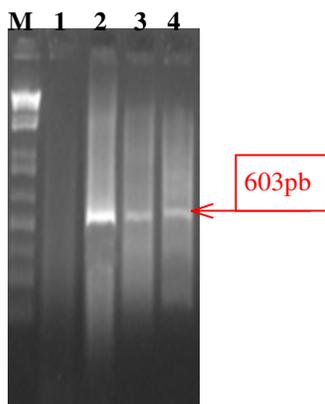


Figura 4. RT-PCR para proteína G de BRSV de amostras de suabes nasais.

M: peso molecular 1Kb plus

1: controle negativo

2: controle positivo (BRSV-25-BR)

3: amostra 404

4: amostra 804

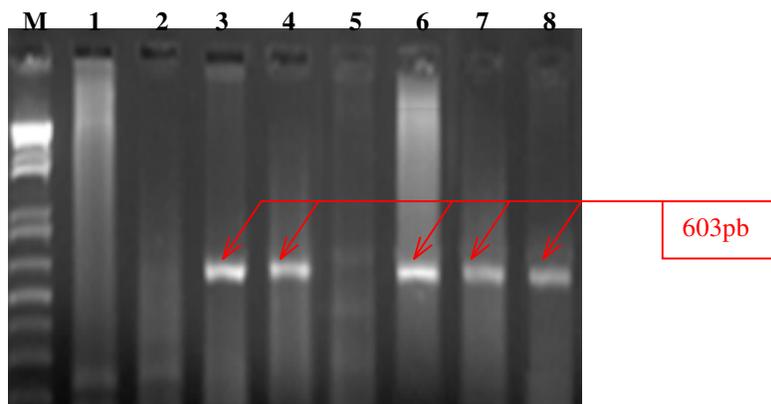


Figura 5. RT-PCR para proteína G de amostras de pulmão.

M: peso molecular 1Kb plus

1: controle negativo,

2: amostra 2509 negativa

3: BRSV-108-BR

4: amostra 3610

5: amostra 4101 negativa

6: amostra 4110

7: amostra 4910

8: amostra 5810

5.2. Isolamento Viral

As amostras de pulmões 3610, 4110, 4910, 5810 e BRSV-108-BR detectadas como positivas pela técnica de RT-PCR foram submetidas ao isolamento viral. A exclusão das duas amostras detectadas em suabes nasais (404 e 804) ocorreu devido ao fato das mesmas terem sido acondicionadas em TRIzol[®], fator este limitante para esta técnica.

Dentre as amostras submetidas ao isolamento foi verificado o ECP característico de BRSV na amostra BRSV-108-BR (Figura 6) após a nona passagem em cultivo celular, sendo sete passagens em células CER e duas em células BT. A confirmação foi dada pela observação de produtos de 711pb, 603pb e 539pb, correspondentes às proteínas F, G e SH

respectivamente, pela técnica de RT-PCR. Não foram observadas bandas inespecíficas. Os resultados estão demonstrados na Figura 7.

As amostras 3610, 4110, 4910 e 5810 foram mantidas até a décima passagem em cultivo celular, sendo que entre a 1^a, 5^a e 10^a passagens foram testadas novamente utilizando-se a RT-PCR. Essas amostras foram descartadas após a décima passagem, sendo que não foi possível a detecção de fragmentos correspondentes à proteína G em nenhuma das passagens testadas.

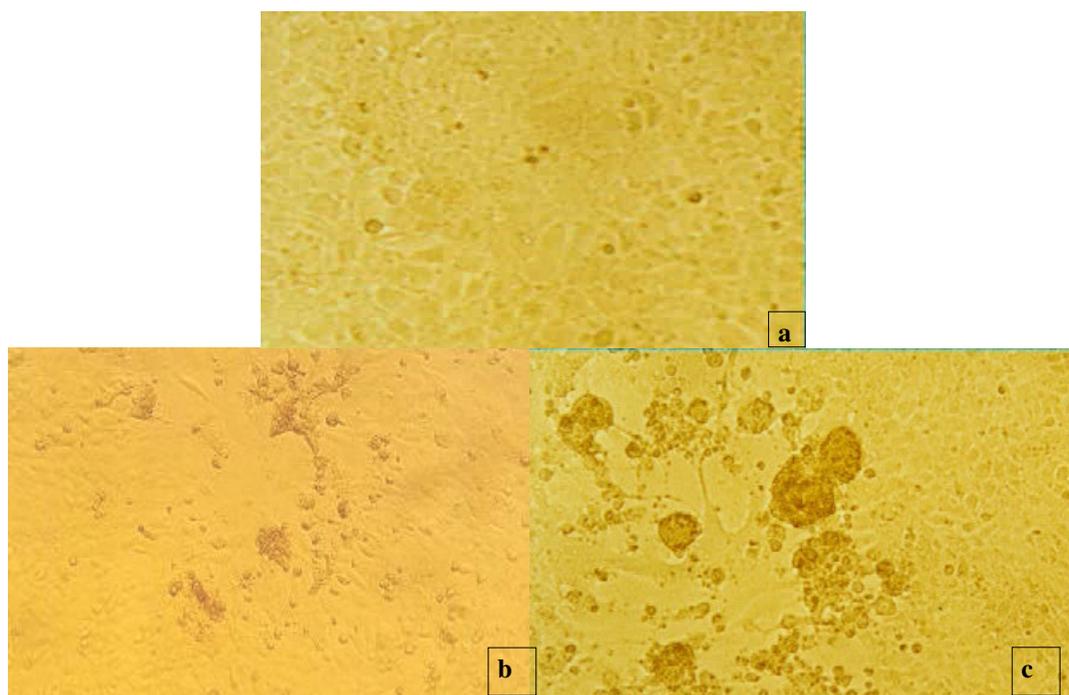


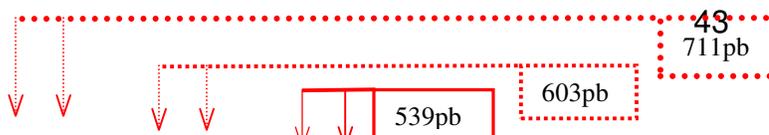
Figura 6: Fotografia de cultivo de células CER demonstrando o isolamento da nova estirpe viral.

a) controle negativo (aumento 5X).

b) amostra isolada (BRSV-108-BR) mostrando ECP característico (aumento 5X).

c) controle positivo (BRSV-25-BR) (aumento 10X).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



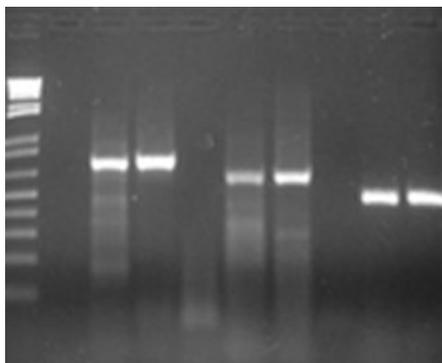


Figura 7: Resultados da reação de PCR para proteína F, G e SH da amostra isolada de BRSV.

M: marcador de peso molecular 50 pb.

1, 4 e 7: controles negativos.

2 e 3: Fragmentos de 711 pb proteínas F dos isolados BRSV-25-BR e BRSV- 108-BR.

5 e 6: Fragmentos de 603 pb proteínas G dos isolados BRSV-25-BR e BRSV-108-BR.

8 e 9: Fragmentos de 539 pb proteínas SH dos isolados BRSV-25-BR e BRSV- 108- BR

5.3. Análise com Enzimas de Restrição (REA)

5.3.1 Adaptação da técnica

Os resultados obtidos com a amplificação de um produto de 603pb correspondente à proteína G para os diferentes isolados por RT-PCR podem ser visualizados na Figura 8.

A enzima *Hinfl*, que cliva amostras do subgrupo A, utilizada para a digestão dos fragmentos dos diferentes isolados, gerou perfil de restrição enzimática com apresentação de dois fragmentos distintos de 482 e 121pb para o isolado BRSV-375 pertencente ao subgrupo A (Figura 9) e, como esperado, não clivou as amostras representantes dos subgrupos B e AB.

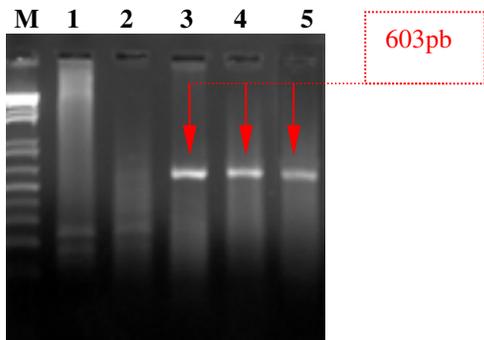


Figura 8: RT-PCR proteína G dos isolados de BRSV.

- M:** marcador de peso molecular
1: controle negativo
2: poço em branco
3: isolado BRSV-375 (subgrupo A)
4: isolado BRSV-25-BR (subgrupo B)
5: isolado BRSV-9402022 (subgrupo AB).

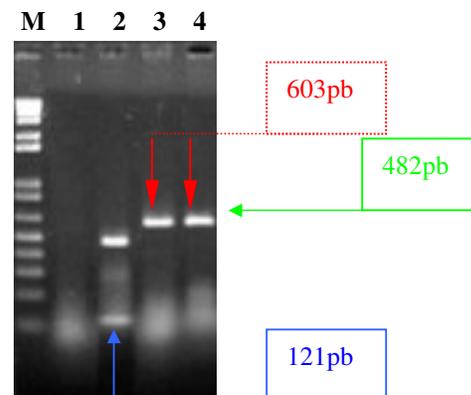


Figura 9: Enzima *HinfI*, clivagem do isolado pertencente ao subgrupo A

- M:** marcador molecular 1kb plus
1: controle negativo
2: amostra BRSV-375 (A)
3: amostra BRSV-25-BR (B)
4: amostra BRSV 9402022 (AB)

Com a utilização da enzima *PstI*, que cliva amostras do subgrupo B, o fragmento de 603 pb obtido do isolado BRSV-25-BR pertencente ao subgrupo B foi clivado gerando um perfil de 390pb e 213 pb como o esperado para esta amostra, sendo que os fragmentos das amostras representantes dos subgrupos A e AB não foram clivados. Os resultados podem ser visualizados na Figura 10.

A enzima *EcoNI*, que cliva amostras dos subgrupos B e AB, mostrou o perfil de restrição enzimática esperado gerando fragmentos de 477pb e 126pb a partir de um fragmento de 603pb dos isolados BRSV-25-BR e BRSV-9402022 pertencentes aos subgrupos B e AB respectivamente (Figura 11).

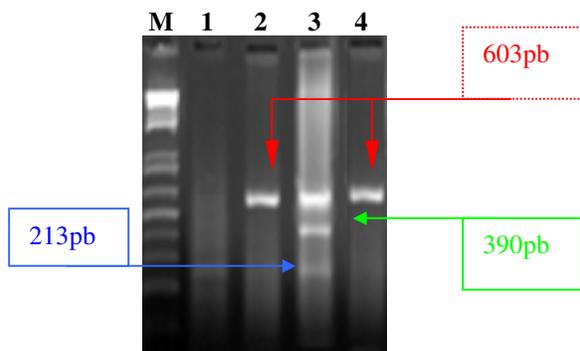


Figura 10: enzima *PstI* it., clivagem do isolado pertencente ao subgrupo B.
M: marcador molecular 1kb plus
1: controle negativo
2: amostra BRSV-375 (A)
3: amostra BRSV-25-BR (B)
4: amostra BRSV 9402022 (AB).

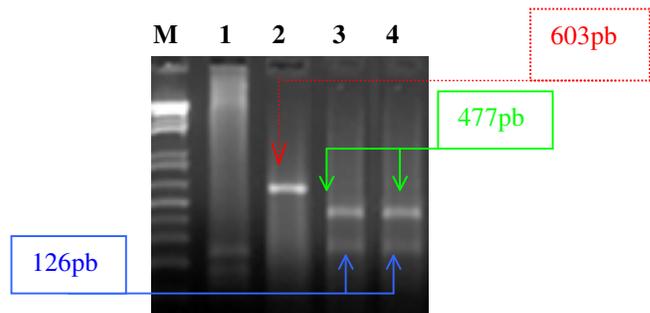


Figura 11: enzima *EcoNI* clivagem das amostras pertencentes aos subgrupos B e AB
M: marcador de peso molecular 1kb plus
1: controle negativo
2: amostra BRSV-375 (A),
3: amostra BRSV-25-BR (B)
4: amostra BRSV 9402022 (AB).

5.3.2 Análise por REA das amostras detectadas

Todas as sete amostras detectadas por PCR foram submetidas à técnica de REA.

Para as amostras de suabes nasais o perfil de restrição enzimático observado sugeriu que a amostra 404 pertenceria ao subgrupo B, e que a amostra 804 pertenceria ao subgrupo AB. Os resultados obtidos estão demonstrados nas figuras 12 e 13.

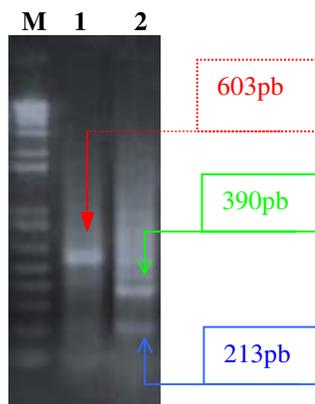


Figura 12: amostras de secreções nasais. Perfil de restrição com enzima *PstI*.
M: marcador molecular 1kb plus
1: amostra 804
2: amostra 404

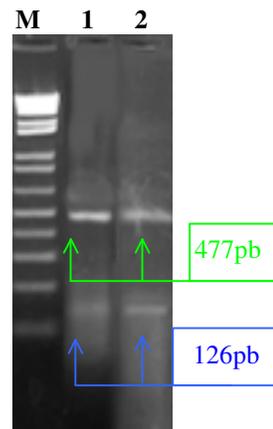


Figura 13: amostras de secreções nasais. Perfil de restrição para enzima *EcoNI*.
M: marcador molecular 1kb plus
1: amostra 804
2: amostra 404

Os perfis de restrição enzimáticos para as amostras de pulmão positivas sugeriram que as amostras BRSV-108-BR, 3610, 4110 e 5810 pertenceriam ao subgrupo B, e que a amostra 4910 pertenceria ao subgrupo AB (Figuras 14 e 15).

Os resultados obtidos com a utilização da enzima *HinfI*, que cliva amostras pertencentes ao subgrupo A, não foi demonstrado, pois não ocorreu clivagem dos fragmentos.

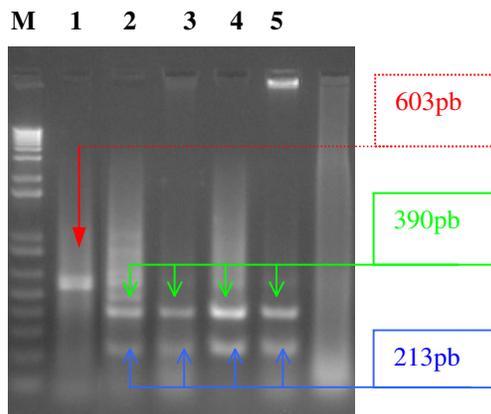


Figura 14: amostras de pulmão. Perfil de restrição enzima *PstI*
M: marcador molecular 1kb plus
1: amostra 4910
2-5: amostras BRSV-108-BR, 3610,4110 e 5810

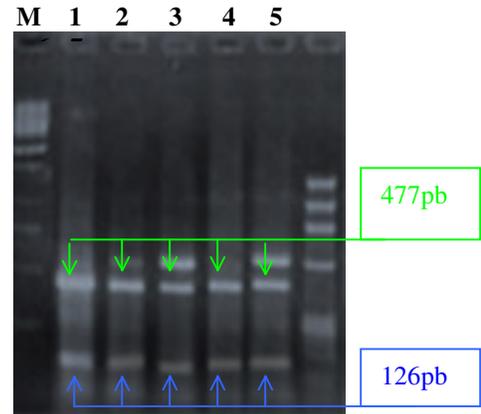


Figura 15: amostras de pulmão. Perfil de restrição enzima *EcoNI*.
M: marcador molecular 1kb plus
1 -5: amostras BRSV-108-BR, 3610, 4110 4910 e 5810,

5.3.2. Resultados da análise por seqüenciamento.

Foram seqüenciados os fragmentos correspondentes à proteína G das amostras detectadas 404, 804 e BRSV-108-BR, bem como os fragmentos das proteínas F e SH do novo isolado BRSV-108-BR.

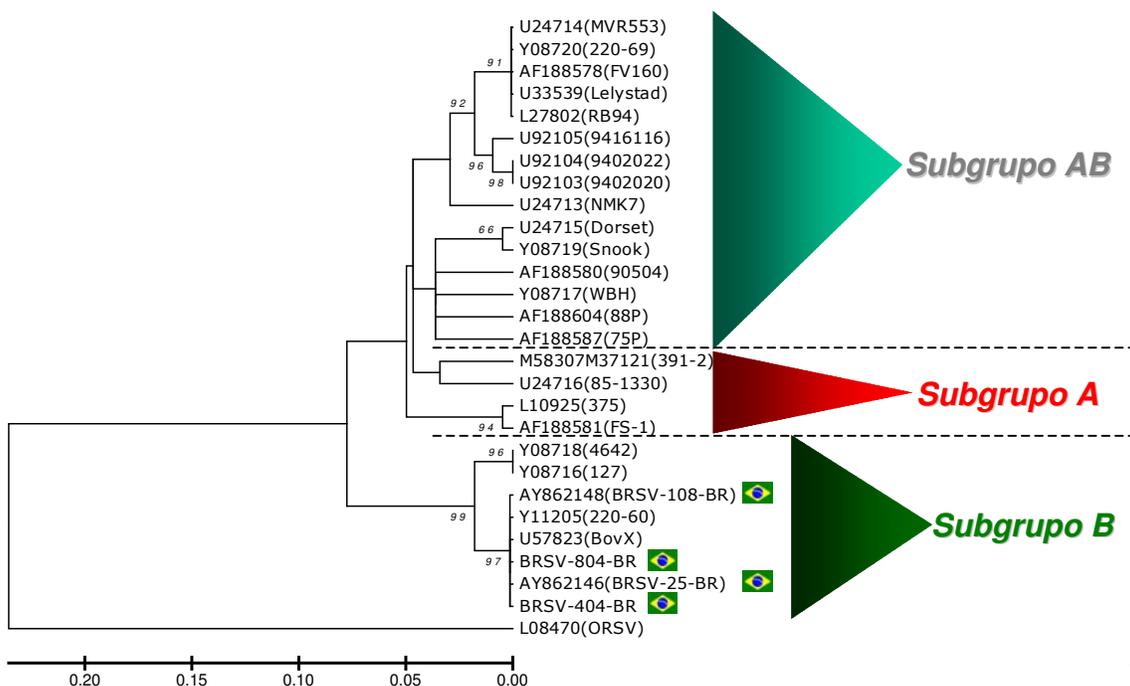
As seqüências dos fragmentos de proteína G obtidos após a análise das amostras BRSV-108-BR, 404-BR e 804-BR apresentaram alta homologia com os isolados 220-60 (Furze *et al.*, 1997) e BOVX (Paccaud & Jaquier, 1970), ambos pertencentes ao subgrupo B, superando 95% de identidade (Quadro 2, Figura 16). As alterações nas seqüências de aminoácido são demonstradas no Quadro 3.

Quadro 2: Análise do grau de identidade entre os fragmentos de proteína G detectados com seqüências de amostras disponíveis no GeneBank.

Seq->	375	391-2	BovX	220-60	220-69	RB94	25-BR	108-BR	404-BR	804-BR
391-2	0,914									
BovX	0,842	0,842								
220-60	0,842	0,842	1,000							
220-69	0,914	0,914	0,876	0,876						
RB94	0,919	0,919	0,880	0,880	0,995					
25-BR	0,829	0,829	0,987	0,987	0,863	0,868				
108-BR	0,817	0,817	0,970	0,970	0,851	0,855	0,957			
404-BR	0,838	0,838	0,995	0,995	0,872	0,876	0,982	0,965		
804-BR	0,800	0,808	0,957	0,957	0,834	0,838	0,948	0,927	0,953	
ORSV	0,676	0,680	0,668	0,668	0,663	0,659	0,659	0,646	0,663	0,646

*em negrito estão ressaltados os valores de identidade obtidos entre as amostras pesquisadas e as amostras pertencentes ao subgrupo B.

Figura 16: Árvore filogenética preparada com seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G das amostras brasileiras e de amostras de ampla distribuição mundial, classificando as amostras brasileiras como pertencentes ao subgrupo B.



Os resultados do alinhamento do segmento correspondentes à proteína F do isolado BRSV-108-BR com as seqüências da mesma proteína de isolados BRSV pertencentes aos subgrupos A, B e AB são demonstrados no Quadro 4. Nota-se que os valores encontrados superam os 96% de homologia entre as amostras.

Quadro 4: Análise do grau de identidade entre os fragmentos de proteína F do BRSV-108-BR isolado com seqüências de amostras disponíveis no GeneBank.

Amostra	4642	220-69	FV160	LELYSTAD	BAYOVAC	RB_94	391-2
220-69 (AB)	0,960						
FV160 (AB)	0,960	1,000					
LELYSTAD(AB)	0,960	1,000	1,000				
BAYOVAC(A)	0,965	0,985	0,985	0,985			
RB_94(AB)	0,960	1,000	1,000	1,000	0,985		
391-2(A)	0,965	0,985	0,985	0,985	0,990	0,985	
BRSV-108-BR	0,975	0,965	0,965	0,965	0,970	0,965	0,970

Os resultados do alinhamento do segmento correspondentes à proteína SH do isolado BRSV-108-BR com as seqüências da mesma proteína de isolados BRSV pertencentes ao subgrupo AB são demonstrados no Quadro 5. Os valores obtidos variam entre 82,5 a 92,4% de homologia entre as amostras.

Quadro 5: Análise do grau de identidade entre os fragmentos de proteína SH detectados com seqüências de amostras disponíveis no GeneBank.

Amostras	9910244	9810829	9710985	9610783	9510070	9402022	9314893	88Lu195
9810829(AB)	0,840							
9710985(AB)	0,871	0,833						
9610783(AB)	0,856	0,977	0,840					
9510070(AB)	0,840	0,962	0,840	0,969				
9402022(AB)	0,848	0,954	0,848	0,962	0,992			
9314893(AB)	0,848	0,984	0,833	0,992	0,977	0,969		
88Lu195(AB)	0,848	0,984	0,833	0,992	0,977	0,969	1,000	
BRSV-108-BR	0,825	0,909	0,787	0,931	0,901	0,893	0,924	0,924

6. DISCUSSÃO

A detecção e o conhecimento das características moleculares específicas do BRSV presentes em amostras coletadas de bovinos foram alvo deste estudo, uma vez que pouco se sabe sobre quais são os subgrupos desses vírus que circulam no rebanho bovino brasileiro.

Para o diagnóstico das amostras coletadas foi utilizada a técnica de RT-PCR, baseando-se em relatos de Almeida *et al.* (2004), que revelaram ser 100 vezes mais sensível a amplificação de segmentos correspondentes à proteína G quando comparada ao gene que codifica a proteína F, sendo, assim, mais adequado para a detecção de BRSV em amostras de campo. Também se levou em consideração os relatos de Furze *et al.* (1997), que citam que a diferenciação em subgrupos de BRSV deve ser baseada na variação antigênica da proteína G ou no seqüenciamento do gene que codifica a mesma.

Com efeito, o vírus foi detectado e isolado com sucesso em uma amostra de tecido de animal com sintomatologia clínica compatível com BRSV durante a realização deste trabalho, e a amostra foi denominada BRSV-108-BR. Ainda foram detectadas seis amostras positivas para a presença de BRSV em animais adultos sem sinais e sintomas de doença respiratória dentre as quais duas amostras de secreções nasais oriundas do estado de São Paulo e quatro amostras de fragmentos pulmonares provenientes do estado do Rio Grande do Sul. A detecção desses vírus em amostras oriundas de bovinos sem sintomatologia clínica (6/277), representando 2,16% do total das amostras analisadas, foi vista pela primeira vez no presente estudo, significando um novo e importante achado para estudos de BRSV. Estes resultados vão de encontro com a hipótese gerada por Van der Poel *et al.*

(1993) que a partir de evidências sorológicas sugeriram que os BRSV se mantêm nos rebanhos bovinos em infecções persistentes subclínicas e por re-infecções esporádicas de animais previamente soropositivos, o que poderia explicar, em parte, por que algumas propriedades, mesmo passando por longos períodos sem manifestações clínicas da doença, voltem a sofrer surtos de BRSV sem a introdução de novos animais no rebanho (Van der Poel, 1993; Larsen, 2000).

Devido aos achados neste estudo, sugerimos que outros estudos envolvendo uma análise longitudinal da infecção em rebanhos fechados, adotando as técnicas de detecção aqui utilizadas, sejam realizados e possam assim, elucidar tal hipótese.

A técnica de isolamento viral não foi utilizada neste estudo como técnica de diagnóstico, visto que atualmente a técnica de isolamento para o diagnóstico laboratorial de BRSV não é um procedimento recomendado, já que amostras contendo baixas concentrações de vírus raramente permitem a replicação *in vitro*, mesmo em sistemas celulares sensíveis (Dubovi, 1993). Além disso, o transporte das amostras clínicas reduz notavelmente a sensibilidade do isolamento, sendo que muitas vezes o isolamento é ineficaz quando as amostras não são prontamente submetidas ao cultivo celular (West *et al.*, 1998; Larsen, 2000). Desta forma, utilizamos essa técnica apenas visando à obtenção de novos isolados de BRSV, naqueles casos em que as amostras foram previamente consideradas positivas pela técnica de RT-PCR.

Até o presente momento existia um único isolado de BRSV, o isolado BRSV-25-BR, obtido por Arns *et al.* (2003) a partir de secreções nasais de um bezerro de dois meses de idade. Neste estudo foi possível o isolamento de uma nova estirpe viral, denominada BRSV-108-BR, obtida a partir de fragmentos de pulmão colhidos de um bovino com um ano de idade, com sintomatologia clínica de pneumonia, apresentando corrimento nasal

seromucoso abundante e dispnéia grave. O material foi enviado ao laboratório e submetido imediatamente à técnica de PCR, quando foi possível a visualização de fragmento correspondente à amplificação do gene da proteína G do BRSV. Após o resultado positivo pela técnica PCR, o material foi submetido ao cultivo celular e após nove passagens foi possível a visualização do efeito citopático característico, isto é, formação de sincício e arredondamento celular (Buys *et al.*, 1989).

Além da detecção e isolamento do BRSV, tem-se mostrado evidente a necessidade de uma melhor compreensão do BRSV e sua infecção em nosso rebanho, tendo em vista que a taxa de morbidade da infecção pelo BRSV em bezerros pode atingir 80 a 100%, enquanto a mortalidade excede 5 a 10% do rebanho (Inaba *et al.*, 1972; Bryson *et al.*, 1978), tornando fundamental conhecer as características intrínsecas das amostras desse patógeno circulante em nosso meio.

O uso da técnica de REA, com vistas a uma melhor definição dos possíveis subgrupos de BRSV a serem encontrados em amostras clínicas, foi considerada uma técnica promissora. Alguns aspectos tais como rapidez, eficácia e baixo custo, aliados à sensibilidade e especificidade, foram fatores decisivos para a escolha dessa técnica que foi, então, aplicada aos produtos oriundos da reação de RT-PCR.

A adaptação da técnica, utilizando como amostras-padrão três isolados pertencentes aos subgrupos A, B e AB de BRSV (Figuras 9, 10 e 11), permitiu a detecção das diferenças genéticas entre os subgrupos testados, indicando que essas enzimas poderiam ser usadas para classificação em subgrupos de BRSV. Os produtos de PCR obtidos das sete amostras positivas e submetidos à técnica de REA geraram um perfil de restrição enzimática que sugeriu a classificação das mesmas em um dos subgrupos de BRSV, em que as amostras 804 e 4910 foram consideradas pertencentes ao subgrupo AB (Figuras 12, 13, 14 e 15), e as

amostras BRSV-108-BR, 404, 3610, 4110 e 5810 foram classificadas como pertencentes ao subgrupo B (Figuras 14 e 15).

Subseqüentemente, foi realizado o seqüenciamento dos fragmentos correspondentes à proteína G das amostras detectadas BRSV-108-BR, 404 e 804. Os resultados obtidos pela análise das amostras seqüenciadas quando submetidas às análises de similaridade de seqüências, análise filogenética e alinhamento com outras seqüências de BRSV armazenadas no GeneBank (National Center for Biotechnology Information 2004), usando o programa ClustalW, versão 1.83 (Thompson *et al.*, 1994), apresentaram alta homologia com as seqüências armazenadas no Genebank. Entretanto, a amostra 804, que foi considerada como pertencente ao subgrupo AB pela técnica de REA, após o seqüenciamento apresentou alta homologia com amostras representantes do subgrupo B (Quadro 2, Figura 16), o que pode ser explicado por achados de Valentova *et al.* (2005), que sugere que a substituição de um único nucleotídeo leva freqüentemente a alterações na seqüência de aminoácidos e, conseqüentemente, no padrão de digestão.

Dos dados apresentados confirmados pela análise filogenética (Figura 16) da dedução da seqüência de aminoácidos que codificam a proteína G podemos afirmar que as cepas de BRSV que circulam no Brasil podem ser enquadradas no subgrupo B previamente proposto (Nettleton *et al.*, 2003; Prozzi *et al.*, 1997; Schrijver *et al.*, 1996; Valarcher *et al.*, 2000; Yaegashi *et al.*, 2005). É importante ressaltar que desde a década de 70, em todo o mundo, não havia sido descrita a presença de amostras pertencentes a esse subgrupo. Portanto, não é possível determinar a procedência exata de BRSV pertencentes ao subgrupo B em nosso país, sendo que qualquer esforço para elucidar esse fato seria somente especulativo. Dados encontrados na literatura sugerem que a distribuição de grupos genéticos e antigênicos de BRSV possua uma localização geográfica bem definida (Larsen

et al., 2000; Larsen *et al.*, 1998; Nettleton *et al.*, 2003; Schrijver *et al.*, 1996; Valarcher *et al.*, 2000; Yaegashi *et al.*, 2005).

De modo geral, podemos concluir que a técnica de RT-PCR aqui utilizada obteve sucesso em diagnosticar infecções em bovinos causadas por BRSV e ainda poderá ser utilizada futuramente em estudos sobre a epidemiologia dessa infecção em rebanhos nacionais, dada a sua capacidade de demonstrar a presença do vírus em material coletado de animais sem sintomatologia clínica aparente. A análise pela técnica de REA dos produtos obtidos pela RT-PCR não apresentou resultados conclusivos quando da classificação das amostras em um dos diferentes subgrupos propostos para BRSV (Furze *et al.*, 1994; Schrijver *et al.*, 1996; Prozzi *et al.*, 1997; Furze *et al.*, 1997, Larsen *et al.*, 1998), sendo assim indispensável à análise filogenética das amostras de BRSV para uma correta classificação em subgrupos. Não obstante, propõe-se a utilização da técnica de REA como uma nova ferramenta para selecionar variações genéticas entre amostras pertencentes a um mesmo subgrupo de BRSV.

7. CONCLUSÕES

- Através da análise por RT-PCR foram detectadas 06 (seis) amostras positivas para o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) de um total de 277 amostras oriundas de bovinos sem sintomatologia clínica respiratória, representado 2,16% do total analisado;
- Para o isolamento viral foram selecionadas 05 (cinco) amostras de bovinos (positivas pela técnica de RT-PCR) as quais foram submetidas a sucessivas passagens cegas em cultivo celular, sendo isolada uma amostra de BRSV denominada BRSV-108-BR;
- A utilização da técnica Análise por Enzimas de Restrição (REA) não apresentou resultados conclusivos para a classificação de BRSV em subgrupos, sendo proposta aqui como técnica para detecção de variações genéticas entre amostras pertencentes a um mesmo subgrupo de BRSV;
- O seqüenciamento e a análise filogenética mostraram-se indispensáveis para a correta classificação de BRSV em subgrupos;

- O presente trabalho demonstrou que as diferentes amostras de BRSV analisadas pertencem ao subgrupo B.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA R.S., DOMINGUES H.G., COSWIG L.T., D'ARCE R.C.F., CARVALHO R.F. and ARNS C.W. (2004). Detection of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected balb/c mice. *Vet. Res.*, 35: 189-197.

AMES T.R., (1993). The epidemiology of BRSV infection. *Vet. Med.*, 88: 881-885.

ANDERSON L.J., HIERHOLZER J.C., TSOU C., HENDRY R.M., FERNIE B.F., STONE Y. and MCINTOSH K. (1985). Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.*, 151: 626-33.

ANDERSON M.G. and CLEMENT J. E. (1992). Two strains of SIVmac show differential transactivation mediated by sequences in the promoter. *Viol.*, 191: 559-68.

ARNS C.W., CAMPALANS J., COSTA S.C.B., DOMINGUES H.G, D'ARCE R.C.F and ALMEIDA R.S. (2003). Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, 36: 213-218.

BAKER J.C. and FREY M.L. (1985) Bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Clin. North. Am.:* 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. *Am. J. Vet. Res.*, 47:240-245.

BAKER J.C., WILSON E.G., MCKAY G.L., STANEK R.J., UNDERWOOD W.J., VELICER L.F. and MUFSON M.A. (1992). Identification of subgroups of bovine respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol.*, 30: 1120-1126.

BEEM M., WRIGHT F.H., HAMRE D., EGERER R. and OEHME B.S. (1961). Association of the chimpanzee corysa agent with acute respiratory disease in children. *N. Engl. J. Med.*, 263: 523-530.

BELAK S. and BALLAGI-PORDANY A. (1993). Application of the polimerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Commun.*, 17: 55-72.

BANERJEE A.K., BARIK S. and DE B.P. (1991). Gene expression of nonsegmented negative strand RNA viruses. *Pharmac. Ther.* , 51: 47-70.

BELKNAP E.B., CISZEWSKI D.K. and BAKER J.C. (1995). Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in calves and lambs, *J. Vet. Diag. Invest.*, 7: 285-298.

BITSCH V., FRIIS N.F. and KROGH H.V. (1976). A microbiological study of pneumonic calf lungs. *Acta Vet Scand.*, 17: 32-42.

BRODERSEN B.W. and KELLING C.L. (1999). Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 59: 1423-1430.

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. *Vet. Rec.*, 103: 485-489.

BRYSON D.G., McNULTY, MS LOGAN, E.F. and CUSH P.F. (1983). Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: clinical and pathologic findings. *Amer. J. Vet. Res.*, 44: 1648-1655.

BUYS S.B., DU PREEZ J.H. and ELS H.J. (1989). Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. *J. South African Vet. Assoc.*, 60: 221-222.

CAMPALANS, J. and ARNS, C.W. (1997). Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil, *Virus Rev. & Res.*, 2: 50-56.

CHANOCK R. and FIBERG. L. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.*, 66: 281-290.

CHANOCK R., ROIZMAN B. and MYERS R. (1957). Recovery from infants of a virus related to chimpanzee coryza agent. II. Epidemiologic aspects of infections in infants and young children. *Am. J. Hyg.*, 66: 291-300.

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 outbreaks of bronchitis pneumonia, and minor respiratory disease in child *JAMA* , 176: 653 .

COLLINS P.L. (1991). The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of the genus *Pneumovirus*. In: Kingsbury D.W. (Ed) *The Paramyxoviruses*. *Plenum Press*, New York, p. 103-162.

COLLINS P.L. (1994). Respiratory syncytial virus. In: Webster R.G. and Granoff A. (Ed), *Encyclopedia of Virology*. *Acad. Press London*, 1210-1218.

COLLINS P.L., MCINTOSH K. and CHANOCK R.M. (1996a). Respiratory syncytial virus In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. *Fields Virology*, 3rd Ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 113-1351.

COLLINS P.L. and MOTTET G. (1993). Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory virus. *J. Gen. Virol.*, 74: 1445-1450.

COLLINS P.L., HILL M.G., CRISTINA J. and GROSFELD H. (1996b). Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93: 81-5.

DOGGETT J.E., TAYLOR-ROBINSON D. and GALLOP R.G. (1968). A study of an inhibitor in bovine serum active against respiratory syncytial virus. *Arch Gesamte. Virusforsch.*, 23: 126-37.

DOMINGUES H.G., CAMPALANS J., ALMEIDA R.S., COSWIG L.T. and ARNS C.W. (2002). Dot-enzyme linked immunosorbent assay as an alternative technique for the detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antibodies. *Vet Res.*, 33: 397-404.

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 mo Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, 17: 77-81.

DUBOVI E.J. (1993). Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective. *Vet. Med.*, 88: 888-893.

ELVANDER M., VILCEK S., BAULE C., UTTENTHAL A., BALLAGI-PORDANY A. and BELAK S. (1998). Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. *J. Gen. Virol.*, 12: 2939-46.

FLORES E.F., WEIBLEN R., MEDEIROS M., BOTTON S.A., IRIGOYEN L.F., SCHUCH L.F., DRIEMEIER D. and MORAES M. (2000). A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (brsv) antigens in histological specimens by immunofluorescence AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY. *Pesq. Vet. Bras*, 20 (4): 139-143.

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, *Virol.*, 231: 48-58.

FURZE J., WERTZ G., LERCH R. and TAYLOR G. (1994). Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.*, 75: 363-370.

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, *Ciênc. Rur.*, 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, *J. Vet. Diag. Invest.*, 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. *Can. J. Vet. Res.*, 53: 366-368.

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

HALL C.B. Respiratory syncytial virus and Parainfluenza virus. (2001) Review Article. *N.Engl. J. Med.* 344: 1917-1928.

HE B., LESER G.P., PATERSON R.G. and LAMB R.A. (1998). The paramyxovirus SV5 small hydrophobic (SH) protein is not essential for virus growth in tissue culture cells. *Viol.* , 250: 30-40.

HEMINWAY B.R., YU Y., TANAKA Y., PERRINE K.G., GUSTAFSON E., BERNSTEIN J. and GALISNKY M.S. (1994). Analysis of respiratory syncytial virus F, G and SH proteins cell fusion. *Viol.*, 200: 801-805.

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. *J. Med. Virol.*, 53: 366-371.

HIMES R.S. and GERSHWIN L.J. (1992). Bovine respiratory syncytial virus fusion protein gene: sequence analysis of cDNA and expression using a baculovirus vector. *J. Gen.Viol.*, 73: 1563-1567.

HUANG Y.T., COLLINS P.L. and WERTZ .W. (1985). Characterization of the 10 protein of human respiratory syncytial virus: Identification of fourth envelope-associated protein. *Virus Res.*, 2: 157-173.

INABA Y., TANAKA Y., OMORI T. and MATUMOTO M. (1970). Isolation of bovine respiratory syncytial virus. *Jpn J Exp Med.*, 40: 473-4.

INABA Y., TANAKA Y., SATO K., OMORI T. and MATUMOTO M. (1972). Bovine respiratory syncytial virus: Studies on an outbreak in Japan, 1968-1969. *Jap. J. Microbiol.*, 16: 373-383.

JACOBS J.W. and EDINGTON N. (1971). Isolation of respiratory syncytial virus from cattle in Britain. *Vet. Rec.*, 88: 694.

JACOBS J.W. and EDINGTON N. (1975). Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus, *Vet. Sci.*, 18: 299-306.

JOHNSON PR, SPRIGGS MK, OLMSTED RA and COLLINS PL.(1987). The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Nat Acad Sci USA.*, 84: 5625-5629.

KIMMAN T.G., ZIMMER G.M., WESTENBRINK F., MARS J. and VAN LEEUWEN E. (1988). Epidemiological study of Bovine Respiratory syncytial virus infections in calves; influence of maternal antibodies on the outcome of disease. *Vet. Rec.*, 123: 104-109.

KIMMAN T.G., WESTENBRINK F., SCHREUDER B.E. and STRAVER P.J. (1987). Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 1097-1106.

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 lavages samples. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 143-147.

LAMBERT D.M. (1988). Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoprotein. *Virology*, 164: 458-466.

LANGJEDIJK J.P., SCHAAPER W.M., MELOEN R.H. and VAN OIRSCHOT J.T. (1996). Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.*, 77: 1249-1257.

LARSEN L.E., UTTENTHAL A., ARCTANDER P., TJORNEHOJ K., VIUFF B., RONTVED C., RONSHOLT L., ALEXANDERSEN S. AND BLIXENKRONE-MOLLER M. (1998). Serological and genetic characterisation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) indicates that Danish isolates belong to the intermediate subgroup: no evidence of a selective effect on the variability of G protein nucleotide sequence by prior cell culture adaptation and passages in cell culture or calves. *Vet Microbiol.*, 62: 265-79.

LARSEN L.E., TJORNERHOJ K., VIUFF B. JENSEN N.E. and UTTENTHAL A. (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. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11: 416-422.

LARSEN L.E. (2000). Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review, *Act. Vet. Scan.* 41: 1-24.

LEHMKUHL H.D., GOUGH P.M. and REED D.E.N (1979). Characterization and identification of a bovine respiratory syncytial virus isolated from young calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1979 40: 124-126.

LEKEUX P. (1995). Bovine respiratory disease complex: An European perspective. *Bov. Pratic.*, 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 human respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, 64: 5559-5569.

LERCH R.A., ANDERSON K., AMANN L. and WERTZ G.W. (1991) Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus. *Virol.*, 181: 118-131.

LEVINE S., KLAIBER-FRANCO R. and PARADISO P.R. (1987). Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 68: 2521-4.

LOKENS GARD B.E., GOYAL S.M. and KRUEGER D.A. (1992). Comparison of three immunoassays for the rapid detection of bovine respiratory syncytial virus. *Microbiol.*, 15: 259-64.

MADIGAN M.T., MARTINKO J.M. and PARKER J. (2000). Brock Biology of microorganisms. 9th Ed., 991p.

MAHONY J.B. (1996). Multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of sexually transmitted diseases. *Clin. Lab. Med.*, 16: 61-71.

MALLIPEDDI S.K., SAMAL S.K. and MOHANTY S.B. (1990). Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus-infected cells. *Arch. Virol.*, 115: 23-26.

MASOT A.J., GOMEZ TEJEDOR C., TOVAR I., GAZQUEZ A. and REDONDO E. (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.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. *Vet. Pathol.*, 37: 618-625.

MATHEISE J.P., WALRAVENS K., COLLARD A., COPPE P. and LETESSON J.J. (1995). Antigenic analysis of the F protein of bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition. *Arch. Virol.*, 140: 993-1005.

MCCONNOCHIE K.M., HALL C.B., WALSH E.E. and ROGHMANN KJ. (1990). Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype. *J. Pediatr.*, 117: 52-62.

McINTOSH K. and CHANOCK R.M. (1985). Respiratory syncytial virus. In : Fields B.N. (ed), *Virol.*, Raven Press, New York, p. 1285-1304.

MORENO LOPEZ J. (1979). A serosurvey of viruses during outbreaks of acute respiratory and/or enteric disease in Swedish cattle. *Zbl. Vet. Med.*, 92: 544-549.

MORRIS J. A., BLOUNT R.E. and SAVAGE R.E. (1956) Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92: 544-549.

MUFSON M.A., ORVELL C., RAFNAR B. and NORRBY E. (1985). Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 66: 2111-24.

MURPHY F.A., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., GHABRIAL S.A., JARVIS A.W. MARTELLI G.P., MAYO M.A. and SUMMERS M.D. (1995). *Virus taxonomy*. Sixth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag Wien.

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. *Prevent. Vet. Med.*, 47: 107-119.

OBANDO C., BAULLE C., PEDRIQUE C., VERACIERTA C., BELAK S., MERZA M. and MORENO LOPEZ J. (1999). Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. *Act. Vet. Scan.*, 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. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1237-1240.

OEDEGAARD O.E.D. and KROGSRUD J. (1977). A field outbreak caused by bovine respiratory syncytial virus [Norway] *Acta. Vet. Scand.*, 18: 429-431.

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. *J. Virol.*, 63: 2019-2029.

ORVELL C., NORRBY E. and MUFSON M.A. (1987). Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J Gen Virol.*, 68: 3125-35.

OSORIO F.A., ANDERSON G.A., SANDERS J. and GROTELUESCHEN D. (1989). Detection of bovine respiratory syncytial virus using a heterologous antigen-capture enzyme immunoassay. *J. Vet Diagn. Invest.*, 1: 210-214.

PACCAUD M.F. and JACQUIER C.L. (1970). A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Archiv. für dieges. virusfor.*, 30: 327-342.

PASTEY M.K. and SAMAL S.K. (1997). Analyses of bovine respiratory syncytial virus envelop glycoproteins in cell fusion. *J.Gen. Virol.*, 76: 193-197.

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 polimerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.*, 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. *Vet. Rec.*, 142: 385-391.

PEIXOTO P.V., MOTA R.A., BRITO M.F., CORBELLINI L.G., DRIEMEIER D. and DE SOUZA M.I. (2000). Infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. *Pesq. Vet. Brás*, 20 (4).

PIRIE H.N., PETRIE L., ALLAN E.M. and PRINGLE C.R. (1981). Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.*, 109: 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. *Am J Vet Res.*, 38: 1341-1343.

PROZZI D., WALRAVENS K., LANGEDIJK J.P., DAUS F., KRAMPS J.A. and LETESSON J.J. (1997). Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 78: 359-66.

ROSENQUIST B.D. (1974). Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory diseases. *J. Infect. Dis.*, 130: 177-182.

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. *J. Gen. Virol.*, 72: 1715-1720.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F. and MANIATIS T. (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd. (Cold Spring Harbor, NY, Cold Harbor Laboratory Press).

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. (1996). Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strain detected in lung tissues, *Vet. Microbiol.*, 53: 253-260.

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, *Vacc.*, 15: 1908-1916.

SHARMA A.K. and WOLDEHIWET Z. (1990). Bovine respiratory syncytial virus: a review. *Vet. Bulletin.*, 61: 1117-1131.

SMITH M.H., FREY M.L. and DIERKS R.E. (1975). Isolation, characterization and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.*, 47: 237-247.

STINE L.C. HOPPE D.K. and CLAYTON L.K. (1997). Sequence conservation in attachment glycoproteins and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. *Vet. Microbiol.*, 54:201-221.

SULLENDER W.M. and WERTZ G.W. (1991). The unusual attachment glycoprotein of the respiratory syncytial viruses. Structure, maturation and role in immunity In: Kingsbury D.W. *The Paramixoviruses*. Plenum Press New York, p. 383-406.

TAKEUCHI K., TANABAYASHI K, HISHIYAMA M. and YAMADA A. (1996). The mumps virus SH protein is a membrane protein and not essential for virus growth. *Virol.*, 225: 156-162.

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. *South. Asian J. Trop. Med. Public Health.*, 26: 685-688.

THOMAS L.H. and STOTT E.J. (1981). Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in the bovine respiratory tract by immunofluorescence. *Vet. Rec.*, 108: 432-435.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G. and GIBSON T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.

TRUDEL M., NADON F., SIMARD C., BÉLANGER F., ALAIN R., SÉGUIN C. and LUSSIER G. (1989). Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch Virol.*, 107: 141-149.

VALARCHER J.F., BOURHY H., GELFI J. and SCHELCHER F. (1999). Evaluation of 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.

UTTENTHAL A., LARSEN L.E., PHILIPSEN J.S., TJØRNEHØJ K., VIUFF B., NIELSEN K.H. and NIELSEN T.K. (2000). Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. *Vet. Res.*, 76: 329-341.

VALARCHER J.F., SCHELCHER F. and BOURHY H. (2000) Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol.*, 74: 10714-10728.

VALARCER 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 virus infections. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1858-1862.

VALENTOVA V. ANTONIS A.F.G. and KOVARCIK K. (2005). Restriction enzyme analysis of RT-PCR amplicons as a rapid method for detection of genetic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. *Vet. Res.*, 108: 1-12.

VAN DER POEL W.H., MOURITS M.C., NIELEN M., FRANKENA K., VAN OIRSCHOIT J.T. and SCHUKKEN Y.H. (1995). Bovine respiratory syncytial virus reinfections and decreased milk yield in dairy cattle. *Vet Q.*, 17(3):77-81.

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 infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Arch Virol.*, 133:309-21.

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. *J. Clin. Microbiol.*, 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. *Vet. Pathol.*, 33: 383-390.

WALSH E.E., COTE P.J., FERNIE B.F., SCHLESINGER J.J. and BRANDRISS M.W. (1986). Analysis of the respiratory syncytial virus fusion protein using monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 67: 505-513.

WALSH E.E., SCHLESINGER J.J. and BRANDRISS M.W. (1984). Purification and characterization of GP90, one of the envelop glycoproteins of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 65: 761-767.

WALTER A. and DOWNING L.A. (1993). Respiratory syncytial virus interactions with host cell membrane : an enigma among the paramixoviridae. In: Bentz J (ed), *Viral fusion mechanisms*. CRC. Press, Boca Raton, Florida, p. 364-383.

WARD K.A., LAMBDEN P.R., OGILVIE M.M. and WATT P.J. (1983). Antibodies to respiratory syncytial virus polypeptides and their significance in human infection. *J Gen Virol.*, 64: 1867-76.

WECHSLER S.L., LAMBERT D.M., GALINSKI M.S., HEINEKE B.E., LAMBERT A.L., MINK M., ROCHOVANSKY O.M. and PONS M.W. (1985). A simple method for increase recovery of purified paramyxovirus virions. *J. Virol. Methods.*, 12: 179-182.

WELLEMANS G. and LEUNEN J. (1971). L'importance du virus v220/69 dans les troubles respiratoires des veaux em Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 115: 35-39.

WERTZ G.W., COLLINS P.L., HUANG Y., GRUBER C., LEVINE S. and BALL L.A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 4075-4079.

WERTZ G.W., KRIEGER M. and BALL L.A. (1989). Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosilation. *J. Virol.*, 63:4767-4776.

WEST K., BOGDAN J., HAMEL A., NAYAR G., MORLEY P.S., HAINES D.M. and ELLIS J.A. (1998). A comparison of diagnostic methods for detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimes. *Can. J. Vet. Res.*, 62: 245-250.

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. *Deutsc.Tieraraztl. Wochen.*, 107: 456-466.

WOOLUMS A.R., ANDERSON M.L., GUNTHER R.A., SCHELEGLE E.S., LAROCHELLE D.R., SINGER R.S., BOYLE G.A., FRIEBERTSHAUSER K.E. and GERSHWIN L.J. (1999). Evaluation of severe disease induced by aerosol inoculation of calves with bovine respiratory syncytial virus. *Am. J. Vet. Res.*, 60: 473-80.

YATEGASHI G., SEIMIYA Y.M. and TSUNEMITSU H.. (2005). Genetic and antigenic analyses of bovine respiratory syncytial virus detected in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 67: 145-150.

ZAHA A., *Biologia Molecular básica* (2000) 2ª edição, Editora Mercado, Porto Alegre. p. 336.

<http://www.paginarural.com.br/>