



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

**ISOLAMENTO E INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DO
VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV)
NO BRASIL**

JACQUELINE CAMPALANS BARNIER

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Microbiologia.

Este exemplar corresponde à redação final da tese (art. 1º, § 1º) candidato a) *Jacqueline Campalans Barnier*
e aprovada pela Comissão Julgadora.
12/7/96

CAMPINAS,
Estado de São Paulo
JULHO/1996



9706131

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	UNICAMP
	C15i
V.	Ex.
TOMBO BC/	30.679
PROC.	28.197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29.10.197
N.º CPD	

CM-00099315-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C15i

Campalans Barnier, Jacqueline Filomena
Isolamento viral e investigação sorológica do vírus
respiratório sincicial bovino (BRSV) no Brasil / Jacqueline
Filomena Campalans Barnier. - - Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Clarice Weis Arns.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Sorologia veterinária. 2. Vírus. 3. Bovino. I. Arns,
Clarice Weis. II. Universidade Estadual de Campinas. Insti-
tuto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 12 de julho de 1996

BANCA EXAMINADORA:

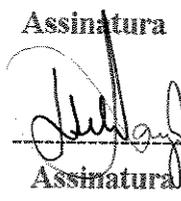
TITULARES:

Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS (Orientador)



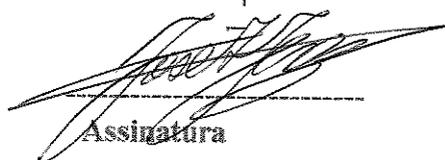
Assinatura

Prof. Dr. HÉLIO LANGONI



Assinatura

Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO JEREZ



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA



Assinatura

O presente trabalho foi

desenvolvido no Laboratório de Virologia

do Departamento de Microbiologia e

Imunologia do Instituto de Biologia

UNICAMP, Campinas-SP.

A mis padres

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a. Dr^a. Clarice Weis Arns pela, orientação, colaboração, confiança e amizade, no trabalho desenvolvido.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido durante o curso.
- À Sub-Comissão de Pós-Graduação do Curso de Microbiologia e a Comissão de Pós-Graduação do Instituto de Biologia pelo auxílio recebido durante o curso de mestrado.
- Ao Laboratório Estadual de Veterinária de Stuttgart (Alemanha), pelo fornecimento da amostra padrão do vírus para este estudo e as placas de ELISA.
- Ao Instituto Biológico de São Paulo e ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pelo fornecimento das amostras de soros.
- Aos Médicos Veterinários de campo que gentilmente forneceram as amostras (soros e material para isolamento).
- Ao Prof. Dr. Aureo T. Yamada, do Centro de Microscopia Eletrônica da UNICAMP, Campinas, pelo auxílio na Microscopia Eletrônica e pela realização das fotomicrografias eletrônicas.
- Ao Dr. Francisco Fasano, do Laboratório de Reprodução do CAISM, Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela colaboração na realização das fotografias das culturas celulares.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP pela amizade e confiança.
- Aos colegas de pós-graduação deste Instituto pelo grande apoio e auxílio técnico fornecido.

RESUMO

O vírus respiratório sincicial dos bovinos (BRSV) produz uma doença respiratória que está amplamente distribuída no mundo e causa severas perdas econômicas nos países produtores. Com o objetivo de determinar se as doenças respiratórias que afetam os bovinos no Brasil, tem alguma relação com o BRSV, realizou-se um estudo sorológico e isolamento viral. Foram analisadas 864 amostras de soros procedentes dos Estados do sul e sudeste do país (RS, PR, SP, MS, RJ e MG), usando os testes sorológicos de soroneutralização (TSN) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes mostraram um alto nível de positividade anti-BRSV (68% e 75% respectivamente) com diferença significativa a $p < 0.05\%$. Não foram detectadas grandes diferenças entre as regiões estudadas, mas se observa uma ligeira tendência a maior soropositividade com a maior latitude. Animais jovens apresentaram índices maiores de soropositividade (média 85%), sendo o TSN o mais sensível nessa faixa etária, refletindo a maior susceptibilidade a infecções primárias dos bezerros em relação a animais adultos. O isolamento viral foi realizado a partir de 33 amostras de secreções nasotraqueais inoculadas sucessivamente em cultura de células CER e MDBK, caracterizado por testes físico-químicos e observações morfológicas ao microscópio eletrônico. Foi também realizado um teste de TSN cruzada com duas amostras BRSV padrões e seus respectivos antisoros. Os resultados demonstraram que a amostra isolada é um vírus pleomórfico, espiculado, de RNA, envelopado, termolábil e não hemoaglutinante. O TSN cruzada mostrou que existe uma semelhança antigênica entre a amostra isolada no Brasil com as duas cepas BRSV padrões estudadas.

ABSTRACT

The bovine respiratory syncytial virus (BRSV) causes a respiratory disease which is widely distributed worldwide and causes economic losses in the producing countries. A serological and viral isolation study was carried out in order to determine whether the respiratory diseases that affect the cattle in Brazil have any relation with BRSV. Eight hundred sixty four serum samples proceeding from the southern states (Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro and Minas Gerais) were analyzed using the serological tests of seroneutralization (TSN) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Both tests showed a high level of positivity anti BRSV (68% and 75% respectively) with significant difference ($p < 0.05$). There were not big differences between the regions studied, however a slight tendency to higher seropositivity was observed the bigger the latitude. Young animals showed higher index of seropositivity (mean 85%), the TSN being more sensible in this age range, reflecting the higher susceptibility to primary infections of calves in relation to adult animals. Viral isolation was carried out in 33 samples of nasotracheal inoculated successively in CER and MDBK cell culture, characterized by physical-chemical tests and morphological observation at the electronic microscope. A test of crossed TSN with pattern BRSV strains and their respective anti-serum was carried out. The results showed that the sample isolated is a pleomorphic virus, spicular, of RNA, enveloped, thermolabile, and not hemagglutinating. The crossed TSN showed that there is a antigenic similarity between the strain isolated in Brazil and two pattern BRSV strains studied.

CONTEÚDO

	Páginas
I. -INTRODUÇÃO	(1)
II. - REVISÃO DE LITERATURA	(4)
1 - Epidemiologia	(9)
2 - Diagnóstico	(15)
3 - Sintomas Clínicos	(21)
4 - Tratamento e controle da Infecção	(23)
III. - MATERIAL E MÉTODOS	(24)
1 - Obtenção das Amostras	(24)
2 - Amostra Viral	(25)
3 - Cultivos Celulares	(25)
4 - Produção de antígeno Bruto	(26)
5 - Titulação Viral	(27)
6 - Detecção de anticorpos anti-BRSV	(28)
6.1 - Obtenção de soros de bovinos para os testes sorológicos	(28)
6.2 - Teste de soroneutralização (TSN)	(31)
6.3 - Ensaio imunoenzimático ("enzyme-linked immunosorbent assay"- ELISA)	(32)
7 - Isolamento viral	(34)
7.1 - Imunofluorescência direta	(36)
7.2 - Inoculação em cultivo celular	(37)
7.2.1 - Preparo do inóculo viral	(37)
7.2.2 - Inoculação em sistemas celulares	(38)
7.3 - Caracterização viral	(39)
7.3.1 -Propriedades físico-químicas	(39)
7.3.1.1 - Sensibilidade ao clorofórmio	(40)
7.3.1.2 - Sensibilidade à temperatura	(40)
7.3.1.3 - Efeito de 5-iodo-2-deoxiuridina (IUDR)	(41)

7.3.1.4 - Teste de estabilidade ao Ph	(42)
7.3.1.5 - Atividade hemoaglutinante	(42)
7.3.1.6 - Teste de hemoadsorção	(43)
7.3.2 - Soroneutralização cruzada	(44)
7.3.3 - Purificação viral	(45)
7.3.4 - Microscopia eletrônica	(46)
8. Análises estatísticas	(46)
IV.- RESULTADOS	(47)
1 - Testes sorológicos	(47)
2 - Isolamento viral	(55)
3 - Caracterização viral	(61)
4 - Microscopia eletrônica	(66)
V. - DISCUSSÃO	(68)
VI. - CONCLUSÕES	(78)
VII.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	(80)

I. INTRODUÇÃO

Fatos recentes relacionados à Encefalopatia Espongiforme Bovina, a "síndrome da vaca louca", atingindo rebanhos na Inglaterra, colocam em destaque a importância que pode ter na economia de qualquer país, uma doença pouco conhecida e não controlada. Fatos como esse mostram a importância do estudo de doenças, desde o momento de seu aparecimento até o seu controle, principalmente as enfermidades que podem alterar o sistema imunológico, dificultando a defesa do organismo contra outras enfermidades.

O vírus respiratório sincicial dos bovinos (Bovine Respiratory Syncytial Virus - BRSV) é uma doença amplamente distribuída, e que produz enormes perdas na criação comercial do rebanho bovino, chegando em casos extremos a atingir mortalidades de até 30% entre bezerros de 0 -6 meses de idade (BRYSON et al., 1991).

No Brasil, há pouca informação sobre a ocorrência deste agente nos rebanhos bovinos e ovinos. Porém, dada a importância que ela tem em vários países, seria provável que a enfermidade estivesse presente e que seus sintomas fossem confundidos com outras doenças respiratórias de sintomatologia semelhante.

O Brasil é o terceiro país produtor de carne bovina, possuindo atualmente um rebanho de 143,7 milhões de cabeças contribuindo com 17,1% da produção mundial. Em 1995, a sua produção foi de 4,6 milhões de toneladas, ocupando o sexto lugar entre os países exportadores de carne bovina. Também é o quarto país consumidor (10% do total mundial), sendo o consumo *per capita* de 26,3 kg/ano (Fonte: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos/USDA).

Estes dados mostram a importância do controle rigoroso de qualquer fator que possa alterar esse panorama e causar perdas na produção. Por sua vez, deve-se permitir um aumento na produção de acordo com o aumento da demanda mundial, que em 1995 foi estimada 11,5% superior a 1994. Porém, em 1995 a produção nacional só superou em 2,2% a registrada no ano anterior (PEETZ et al., 1995).

Com esses antecedentes, é importante a realização de um estudo sistemático, afim de se conhecer a realidade brasileira em relação ao BRSV. Para tanto, é preciso aprofundar os estudos da ocorrência, prevalência, incidência e distribuição sazonal desta enfermidade na população bovina, bem como, determinar a mortalidade e os prejuízos à produção. Tais

conhecimentos são fundamentais para evitar a disseminação do agente, contribuindo com o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle da doença em nosso país.

Considerando a importância da doença causada pelo BRSV, foram estabelecidos os seguintes objetivos neste trabalho:

- Confirmar se as doenças respiratórias que afetam os bovinos no Brasil tem alguma relação com BRSV, através de análises de soros obtidos de diferentes regiões do país por detecção dos anticorpos anti-BRSV, utilizando-se das técnicas de soroneutralização e ELISA.

- Isolar o vírus a partir de amostras de secreções nasotraqueais de animais suspeitos, através de inoculações por passagens sucessivas em culturas celulares.

- Caracterização do agente viral isolado por microscopia eletrônica e propriedades físico-químicas e biológicas, tais como: termoestabilidade, sensibilidade ao clorofórmio, estabilidade em pH, ação do 5-iodo-2'-deoxy-uridina (IUDR), hemoaglutinação, hemoadsorção.

II. REVISÃO DE LITERATURA

O vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) é um dos agentes mais importantes nas enfermidades respiratórias e está distribuído mundialmente, causando severas infecções (SAMAL & ZAMORA, 1991). O BRSV foi primeiramente isolado na Suíça em 1970, por PACCAUD & JACQUIER, na Europa por MOHANTY et al., (1975) e SMITH et al., (1975), no Japão por INABA et al., (1972) e nos Estados Unidos por ROSENQUIST, (1974) e ROSSI & KIESEL, (1974).

O vírus respiratório sincicial bovino foi descrito pela primeira vez em 1970 na Suíça. Esta enfermidade está distribuída mundialmente (Tabela 1), levando a grandes perdas econômicas. Nos países onde a infecção parece ser um evento comum, é alta a porcentagem de bovinos com anticorpos para BRSV, como é demonstrado na França com 50% soropositivos, até 90% na Inglaterra, e entre 65% até 81% nos Estados Unidos (AMES, 1993).

TABELA 1 - Países onde o vírus BRSV foi isolado

PAÍS	AUTOR	ANO
SUIÇA	PACCAUD & JACQUIER	1970
JAPÃO	INABA et al.	1970
HUNGRIA	KOVES & BARTHA	1975
BÉLGICA	WELLEMANS & LEUNEN	1975
HOLANDA	HOLZHAUER & van NIEUWSTADT	1976
REINO UNIDO	STOTT et al.	1978
ESTADOS UNIDOS	BOHLENDER et al.	1982

As infecções respiratórias que afetam os bovinos jovens, causam perdas econômicas relevantes. Somente no Reino Unido, estima-se um prejuízo de 50 milhões de libras por ano (BRYSON et al., 1991 e SHARMA & WOLDEHIWET, 1992).

Muitos agentes estão presentes no desenvolvimento destas infecções. Entre eles *Pasteurella haemolitica* tipo A-1, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* e viroses como *Herpes virus* (Bovine Herpes Virus- BHV1), *Pneumovirus* (Bovine Respiratory Syncytial Virus-BRSV), *Parainfluenza* tipo 3 (Pi-3) e *Adenovirus* dos subgrupos A e B (BAV-A e BAV-B) (DURHAM et al.,1991).

O BRSV é classificado como membro do gênero *Pneumovirus* da família *Paramyxoviridae*. O mesmo gênero também estão incluídos os vírus da doença respiratória sincicial humana (HRSV), pneumonia dos camundongos, rinotraqueíte dos perus (TRT) e síndrome da cabeça inchada das galinhas (SHS), STOTT & TAYLOR, (1985) e PICAULT et al., (1989).

Os BRSV são arredondados, mas bastante pleomórficos, medindo 80 a 500 nm e envelope com projeções de 12 nm. A maioria das partículas virais são incompletas e provavelmente não infecciosas (MALLIPEDDI 1990).

A infectividade é perdida por ação do clorofórmio, tripsina (0,25%) e dioxicolato de sódio (0,1%). Inativa-se a pH 3,0 , é estável a pH 4,0 , termolábil, com vida média de 0,5

a 2,8 minutos a 56°C, de 1 a 7 horas a 37°C e estável à -50°C por vários meses (STOTT & TAYLOR, 1985 e MALLIPEDDI, 1990).

O genoma viral codifica 10 proteínas, 8 estruturais e 2 não estruturais. Existem duas glicoproteínas maiores, G e F, sendo a glicoproteína G responsável pela adsorção da partícula viral à célula hospedeira e a glicoproteína F promove a penetração da partícula à célula hospedeira e dispersão do vírus entre as células por fusão celular (BAKER & VELICER, 1991). Além destes componentes virais, possuem ainda fosfoproteínas (P), proteínas do nucleocápside (N), proteínas matrizes (M e M2), proteínas hidrofóbicas menores (SH), proteínas maiores (L) e proteínas não estruturais (1B e 1C) (MALLIPEDDI et al., 1990).

A sequência de nucleotídeos do vírus sincicial humano já foi determinada, porém no vírus de bovinos o conhecimento da sequência dos nucleotídeos só está determinada nas proteínas G, F, N, M, M2, e SH (SAMAL & ZAMORA, 1991). BRSV e HRSV possuem semelhanças na sequência de nucleotídeos e estão antigênicamente relacionados ao nível das proteínas F, M, M2, N e P, mas com maior diferença antigênica na proteína G (LERCH et al., 1989; OERVELL et al., 1987; TAYLOR et al., 1984).

Estudos comparativos demonstraram que as proteínas dos dois vírus (bovino e humano) possuem semelhanças de 30% na proteína G, 38% na proteína SH e 80 a 93% nas proteínas N, M, M2, e F (ZAMORA, 1992). Existe também evidências na existência de dois subgrupos de BRSV baseados na glicoproteína G (FURZE et al. 1994).

As 4 proteínas virais que parecem induzir a maior resposta de anticorpos estão associadas com o envelope viral (G, F, M, M2), e são encontradas nas membranas plasmáticas das células durante a infecção. Observou-se que a glicoproteína F é mais imunogênica que a glicoproteína G e os anticorpos encontrados em infecções adquiridas naturalmente são principalmente contra a proteína F. Células expressando proteínas F, M2 e N são alvos para linfócitos T, enquanto que o mesmo não ocorre com as células expressando proteína G (KELLING, 1993).

1. EPIDEMIOLOGIA

O BRSV tem um importante papel como agente iniciador do complexo de doenças respiratórias em bovinos (STEINHAGEN & HUEBERT, 1995; AMES, 1993). A infecção com BRSV é um evento comum, corroborado por altas percentagens de animais com títulos de anticorpos para BRSV. Nos Estados Unidos a prevalência tem sido encontrada entre 65 a 81% da população bovina (AMES, 1993).

Na Europa, surtos de enfermidades associados com o BRSV aparecem anualmente, principalmente nos meses frios, de outubro a janeiro (BRYSON et al., 1979; STOTT et al., 1980; VERHOEFF & VAN NIEUWSTADT, 1984; KIMMAN et al., 1988), favorecendo a disseminação do vírus. Em outras estações, infecções primárias são raras, mas as reinfecções são comuns, atuando estes animais como fonte de infecção dos vírus (VAN DER POEL et al., 1993). A doença causa muitas vezes pneumonias e frequentemente está associada com infecções bacterianas secundárias (SHARMA & WOLDEHIWET, 1990a & 1992b) incluindo *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus somnus* (BELKNAP, 1993). Isto ocorre provavelmente, porque a infecção com o BRSV altera as subpopulações de linfócitos e também a resposta destas células frente a outros

antígenos, (VERHOEFF et al., 1988). Observou-se que o BRSV inoculado em bezerros altera funções fagocíticas associadas a macrófagos alveolares (OLCHOWY et al., 1994).

O BRSV é espécie específico, sendo o bovino o principal portador, enquanto ovinos são susceptíveis apenas à infecção experimental uma vez que não existem relatos de infecção natural (MASOT et al., 1993; SHARMA & WOLDEHIWET, 1990b). As infecções em humanos e em bovinos apesar de terem semelhanças antigênicas, apresentam diferenças nas infecções experimentais "in vitro" (MATUMOTO et al., 1974) bem como, nas reações com anticorpos monoclonais (OERVELL et al., 1987). Não há relatos de infecções em pessoas associadas a surtos de BRSV em bovinos e parece improvável a possibilidade de transmissão interespecie (AMES, 1993).

Há evidências indicando a existência de infecções latentes, pois o vírus já foi isolado a partir de animais assintomáticos como também de animais infectados 7 meses antes do aparecimento dos sintomas. Isso explicaria os surtos que ocorrem em animais isolados. Também os bezerros podem ser infectados ao nascimento e a infecção permanecer latente até que alguma mudança nas condições de vida leve ao aparecimento da doença (AMES, 1993).

A via de eliminação são as secreções aéreas e a porta de entrada, as mucosas do aparelho respiratório. Diferentes práticas de manejo, tais como, confinamento e agrupamentos de bovinos de diferentes idades podem alterar a faixa etária na qual a doença aparece nos animais sensíveis. Devido ao curto período de incubação (de 3 a 5 dias), resulta numa rápida dispersão do vírus no rebanho (AMES, 1993; DURHAM et al., 1991).

O BRSV é mais frequentemente diagnosticado em bezerros de até 6 meses de idade (MOHANTY et al., 1975). O diagnóstico baseia-se na pesquisa de anticorpos específicos e é realizado por técnicas sorológicas que permitem detectar um aumento significativo no título de anticorpos específicos. Em bezerros de até 3 meses de idade, esta condição é menos clara, supostamente porque os anticorpos maternos interferem no diagnóstico sorológico (KIMMAN et al., 1988).

Quando a doença acomete indivíduos de 2 semanas a 3 meses de idade, a manifestação clínica da enfermidade está inversamente relacionada com o nível de anticorpos maternos específicos presentes nos bezerros (AL-DARRAJI et al., 1982; KIMMAN et al., 1988). Os anticorpos maternos interferem também na resposta à vacinação. Bezerros com imunidade passivamente adquirida contra o BRSV tiveram menores taxas de soroconversão após a vacinação, quando comparados a bezerros

desprovidos de anticorpos (VAN DONKERSGOED et al., 1991). Esse fato associado a maior severidade da doença entre os 0 e 6 meses de idade, deve ser considerado no desenvolvimento de vacinas com proteção mais adequada durante o período de maior susceptibilidade, já que a presença de imunoglobulinas da classe IgG, inclusive em altos títulos, não protegem totalmente em caso de uma epizootia (WESTENBRINK & KIMMAN, 1987).

Não há relatos de diferenças na susceptibilidade entre machos e fêmeas, mas observa-se diferenças entre as raças bovinas. A mortalidade depende do número de animais que desenvolvem a doença na forma aguda, ou do número de animais que desenvolvem infecções bacterianas secundárias (AMES, 1993). A morbidade geralmente alcança 20% do rebanho e as infecções naturais não produzem imunidade prolongada (BAKER & VELICER, 1991). As reinfecções parecem ser comuns, pois STOTT et al. (1980) observaram que os bezerros eram susceptíveis ao BRSV após 3 semanas da infecção primária.

Em ovelhas susceptíveis, as reinfecções desenvolvem sintomas medianos que resulta em mudanças nas populações celulares do sangue periférico. Existiria um rápido incremento no número de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B (LCA p220⁺) e as proporções de

linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD4-CD8- seriam significativamente diminuídas (SHARMA & WOLDEHIWET, 1992b). Esse fato parece explicar o incremento na susceptibilidade à infecção bacteriana secundária após a infecção com BRSV, que é frequente e pode ser causada por imunossupressão não específica (SHARMA & WOLDEHIWET, 1991 & 1990b).

Pela dificuldade de se reproduzir experimentalmente a doença em bovinos, não há estudos do efeito da infecção na resposta imune-celular (SHARMA & WOLDEHIWET, 1992a), mas uma situação parecida ocorreria, o que explicaria as infecções bacterianas que estão acompanhando a doença. Estas infecções respiratórias associadas a vírus e bactérias são frequentes; o vírus deprime o potencial fagocítico e bactericida dos macrófagos alveolares, embora exista evidência indicando que macrófagos alveolares não são permissivos à replicação do BRSV (SHARMA & WOLDEHIWET, 1991; SCHRIJVER et al., 1995).

Em rebanho leiteiro, as reinfecções parecem ter um pequeno efeito na produção de leite e não estando associadas com perdas importantes na produção leiteira (VAN DER POEL et al., 1993).

No Brasil, o único relato em relação à infecções de BRSV foi obtido mediante testes de imunofluorescência direta à partir de amostras de pulmão e traquéia de bovinos procedentes de matadouros do Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 1993). Nesse estudo observou-se que 5,13% das amostras foram positivas ao BRSV.

2. DIAGNÓSTICO

O BRSV é um importante patógeno de bovinos, sendo a sua detecção, ainda um desafio. Dificuldades são frequentes no diagnóstico laboratorial incluindo os problemas no seu isolamento e qualidade dos reagentes utilizados. Além disso, nos bezerros a resposta sorológica é influenciada por anticorpos maternos (DUBOVI, 1993).

Comumente, o diagnóstico é baseado em provas sorológicas tais como soroneutralização, fixação do complemento, imunofluorescência indireta e mais recentemente ELISA (WESTENBRINK & KIMMAN, 1987).

O isolamento do BRSV em cultura de células é um procedimento pouco indicado no diagnóstico, mesmo em amostras contendo altas concentrações de BRSV. Na maioria das vezes, o BRSV é isolado durante procedimentos para o isolamento de outros patógenos, mais do que para o BRSV especificamente (DUBOVI, 1993). Para o seu isolamento, pode-se usar amostras de tecido respiratório devido a sua replicação em células epiteliais do trato respiratório, não sendo encontrado no sangue, linfonodos, rins, baço e fetos abortados.

A imunofluorescência direta (TIF) para detecção de antígeno é um teste rápido e sensível para diagnóstico de infecção com BRSV (GILLETTE, 1983). No entanto, sua sensibilidade depende da qualidade do anticorpo usado (anticorpos policlonais podem impossibilitar a detecção do BRSV). Alguns sítios antigênicos em proteínas BRSV estão

também presentes nas mesmas proteínas em BRSV com um modelo de reatividade cruzada. Por esta razão, anticorpos monoclonais desenvolvidos para HRSV estão sendo usados nos testes para detectar BRSV. Do mesmo modo, anticorpos monoclonais desenvolvidos contra a proteína F do BRSV, neutralizam o vírus, inibem a fusão celular e reconhecem cepas de RSV bovinas e humanas (MATHEISE et al., 1995). Isto permite que testes comerciais para HRSV sejam usados igualmente para o BRSV (DUBOVI, 1993).

O teste sorológico padrão para anticorpos específicos contra BRSV é o teste de soroneutralização, realizado em microplacas e leva em média de 5 a 7 dias (DUBOVI, 1993). Outros testes como a fixação de complemento, TIF para detecção de anticorpos e imunodifusão têm sido desenvolvidos, porém, pouco utilizados.

O título de neutralização viral é dado pela recíproca da mais alta diluição do soro, capaz de inibir o efeito citopático de 100 TCID 50% do vírus (AL-DARRAJI et al., 1982).

O uso de ELISA para estudar as respostas sorológicas à viroses respiratórias em bovinos foi introduzido por GILLETTE (1983), demonstrando sensibilidade e especificidade bem como adaptação à automação (FLORENT & MARNEFFE, 1986). A alta prevalência de título de anticorpos para todas as viroses respiratórias, reflete a ampla

dispersão natural destes microrganismos (KIMMAN et al., 1987; COLLINS, 1993). O ELISA tem a vantagem de ser mais rápido, detectar a resposta de IgM e eliminar o problema associado a diagnósticos de bezerros com anticorpos maternos, os quais não apresentam diferenças significativas nos níveis de anticorpos pré e pós-infecção devido a interferência desses anticorpos (WESTENBRINK & KIMMAN, 1987; DUBOVI, 1993). Além disso, outros testes imunoenzimáticos podem ser feitos selecionando o tipo de imunoglobulina a ser usada (M, G, E, A) segundo o interesse do pesquisador.

WESTENBRINK & KIMMAN (1987), estudando infecções naturais ou induzidas anti-BRSV detectaram altos níveis de IgG e IgM. A resposta de IgM era detectada inicialmente no 11º dia pós-inoculação (PI), e atingia o máximo no 13º dia PI, chegando a ser indetectável ao redor do 28º dia PI. A resposta de IgG também era detectada no 11º dia PI, mas a resposta máxima era próxima ao 23º dia PI, sendo que os títulos permaneciam altos até 80 dias PI. Em infecções naturais, os padrões de IgM e IgG eram similares aos observados em bezerros infectados experimentalmente.

A utilização do ELISA-IgM para diagnóstico do BRSV demonstrou ser mais eficiente que ELISA-IgG nos soros colhidos até 10 dias após a infecção, porque o

incremento dos títulos de IgG não ocorriam, levando a um diagnóstico de falso negativo (WESTENBRINK & KIMMAN, 1987).

SHARMA E WOLDEHIWET (1991), utilizando o ELISA para quantificar níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA em secreções nasais, amostras de soros e fluídos pulmonares de ovelhas infectadas com o vírus RSV, demonstraram que os anticorpos IgA e IgM já eram detectados no 6º dia, enquanto na IgG do 6º ao décimo 10º dia, resultados esses encontrados também por MASOT et al. (1993). Os anticorpos IgA permaneciam até ao 20º dia, enquanto que IgM e IgG continuavam até 35º a 60º dia após a infecção. Também demonstraram que a infecção de BRSV acompanhada de *Pasteurella haemolytica* reduzia o número de linfócitos B CD5+, CD4+ e LCAP220+ causada por BRSV, e tinham significativamente quantidades mais baixas de anticorpos neutralizantes a BRSV do que aquelas obtidas de ovelhas infectadas só com BRSV.

Com esses dados é evidente que os resultados e a sensibilidade do ensaio imunoenzimático são influenciados pelo momento em que a amostra de soro é colhida. Assim mesmo, infecções em bezerros com anticorpos maternos podem ser avaliados por ELISA-IgM (WESTENBRINK & KIMMAN, 1987).

Embora estudos sorológicos tenham mostrado alta prevalência para o BRSV, comparativamente poucos animais apresentam manifestações clínicas (BAKER et al., 1985 e STEWART & GERSHWIN, 1989). É discutível se a causa da lesão do BRSV são as dificuldades mecânicas derivadas da constrição das vias aéreas, respostas imunológicas devido a complexos imunes, ou hipersensibilidade mediada por IgE (STEWART & GERSHWIN, 1989; MASOT et al., 1993). A hipersensibilidade mediada por IgE tem sido implicada na patogênese da infecção que segue a doença respiratória, esperando-se altos níveis de anticorpos específicos da classe IgE para BRSV em animais com a manifestação severa da enfermidade. Existe uma forte correlação entre a resposta sintomática a BRSV e os níveis de IgE específica a BRSV no soro (STEWART & GERSHWIN, 1989).

Recentemente, foi desenvolvido por OBERST et al., (1993), um teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar sequências de nucleotídeos dos genes do BRSV, sendo um teste de diagnóstico rápido e específico. Porém, é necessário ainda um avanço tecnológico para se fazer este tipo de diagnóstico laboratorial na rotina, (DUBOVI, 1993).

Se a doença não foi diagnosticada em vida, pode ser útil a informação obtida após a necropsia a partir do exame histopatológico. Tipicamente ocorre uma pneumonia

intersticial difusa com enfisema e edema intersticial; em muitos casos a enfermidade é complicada por áreas de infecções bacterianas secundárias. Os pulmões podem conter numerosas áreas hemorrágicas, e com necrose celular epitelial. Inclusões intracitoplasmáticas estão presentes nas células infectadas, com o mesmo padrão visto no teste TIF (DUBOVI, 1993).

3. SINTOMAS CLÍNICOS

Os sintomas clínicos desta enfermidade são semelhantes a outras doenças respiratórias, tais como aumento da temperatura, apatia, inapetência. Podem desenvolver pneumonia intersticial, com evolução para broncopneumonia, apresentando rinite e tosse. Por isso, pode ser difícil de se detectar a infecção nos primeiros estágios, onde a doença produz uma sintomatologia de forma mais aguda e menos persistente (KIMMAN et al., 1988; JACOBS & EDINGTON, 1975). Na forma aguda, o animal afetado comumente apresenta tosse seca, dispnéia severa devido a edema e enfisema pulmonar sendo notável a expiração abdominal, (BELKNAP, 1993).

A infecção pode durar de 3 a 10 dias, dependendo das infecções secundárias. Nos casos acompanhados de broncopneumonia, a taxa de mortalidade é elevada (PIRIE et al., 1981). Aos exames de necrópsia, os tecidos se caracterizam por apresentar áreas com falta de dilatação nos bronquíolos necrosados. As complicações incluem edema intersticial, enfisema intersticial e uma pneumonia catarral ou fibrinosa causada por uma invasão bacteriana secundária. A quantidade de gás presente no sangue revela uma severa hipoxia em bezerros afetados (SHARMA & WOLDEHIWET, 1990a & 1992a).

Apesar da severa manifestação da enfermidade em infecções naturais, tem sido difícil reproduzi-la experimentalmente em bezerras (VERHOEFF et al., 1988; VAN DEN INGH et al., 1982). Por esta razão, existem muitos estudos experimentais utilizando-se ovelhas, por elas apresentarem similaridade fisiológica com os bovinos, susceptibilidade, baixo custo e menor período de incubação (SHARMA et al., 1990a & VERHOEFF et al., 1985).

4. TRATAMENTO E CONTROLE DA INFECÇÃO

O tratamento indicado após o diagnóstico da doença pode ser realizado principalmente por terapias antimicrobianas (para prevenir infecção bacteriana secundária) e terapia anti-inflamatória. Futuramente poderão ser úteis a terapia antiviral, terapia imunomoduladora e imunização passiva.

Existem vacinas de vírus atenuados, vivos modificados (VVM) e vírus inativados. As vacinas atenuadas produzem uma resposta de anticorpos neutralizantes maior e com duração mais longa do que vacinas inativadas, mas tem o potencial de reverter a uma forma virulenta e causar a doença clínica (KELLING, 1993; ELLIS et al., 1992). A vacina inativada geralmente tem capacidade limitada para produzir a resposta das células T citotóxicas, as quais tem um importante papel na recuperação e resistência à reinfecção. Por outro lado, vacinas atenuadas não são efetivas em bezerros com anticorpos maternos, porque estes impedem a imunoresposta, limitando a replicação do vírus vacinal no hospedeiro. A interferência pode ser evitada, vacinando os animais próximo aos 6 meses de idade, quando os anticorpos maternos declinam (KELLING, 1993). Porém, é muito importante desenvolver um tipo de vacina que induza imunidade ativa na presença de imunidade passiva, devido a maior severidade associado ao BRSV na faixa etária precoce (BAKER & VELICER, 1991).

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

No presente estudo, a colheita de material foi concentrada nas regiões sudeste e sul do país, onde foram relatados casos de doenças respiratórias em bovinos. Foi realizada inicialmente uma triagem sorológica começando pelo Estado do Rio Grande do Sul, principalmente nas regiões localizadas na fronteira com a Argentina e Uruguai, seguindo-se no Estado de São Paulo e em Minas Gerais, principalmente nos meses de junho a setembro, onde a ocorrência parece ser maior devido ao inverno. As colheitas de material foram realizadas durante dois anos e meio, compreendendo os anos de 1993 e 1995.

Após a obtenção dos primeiros resultados sorológicos sobre a ocorrência do vírus respiratório sincicial dos bovinos em nosso país, foi efetuada uma colheita mais criteriosa de secreção nasal, para o isolamento viral. Para tanto, foram escolhidos sempre que possível, o maior número de animais por região, cujas idades variavam entre 0 a 12 meses.

2. AMOSTRA VIRAL

Durante toda a investigação foi utilizada uma amostra padrão de *Pneumovirus* denominada BRSV-88, isolada na Alemanha procedente de bezerros com sintomas respiratórios, após passagens em célula MDBK (item 3.), gentilmente cedida pelo Laboratório Estadual de Veterinária, Stuttgart, Alemanha. Soros padrões positivos e negativos utilizados, também foram procedentes daquele laboratório. Esta amostra foi usada com a finalidade de servir tanto como base para os testes empregados neste trabalho como para se utilizar um padrão viral já definido. A cepa BRSV-88 apresentava um título de $10^{5.2}$ DICT₅₀/ml.

3. CULTIVOS CELULARES

Foram utilizadas linhagens contínuas de células MDBK (Madin and Darby-Bovine Kidney), e célula CER (Chicken Embryo Rough). A linhagem CER foi doada pelo Prof. Dr. H. M. Hafez do Laboratório Estadual de Stuttgart/Alemanha. Esta célula resultou da mistura de célula primária de embrião de galinha com célula renal de Hamster, (SMITH et al., 1977).

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning), com 2×10^5 células/ml (concentração inicial) em meio mínimo essencial Eagle (MMEE-Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (Sigma Chemical Company) ou 10% soro equino (Nutricell) por 48 hs a 37°C.

4. PRODUÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO

Monocamadas de células cultivadas conforme mencionado no item 3. foram infectadas com amostra de BRSV-88 para produção viral.

O meio de crescimento celular foi eliminado e inoculado 0,01 a 0,1 DICT₅₀/ml da amostra viral. Após duas horas de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi eliminado, as monocamadas lavadas com PBS (NaCl 8g; KCl 0,2g; Na₂HPO₄ 12H₂O 2,9g; KH₂PO₄ 0,2g; H₂O desmin./bidest. q.s.p. 1000 ml; pH 7.2) e em seguida, adicionou-se 20 ml de MMEE com 2% de SFB por garrafa.

A incubação foi realizada a 37°C e as culturas observadas diariamente em microscópio de luz invertida (Axiovert 100, Carl Zeiss) para observação do efeito citopático (ECP) característico, isto é, formação de sincício e arredondamento celular (BUYS et al., 1989).

Células e meio extracelular foram submetidos a um ciclo de congelamento (-70°C) e descongelamento (Banho Maria, 37°C), clarificados por centrifugação (Centrífuga GS6R, Beckman Instruments) a 3.000 g por 10 minutos e mantidos a -70°C até o momento de uso.

5. TITULAÇÃO VIRAL

Foram utilizadas monocamadas de células com 24 horas de crescimento a 37°C, em microplacas de 96 cavidades (Corning). O inóculo constou de 0,05 ml de cada diluição (\log_{10} de 10^{-1} a 10^{-8}) da amostra viral em MMEE com 8 repetições. Após duas horas de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi eliminado, as monocamadas lavadas com PBS (NaCl 8g; KCl 0,2g; Na₂HPO₄ 12H₂O 2,9g; KH₂PO₄ 0,2g; H₂O desmin./bidest. q.s.p. 1000 ml; pH 7.2) e em seguida, adicionou-se 0,05 ml de MMEE com 2% de SFB a cada cavidade. A incubação foi realizada em estufa de atmosfera úmida de CO₂ a 37°C (Forma Scientific) durante 5 dias. O DICT₅₀ foi calculado pelo método de REED & MUENCH, (1938).

6. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VRSB

6.1. OBTENÇÃO DE SOROS DE BOVINOS PARA OS TESTES SOROLÓGICOS

Para as análises sorológicas foram realizadas colheitas de material nos principais centros de bovinocultura do país, iniciando-se pela fronteira com Argentina e Uruguai.

Foram analisadas 864 amostras de soro de bovinos oriundos de 46 diferentes rebanhos dos Estados de Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), São Paulo (SP), Mato Grosso do Sul (MS), Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG). Os soros eram provenientes de bovinos (corte e leite) de ambos os sexos e de diferentes idades, pertencentes a propriedades com ou sem histórico de doenças respiratórias, e de rebanhos bovinos sem qualquer informação (Tabela 2).

Além destas amostras analisadas, foram obtidas mais 30 amostras de soro destinadas a serem usadas como controle negativo, procedentes de rebanhos (de corte e de leite) da região fronteira do Rio Grande do Sul. Os animais tinham idades entre 5 meses e 2 anos, sendo 27 (90%) menores de 1,5 anos, 11 amostras pertenciam a fêmeas de rebanhos leiteiros e 19 machos de gado de corte. Todas as amostras eram de bovinos aparentemente saudáveis e sem antecedentes de doenças respiratórias e que, quando submetidas aos testes sorológicos (ELISA e TSN), não apresentaram anticorpos contra o BRSV.

Os soros colhidos foram centrifugados a 1.500g por 10 minutos a 4°C, inativados a 56°C por 30 minutos, aliquotados e estocados a temperatura de -20°C até o momento de uso.

As amostras analisadas neste estudo foram gentilmente fornecidas por Médicos Veterinários de campo (RS, SP, MG e PR), pelos Institutos Biológico (São Paulo) e de Zootecnia (Nova Odessa).

TABELA 2 - Características gerais dos animais estudados.

LOTE	nº amostras	CARACTERÍSTICAS
A	227	Rebanho bovino de corte, com sintomas respiratórios. Idade até 8 meses. Procedência: RS, SP, MG
B	18	Rebanho bovino de corte, com sintomas respiratórios. Idade acima de 8 meses. Procedência RS.
C	22	Rebanho bovino leiteiro, com sintomas respiratórios. Idade adulta. Procedência RS.
D	89	Rebanho bovino leiteiro, sem história de doença respiratória. Idade até 13 meses. Procedência SP e RS.
E	234	Rebanho bovino de corte, sem história de doença respiratória. Sorologia positiva para IBR (32,5%). Sem registro de idade. Procedência SP, MG e MS.
F	242	Rebanho bovino leiteiro, sem história de doença respiratória. Sorologia positiva para IBR (24,4%). Procedência PR, SP e RJ.
G	32	Rebanho bovino, estado de SP (dados insuficientes).
TOTAL	864	

6.2. TESTE DE SORONEUTRALIZAÇÃO (TSN)

A determinação de títulos de anticorpos soroneutralizantes nos soros bovinos foi efetuada pelo Método Beta, onde concentrações constantes de vírus foram colocadas a reagir frente a diluições seriadas dos soros a serem testados, conforme recomenda GELB (1989). O teste de soroneutralização foi realizado segundo GRAHAM et al. (1988) com algumas modificações.

Foram utilizadas monocamadas de células com 24 horas de crescimento a 37°C em microplacas de fundo chato com 96 cavidades (item 3.) e os soros inativados foram diluídos em MMEE com 5% de Antibióticos (penicilina 5x 10⁶ UI; estreptomicina 5 g; fungizona 5 g) em base 2 e 100DICT₅₀/ml da amostra viral. A mistura soro-vírus foi incubada durante 1 hora a 37°C antes de ser adicionada às placas.

A incubação foi realizada durante 5 dias em estufa de atmosfera úmida de CO₂ e o título calculado como a maior diluição do soro que inibiu o aparecimento de ECP, levando-se em consideração os controles de célula, vírus e soros. Os soros que proporcionaram título neutralizante igual ou menor a 4 foram considerados negativos, e soros com títulos igual ou maior a 8 foram considerados positivos (HAFEZ, 1990).

6.3. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Foi adotada a metodologia de GRANT et al.,(1987) com algumas modificações. As placas de ELISA (Flow Laboratories) impregnadas com antígeno viral purificado, foram fornecidas pelo Laboratório Estadual de Stuttgart/Alemanha.

Os soros obtidos de rebanhos bovinos (item 6.1.), foram diluídos a 1:40 em PBS-T [PBS e 0,05% de Tween 20 (Sigma Chemical Company)] com 0,1% de leite desnatado e adicionados a cada orifício na quantidade de 0,1 ml, permanecendo em incubação por uma hora a 37°C em câmara úmida.

Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem (salina fisiológica; 0,05% (v/v) de Tween 20). O conjugado utilizado foi IgG de cabra anti-IgG de bovine marcado com peroxidase (Nordic, Holand), que foi diluído 1:200 em PBS-T e adicionado às placas na quantidade de 100 μ l por cavidade. A incubação foi realizada por uma hora a 37°C em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas por 4 vezes com solução de lavagem, e adicionado 0,1 ml do substrato enzimático [sal de amônio 2.2 azino-di(ácido 6,3 etilbenzotiazolina sulfônico) Sigma Chemical Company], por cavidade, permanecendo 30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz.

A reação foi interrompida com a adição de 0,05 ml de H₂SO₄ (Merck) 3N por cavidade. A leitura das densidades ópticas (DO) de cada cavidade das microplacas foi realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan Biochromatic Type 348), a um comprimento de onda de 405 nm contra branco, constituído unicamente pelo substrato e bloqueador enzimático. Os resultados médios obtidos foram expressos em relação aos controlos positivo e negativo presentes em cada microplaca. A atividade de cada soro foi calculada através do quociente Amostra/Positivo segundo a fórmula:

$$A/P = \frac{\bar{x}A - \bar{x}N}{\bar{x}P - \bar{x}N}$$

onde,

$\bar{x}A$ = Absorbância média do soro da amostra

$\bar{x}N$ = Absorbância média do soro de referência negativo

$\bar{x}P$ = Absorbância média do soro de referência positivo

Os valores positivos foram calculados levando-se em consideração os resultados obtidos nos testes e seus respectivos controlos. Em cada placa foram colocados 3 controlos positivos e a média foi considerada o valor padrão para os cálculos. Como resultado positivo

foi considerado todo valor maior que 80% da média dos controles, e resultado negativo foi todo valor menor que 80% do valor da média dos controles (HÄNEL, 1993).

7. ISOLAMENTO VIRAL

O isolamento viral foi obtido a partir de 33 amostras de secreção nasotraqueal de animais vivos, procedentes de bovinos dos Estados do RS e SP. O material para o isolamento viral foi colhido através zaragatoas ("swabs") e acondicionado em tubos esterilizados contendo meio MEE com 20% de Glicerina, 20% de Soro Equino e 5% de Antibióticos (penicilina 5×10^6 UI; estreptomicina 5 g; fungizona 5 g), os quais foram processados imediatamente em sistemas sensíveis ou estocados a -20°C até a sua análise. Para detectar BRSV, a amostra destinada para o isolamento deve ser obtida o mais cedo possível ainda no processo de desenvolvimento da enfermidade e transportada dentro de 24 horas ao laboratório. Os animais mais severamente afetados podem não ser os melhores candidatos para isolamento viral, visto que o animal aparentemente normal pode estar na primeira fase do processo, onde a quantidade de vírus é máxima (DUBOVI, 1993).

Levando em consideração essas indicações, as amostras para isolamento procediam de bovinos de propriedades com histórico clínico de enfermidades respiratórias,

suspeitos de apresentar a doença, pertencentes ao grupo de maior risco (com idade máxima de 8 semanas), de rebanho soropositivo e sem sintomas clínicos respiratórios evidentes, evitando colher amostras de animais com sintomas avançados, devido à possibilidade de infecções mistas (BAKER et al., 1985; FREY, 1982).

Pela dificuldade de isolamento deste vírus, as amostras precisaram ser tomadas com o máximo de cuidado. No período que abrangeu este estudo, não foi possível obter amostras de animais necropsiados. As amostras traqueais de animais recém infectados não são sempre possíveis de serem obtidas. Pelo fato de que as amostras foram colhidas a partir de zaragatoas nasotraqueais, também recomendados na literatura, a qualidade nesse caso é extremamente importante para a obtenção de resultado positivo. As zaragatoas foram tomadas da área mais caudal possível do trato respiratório, de modo a conseguir células que suportem o crescimento do vírus. Em seguida as zaragatoas foram colocadas em um meio de transporte e armazenadas na temperatura em torno de 5°C, porém não congelados. A rapidez em que a amostra foi inoculada em células para isolamento viral, é de fundamental importância para o processo de isolamento.

7.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Os testes de imunofluorescência direta foram realizados para detectar antígenos de RSV nas 33 amostras de secreção nasal, antes de começar os ensaios de isolamento viral em culturas de células, servindo assim, como uma triagem.

Em lâminas apropriadas para imunofluorescência (Glasstécnica) foi colocada uma gota de suspensão nasal (item 7.). A amostra foi incubada em estufa a 37°C, fixada com acetona (Merck) durante 20 minutos a 4°C e depois lavada com água bidestilada (pH 7,2).

O conjugado anti-pneumovirus (HRSV) marcado com fluoresceína, obtido do Central Laboratory Weybridge, Inglaterra, foi diluído 1:10 em PBS (0,05 M, pH 7,3), colocado sobre a amostra fixada e o sistema foi incubado em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após lavagem com PBS (0,05 M, pH 7,3), procedeu-se a leitura em microscópio de imunofluorescência (Carl Zeiss), incluindo sempre um controle negativo e positivo em cada lâmina.

As amostras que apresentaram resultado positivo, foram inoculadas em células para isolamento viral.

7.2. INOCULAÇÃO EM CULTIVO CELULAR

7.2.1. PREPARO DO INÓCULO VIRAL

As secreções nasais foram previamente congeladas e descongeladas, homogeneizadas em MMEE (na diluição 1:10), centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante filtrado (0,2 μ m) e imediatamente processado.

Para o isolamento viral, as amostras previamente preparadas, foram inoculadas simultaneamente em duas linhagens celulares, MDBK e CER (item 3.) e submetidos até 20ª passagem celular.

O filtrado nasotraqueal, contendo 0,1 ml, foi inoculado em triplicata em microplacas de 24 orifícios (Costar). Em seguida, foram adicionadas às cavidades 1 ml de monocamadas de células CER e MDBK (2×10^5 células/ml) tripsinizadas e ressuspendidas em meio de crescimento (MMEE com 10% de SFB).

Cada placa continha também controle de células e controle positivo (amostra viral BRSV-88). A incubação foi realizada a 37°C em estufa de atmosfera úmida de CO₂ (Forma Scientific) e as culturas observadas diariamente até o quinto dia após a inoculação em microscópio de luz invertida (Axiovert 100, Carl Zeiss) quanto ao aparecimento de efeito citopático (ECP) característico, isto é, formação de sincício e arredondamento celular

(BUYS et al., 1989). Após cinco dias de incubação e a não detecção de ECP, foram efetuadas passagens cegas, até a 20ª passagem celular.

7.2.2. INOCULAÇÃO EM DIVERSOS SISTEMAS CELULARES

A amostra viral isolada foi inoculada em diferentes culturas celulares, a fim de testar a sua sensibilidade. Além das células CER e MDBK, foi testada também a linhagem VERO (Kidney African Green Monkey). Culturas Primárias de Pulmão de Embrião de Bovino (BEL) livres de anticorpos contra BRSV e cultura primária de Fibroblasto de Embrião de Galinha-SPF (FEG) também foram utilizadas para inocular a amostra viral isolada. A técnica de cultura FEG, foi baseada no método de BURLESON et al., (1992); e a cultura BEL, conforme recomenda MAYR et al., (1974).

A amostra viral foi primeiramente adaptada inoculando-a em placas de 24 orifícios (Costar) com monocamadas das diferentes células cultivadas (Itens 3. e 7.2.1.), e após a obtenção do ECP, o vírus foi diluído e titulado (Item 5.).

7.3. CARACTERIZAÇÃO VIRAL

7.3.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Para determinar as propriedades físico-químicas do isolado viral foram utilizados os seguintes testes: sensibilidade ao clorofórmio, à temperatura, ao 5-iodo-2-deoxiuridina; estabilidade ao pH; atividade hemoaglutinante e hemoadsorção. A metodologia empregada foi segundo von MAYR et al., (1974). Para tanto, foram utilizadas monocamadas de células com 24 horas de crescimento a 37°C em microplacas de 96 cavidades (Corning).

Após eliminar-se o meio de crescimento celular foram adicionados 0,05 ml de MMEE com 2% de SFB a cada cavidade. O inóculo constou de 0,05 ml de cada diluição (\log_{10} de 10^{-1} a 10^{-8}) da amostra tratada (nos diferentes ensaios) e da amostra viral (controle do vírus) em MMEE. A incubação foi realizada em estufa de atmosfera úmida de CO₂ a 37°C (Forma Scientific) durante 5 dias. O DICT₅₀ foi calculado pelo método de REED & MUENCH (1938).

7.3.1.2. TESTE DE SENSIBILIDADE AO CLOROFÓRMIO

A suspensão viral foi submetida a agitação com 10% de clorofórmio (Merck) durante 1 hora a temperatura ambiente e mantida no refrigerador a 4°C até o dia seguinte. Após 24 horas, a amostra foi centrifugada 30 minutos a 3.000 g, diluídas e distribuídas em placas para determinar o título viral (item 5).

7.3.1.3. TESTE DE SENSIBILIDADE A TEMPERATURA

Foram usadas alíquotas de suspensão viral distribuídas em 3 tubos, sendo que o primeiro tubo foi incubado em banho Maria a 56°C, outro a 60°C durante 30 minutos e o terceiro permaneceu à temperatura ambiente, como controle. Em seguida, as amostras foram diluídas e distribuídas em placas para determinar o título viral (item 5.).

7.3.1.4. EFEITO DE 5-iodo-2-DEOXIURIDINA (IUDR)

Para detectar o efeito de IUDR, que atua em vírus DNA, foram realizadas 4 concentrações de IUDR (0, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) sobre a amostra viral. O inóculo viral foi adsorvido na placa durante 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS (0,05 M, pH 7,3) a 37°C. Quatro orifícios com a mesma diluição viral (10^{-1} até 10^{-8}), receberam 0,05 ml das diferentes concentrações de IUDR acrescido de meio Eagle com 2% de soro equino. Após 48 horas, cada orifício foi lavado com PBS (0,05 M, pH 7,3) a 37°C e a placa novamente incubada seguindo a técnica descrita (item 7.3.1.).

Igual tratamento foi realizado no controle de vírus RNA e DNA. Como controle de vírus DNA utilizou-se o "Porcine Herpes Virus" (PHV-1) inoculado em células VERO (Kidney African Green Monkey), e para o vírus RNA o vírus da doença de Newcastle (Paramixovírus) inoculado em cultura primária de fibroblasto de embrião de galinha (FEG).

7.3.1.4. TESTE DE ESTABILIDADE AO pH

Detectou-se a estabilidade do vírus a pH 3.0, 6.0 e 9.0. Os períodos de incubação em cada pH foram 10, 30, 60, 180 e 300 minutos. Tomou-se uma amostra de vírus, misturando-a em partes iguais com a solução do pH desejado, obtida da mistura de Na_2HPO_4 e ácido cítrico 0,1M (Merck). Uma segunda amostra foi misturada com uma solução cujo pH era $7,4 \pm 0,4$. A seguir foram distribuídas nas microplacas (item 7.3.1.).

7.3.1.5. ATIVIDADE HEMOAGLUTINANTE

Para a determinação da atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos de galinha, peru, cobaia, coelho, camundongo, bovino e ovino.

Foram colhidos 0,5 ml de sangue de galinha, peru, cobaia, coelho e camundongo por punção cardíaca e 5,0 ml de sangue de bovino e ovino por via endovenosa. Os sangues colhidos em tubos contendo 1 ml de citrato de sódio (Merck). Após a colheita, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2.200 g, e o sobrenadante desprezado.

O sedimento foi lavado 2 vezes com solução de PBS (0,05 M, pH 7,3) e no final da segunda lavagem, ressuspendido a 50% com adição de solução de PBS (0,05 M pH 7,3).

O teste foi realizado em placas de fundo em U (Greiner) apropriadas para o ensaio. A capacidade de hemaglutinação do BRSV foi testada com soluções de eritrócito 1% (obtidas a partir da solução estoque) das diferentes espécies acima mencionadas à temperatura de 4°C e por períodos de incubação de 30 e 60 minutos.

7.3.1.6. TESTE DE HEMOADSORÇÃO

Foram utilizadas culturas celulares (item 3.) incubadas por 3 a 9 dias em microplacas de 96 cavidades. O meio de cultura foi desprezado e as monocamadas celulares lavadas 2 vezes com PBS (0,05 M, pH 7,3) e após a última lavagem foi adicionada a suspensão viral. Neste ensaio foram utilizados diferentes tempos de incubação (2, 4 e 6 horas) ao fim dos quais foi adicionado 0,2 ml de suspensão dos 7 diferentes tipos de eritrócitos (item 7.3.1.5.) a 0,5% em PBS (0,05 M, pH 7,3). Após a adição dos eritrócitos, e incubação durante 10 minutos a 37°C, procedeu-se a observação dos resultados em microscópio óptico.

7.3.2. SORONEUTRALIZAÇÃO CRUZADA

Para a realização deste ensaio, foram analisadas amostras padrões de vírus e os respectivos antisoros policlonais das cepas BRSV-88 (Item 2.) e BRSV-375 provenientes da American Culture Collection/EUA, LEHMKUHL, (1979), e cedidas pelo Laboratório Estadual de Stuttgart/Alemanha.

Os antisoros e vírus padrões foram cruzados com soros policlonais e BRSV brasileiro. O teste de soroneutralização cruzada baseou-se na técnica descrita no item 6.2.

7.3.3. PURIFICAÇÃO VIRAL

Os procedimentos de GOUGH & COLLINS (1989) foram adotados para a purificação das amostras virais. A suspensão viral (item 4.), foi centrifugada a 30.000 g por 1 hora a 4°C (Centrifuga Beckmann modelo L 2-21).

O sedimento obtido foi ressuspenso em aproximadamente 2% do volume inicial para cada amostra viral em tampão TRIS-Cálcio (pH 7.2). O concentrado viral foi cuidadosamente adicionado sobre um gradiente descontínuo de sacarose (Merck). Para o gradiente foram utilizados 7 ml da concentração de 30% (p/p) e 2 ml da concentração de 55% (p/p) de sacarose (preparadas a partir de uma solução estoque 66% em tampão TRIS-Cálcio).

O vírus foi peletizado a 53.000 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C (Ultra-centrifuga Beckmann modelo L 8-80 M). Em seguida, com o auxílio de uma seringa de 3 ml, foi retirada a banda viral localizada na junção com a concentração de 55%.

A fração colhida foi novamente centrifugada e peletizada a 30.000 g por 1 hora a 4°C; o sedimento ressuspenso em tampão TRIS-Cálcio (aproximadamente em 0,5% do volume inicial) e armazenado a -70°C, em aliquotas de 0,05 ml.

7.3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As partículas virais purificadas, foram visualizadas através de microscopia eletrônica, utilizando-se o método descrito por BARTH, (1984), com grades recém-revestidas de formvar e carbono, tratadas com polilisina (poli-L-lisina) a 0,1% diluída em água destilada (pH 7,2), durante 30 segundos. A suspensão viral foi então colocada sobre as grades, pelo mesmo período, sendo o excesso retirado com papel absorvente e lavagens sucessivas com água destilada. Em seguida, foi adicionado ácido fosfotúngstico (AFT) a 2%, com tratamento instantâneo (AFT rápido) ou tratamento durante 30 segundos. As preparações foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM modelo 900), em aumentos de 131.000, 142.000 e 309.000 vezes, no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto Biologia/UNICAMP, Campinas (SP).

8 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças entre os testes sorológicos de SN e ELISA foram determinadas usando o teste χ^2 , a níveis de probabilidade de 0.05 (LEVIN, 1987).

IV. RESULTADOS

1. TESTES SOROLÓGICOS

A análise dos resultados mostrou alta percentagem de anticorpos contra BRSV em todos os estados estudados (figura 1), utilizando tanto o teste ELISA como o teste de soroneutralização. O teste ELISA mostrou-se ligeiramente mais sensível que o teste de soroneutralização, 75% (ELISA) e 68% (TSN) respectivamente (Tabela 3, figuras 2 e 3). As frequências apresentaram diferenças significativas entre si, pelo teste X^2 ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3 - Presença de anticorpos anti-BRSV em amostras de soros bovinos utilizando os testes sorológicos de ELISA e Soroneutralização.

TESTE	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
ELISA	649 (75%)	215 (25%)	864
SN	578 (68%)	268 (32%)	846



FIGURA 1: FREQUÊNCIA DE AMOSTRA DE SOROS COM ANTICORPOS PARA O BRSV PELO TESTE DE ELISA.

Fig. 2 Porcentagem de amostras soropositivas segundo teste ELISA

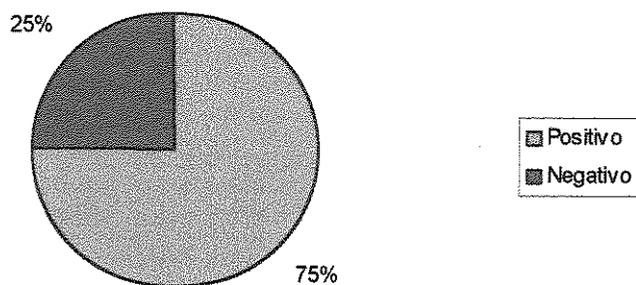


Fig. 3 Porcentagem de amostras soropositivas segundo teste de Soroneutralização

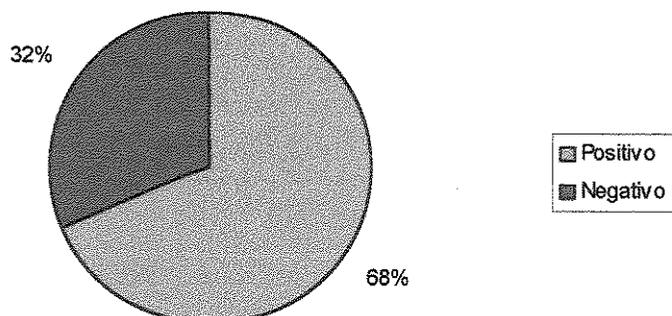


Fig. 4 Presença de anticorpos anti-BRSV por região, segundo n° de amostras de ELISA e Soroneutralização

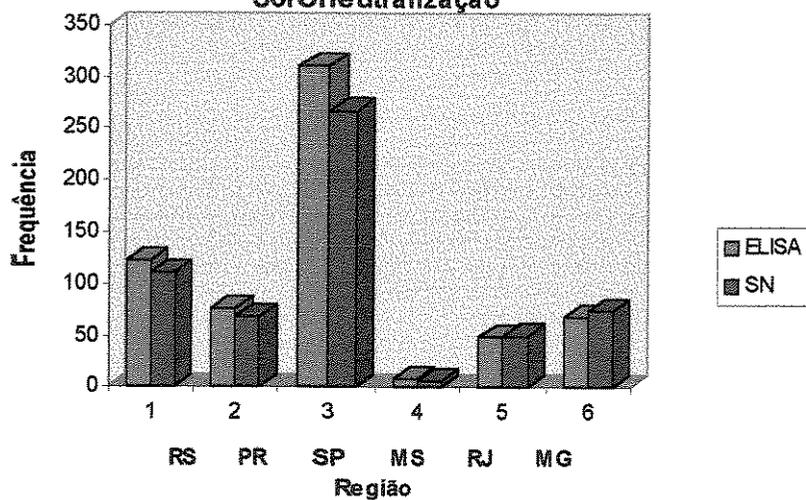
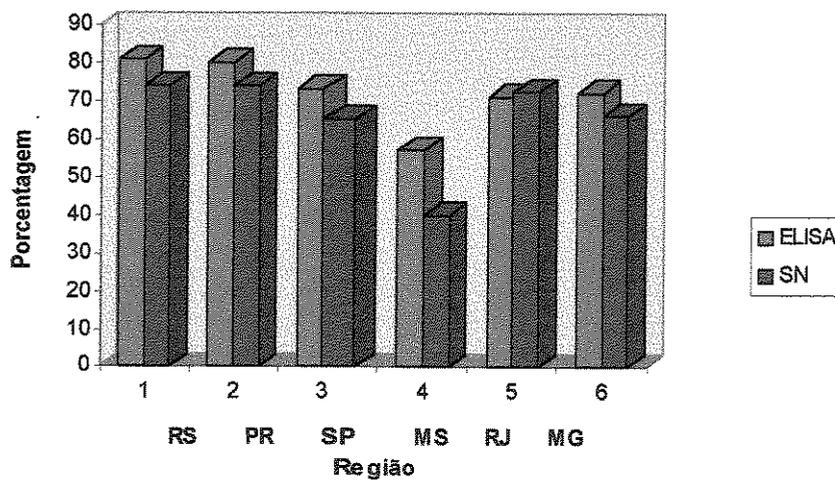


Fig. 5 Presença de anticorpos anti-BRSV por região, segundo os testes ELISA e Soroneutralização, em porcentagem.



Os resultados por região estão resumidos nas tabelas 4 e 5 e figura 4, mostrando uma ligeira tendência à maior positividade nos Estados do sul (figura 5). A discrepância do número de amostras totais entre os testes deve-se à presença de 18 amostras cujos resultados no teste de soroneutralização não foram conclusivos por terem alta toxicidade afetando diretamente a cultura celular, apesar de serem submetidas a centrifugação para clarificação.

Tabela 4 - Presença de anticorpos anti-BRSV por região, em amostras de soros segundo o teste de ELISA.

ESTADO	Nº AMOSTRAS EXAMINADAS	Nº AMOSTRAS POSITIVAS
RS	157	127 (81%)
PR	96	77 (80%)
SP	427	314 (74%)
MS	14	8 (57%)
RJ	73	52 (71%)
MG	97	71 (73%)
TOTAL	864	649 (75%)

TABELA 5 - Presença de anticorpos anti-BRSV por região, em amostras de soro segundo o teste de soroneutralização.

ESTADO	Nº AMOSTRAS EXAMINADAS	Nº AMOSTRAS POSITIVAS
RS	150	111 (74%)
PR	92	68 (74%)
SP	409	265 (65%)
MS	14	6 (43%)
RJ	69	50 (73%)
MG	112	74 (66%)
TOTAL	846	578 (68%)

Analisando-se os soros provenientes de bovinos menores de 13 meses, ambos os testes demonstraram maior prevalência nesta faixa etária, embora o teste mais sensível tenha sido o TSN (Tabela 6).

TABELA 6 - Resultados sorológicos dos testes de ELISA e SN em animais menores de 13 meses.

LOTE	Nº DE AMOSTRAS	AMOSTRAS POSITIVAS	
		ELISA	TSN
A	102	90	93
B	68	56	59
C	66	55	56
D	57	44	49
E	13	7	10
TOTAL	306	252	267

Os títulos neutralizantes das amostras positivas foram relativamente baixos: 54% tinham o título até 1:16, e 70% dos soros testados apresentavam título menor ou igual a 1:32 (Tabela 7). O maior título neutralizante foi 1:1024, encontrado somente em uma amostra procedente de rebanho do Paraná, resultante do TSN utilizando-se a amostra viral isolada no Brasil (BRSV-25-BR).

TABELA 7 - Títulos neutralizantes de anticorpos anti-BRSV (log2) em amostras de

VÍRUS	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶
BRSV	22%	32%	16%	30%
SOMATÓRIA	70%			100,0%

A grande maioria dos soros analisados foram testados frente ao vírus padrão BRSV-88. Após o isolamento da amostra viral brasileira, esta foi utilizada para repetir os testes de soroneutralização em 103 amostras selecionadas aleatoriamente e as diferenças não foram significativas com $p < 0.05$ (Tabela 8). As frequências não apresentaram diferenças significativas entre si, pelo teste X^2 ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 8 - Comparação dos resultados do TSN utilizando a amostra padrão (BRSV-88) e a amostra brasileira (BRSV-25-BR).

AMOSTRA	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
BRSV-88	77 (75%)	26 (25%)	103
BRSV-25-BR	79 (77%)	24 (23%)	103

2. ISOLAMENTO VIRAL

Das amostras testadas, 20 procediam do Estado de Rio Grande do Sul (próximo da fronteira com Argentina e Uruguai) e as demais (13), procediam do Estado de São Paulo.

Todas as amostras foram submetidas ao teste de imunofluorescência direta segundo o método indicado. Apenas duas das amostras testadas (procedentes de RS), mostraram reação positiva, dando boas perspectivas de sucesso para o isolamento em células (Tabela 9).

TABELA 9 - Presença de antígeno viral do BRSV utilizando o teste de**imunofluorescência direta com IgG anti-RSV marcado com rodamina.**

ESTADO	Nº AMOSTRAS EXAMINADAS	Nº AMOSTRAS POSITIVAS
RS	20	2
SP	13	0
TOTAL	33	2

Pelo número reduzido de amostras em condições de serem testadas (n=33), apesar de ter se obtido um resultado de imunofluorescência negativo, as mesmas foram cultivadas para o isolamento em cultura celular, mostrando-se negativas após 20 passagens cegas.

O meio de cultura com a suspensão em teste foi inoculado em células MDBK e CER em placas de 24 orifícios e em triplicata. As placas foram incubadas durante cinco dias a 37°C e diariamente foi realizada a leitura em microscópio de luz invertida para detectar o aparecimento de efeito citopático, como pode ser apreciado nas Figuras 6a, 6b, 7a e 7b.

Após a quinta passagem, foi observado o efeito citopático característico deste vírus, ou seja, aparecimento de sincícios nas monocamadas celulares (Tabela 10; Figuras 6a, 6b, 7a e 7b), em uma das amostras analisadas.

O isolamento viral foi realizado tanto na célula CER como MDBK. O efeito citopático e o título viral foram melhor observados na linhagem CER (Tabela 13; Figuras 6a, 6b, 7a e 7b), cuja célula foi utilizada como padrão para a realização dos testes subsequentes, ou seja, produção de antígenos, TSN, purificação e os testes de caracterização viral.

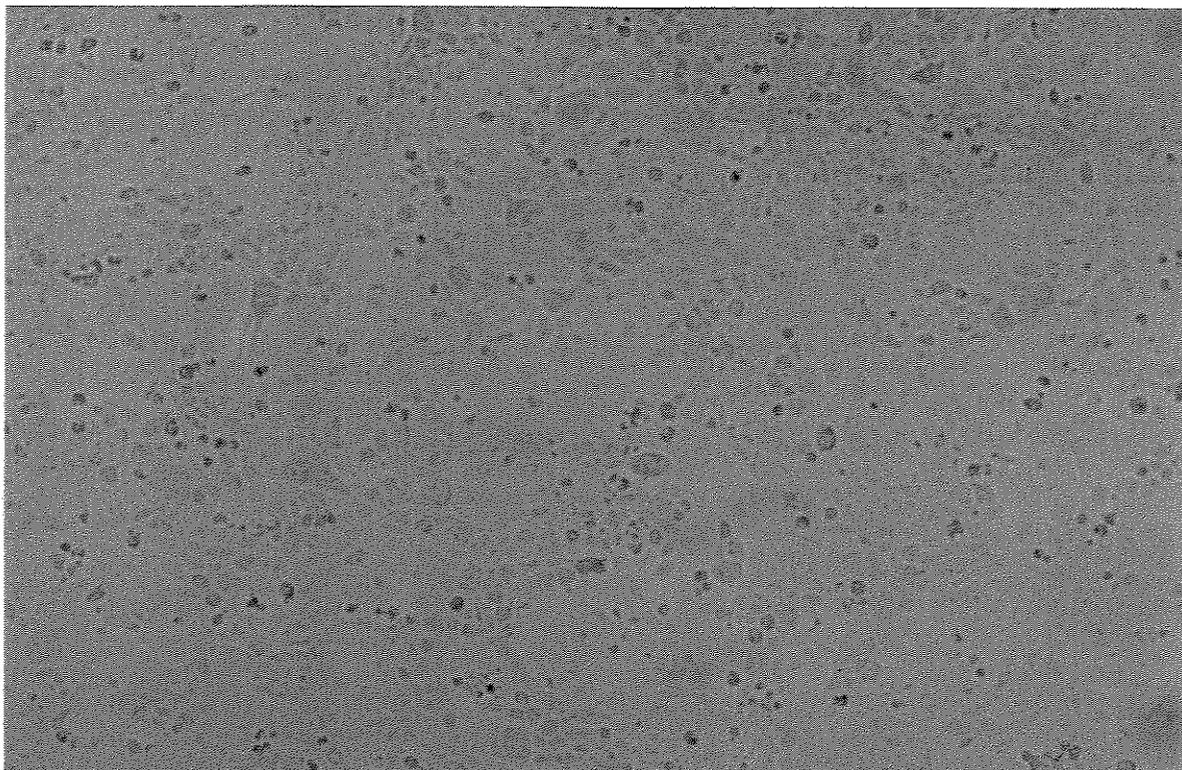


FIGURA 6a : MONOCAMADA DE CÉLULAS MDBK (MARBIN-DARBY BOVINE KIDNEY), CONTROLE.

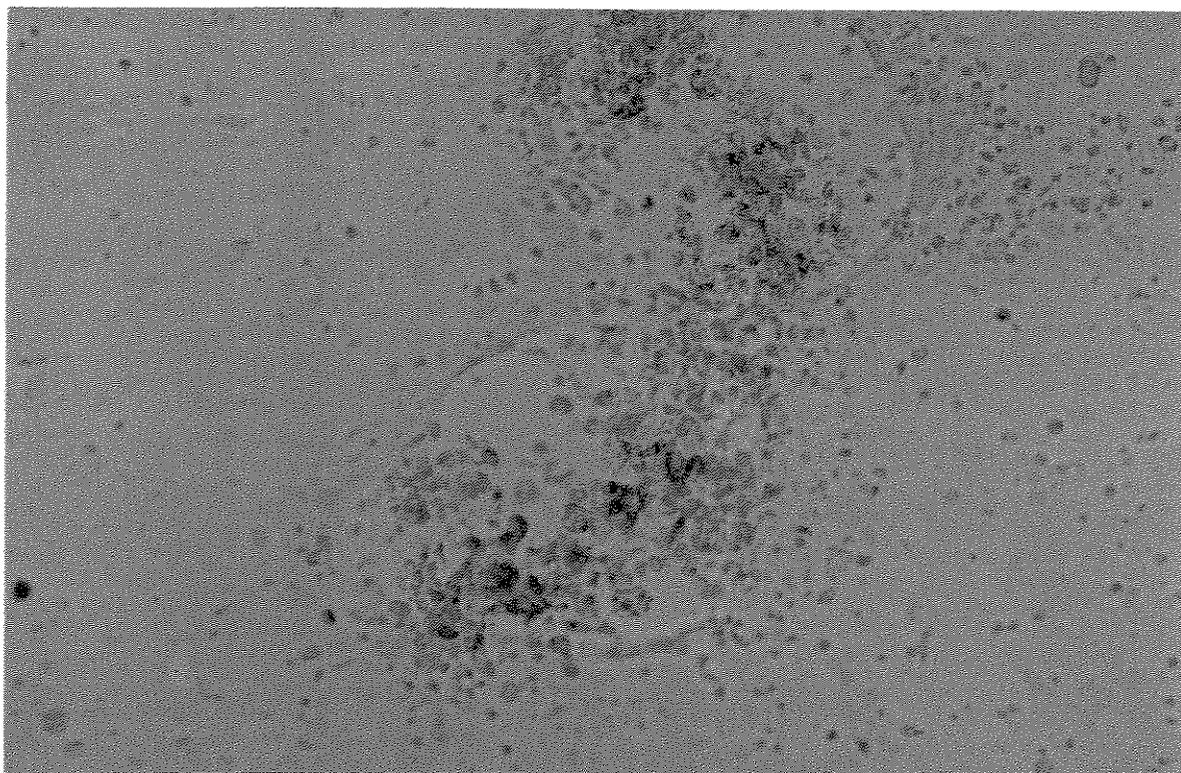


FIGURA 6b : MONOCAMADA DE CÉLULAS MDBK, COM EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO POR BRSV NO 5º DIA APÓS A INOCULAÇÃO.

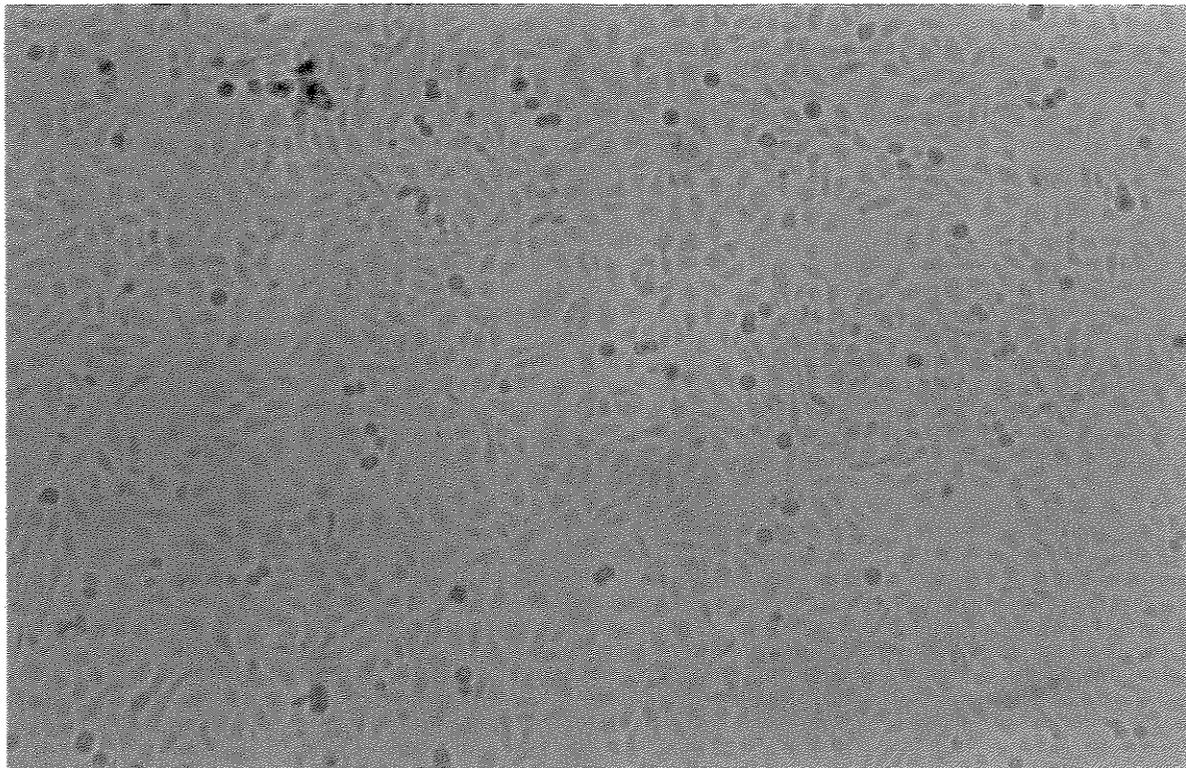


FIGURA 7a : MONOCAMADA DE CÉLULAS CER (CHIKEN EMBRYO ROUGH),
NORMAL.

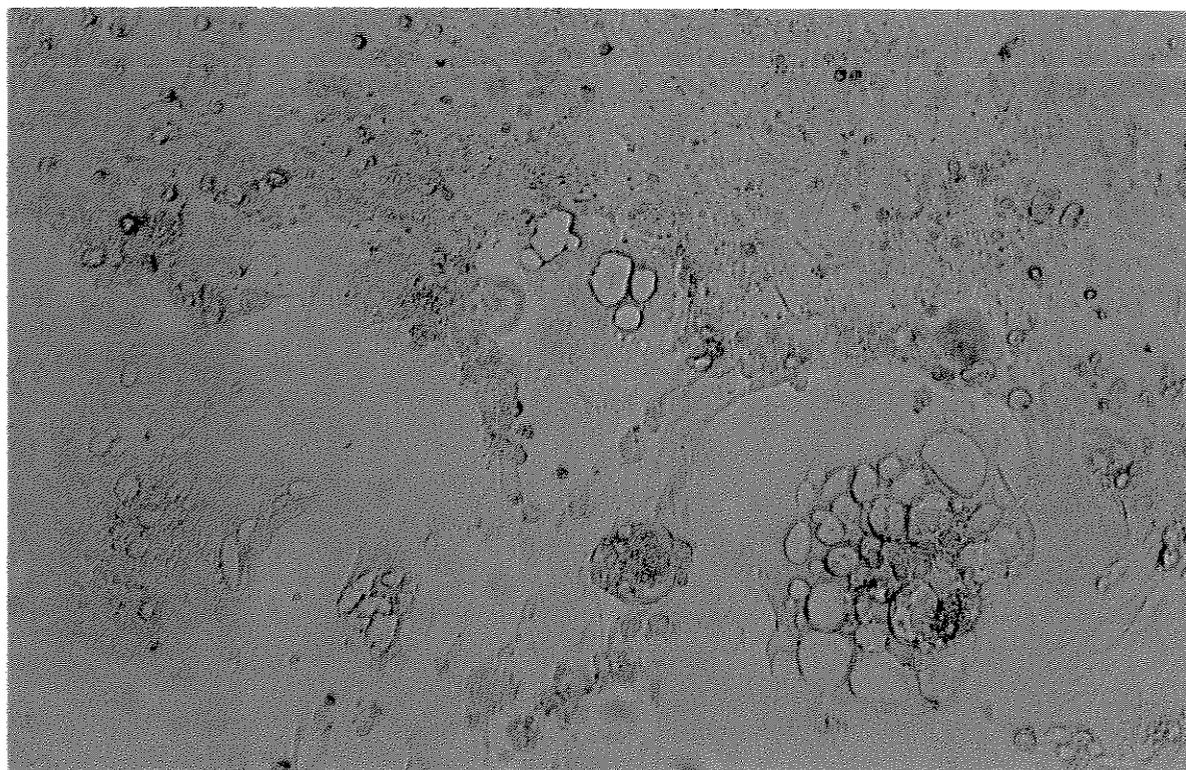


FIGURA 7b : MONOCAMADA DE CÉLULAS CER COM EFEITO CITOPÁTICO
CAUSADO POR BRSV NO 5º DIA APÓS A INOCULAÇÃO.

TABELA 10 - Isolamento de BRSV por meio de inoculações sucessivas em células CER e MDBK.

ESTADO	Nº AMOSTRAS EXAMINADAS	Nº AMOSTRAS POSITIVAS
RS	20	1
SP	13	0
TOTAL	33	1

Esta amostra viral foi propagada e submetida a testes de caracterização viral, sendo denominada BRSV-25-BR, por proceder da 25ª amostra estudada.

A amostra viral foi submetida a propagação em culturas celulares, tanto de mamíferos como de aves. Foram utilizadas linhagens celulares padronizadas MDBK , CER e VERO, além de cultura primária de pulmão de embrião de Bovino (BEL) e cultura primária de fibroblastos de embrião de galinha (FEG). O vírus se desenvolveu em todas as culturas exceto em FEG (Tabela 11).

TABELA 11 - Replicação viral em diferentes culturas celulares, adaptadas as células MDBK e CER (Título log₁₀ DICT₅₀/ml).

TÍTULO \ CULTURA	MDBK	CER	VERO	BEL	FEG
CELULAR	5,2	5,5	3,5	5,0	0,0

3. CARACTERIZAÇÃO VIRAL

Quanto ao tratamento com IUDR, conforme se observa na tabela 12, verificou-se que nas diferentes concentrações analisadas (0, 10, 50 e 100 ug/ml) não afetou a capacidade infectante do vírus, demonstrando assim, que o mesmo é um vírus-RNA.

No entanto, em relação ao efeito da temperatura e do clorofórmio sobre a amostra estudada, observou-se que a exposição às temperaturas de 56°C e 60°C por um período de 30 minutos, inativou a amostra viral. A mesma observação foi demonstrada em relação ao efeito do clorofórmio sobre a referida amostra (Tabela 12).

TABELA 12 - Resultados dos testes de termoestabilidade, sensibilidade ao clorofórmio e ao tratamento com IUDR do isolado brasileiro (Título \log_{10} DICT₅₀/ml).

TRATAMENTOS						
TEMPERAT. / 30 min.		CLOROFÓRMIO	IUDR ug / ML			
56° C	60° C		0	10	50	100
0,0	0,0	0,0	5,0	4,8	4,5	4,5

Esses dados nos permitem concluir, que a amostra isolada é um vírus envelopado, que após a sua inativação pelos agentes acima testados, fica comprometida a infectividade do mesmo.

Os tratamentos a diferentes valores de pH, mostraram que o vírus é estável numa ampla faixa de pH (6,0 a 9,0) à temperatura de 4°C, mas é afetado pelo tempo de exposição a esta temperatura, principalmente após 180 minutos. No entanto, foi observado que a pH 3,0 não se constatou nenhum ECP e sim uma toxicidade em relação às células (Tabela 13).

TABELA 13 - Efeito de diferentes valores de pH na replicação da amostra viral BRSV-25-BR em cultura de células CER (Título log₁₀DICT₅₀/ml).

TEMPO(min) \ pH	15	30	60	180	300
3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6,0	5,0	4,3	4,0	3,8	0,0
7,4	5,5	4,5	4,3	4,0	0,0
9,0	5,0	4,3	4,3	3,8	0,0

A atividade de hemoaglutinação das amostras de BRSV utilizando eritrócitos de galinha, peru, cobaia, coelho, camundongo, bovino e ovino na concentração de 1% em solução de NaCl tamponada, com dois períodos de incubação de 30 e 60 minutos a 4°C, pode ser verificada na Tabela 14.

TABELA 14 - Teste de Hemoaglutinação da amostra BRSV-25-BR com diferentes tipos de eritrócitos.

TIPO ERITRÓCITO \ TEMPO	galinha	peru	cobaia	coelho	camundongo	bovino	ovino
30	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
60	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

A atividade de hemoadsorção foi pesquisada utilizando os mesmos tipos de eritrócitos, os períodos de incubação viral observados foram 2, 4 e 6 horas, cujos resultados estão expressos na Tabela 15.

TABELA 15 - Teste de Hemoadsorção de eritrócito de galinha, peru, cobaia, coelho, camundongo, bovino, ovino.

TEMPO INCUBAÇÃO (H)	2	4	6
HEMOADSORÇÃO	negativo	negativo	negativo

Pelos resultados das tabelas 14 e 15, verificou-se que amostra viral isolada no Brasil (BRSV-25-BR) não conseguiu aglutinar nenhuma espécie de eritrócito pesquisado, visto que após 30 e 60 minutos de incubação, não apresentou nenhuma atividade aglutinante.

Quanto ao teste de hemoadsorção, utilizando-se dos mesmos tipos de eritrócitos, observou-se que após 2, 4 e 6 horas de incubação do vírus na linhagem de célula testada (CER), os resultados foram negativos.

No teste de soroneutralização cruzada foram testados dois padrões de vírus sincicial de bovinos, provenientes da Alemanha (BRSV-88) e dos Estados Unidos (BRSV-375) e seus antisoros. Os vírus padrões e seus respectivos antisoros policlonais, foram testados com a amostra brasileira (BRSV-25-BR) e soro de amostras de animais positivos (Tabela 16).

TABELA 16 - Teste de soroneutralização cruzada (TÍTULO em \log_2) da amostra Brasileira isolada, comparada com outras amostras padrões.

ANTISOROS AMOSTRAS VIRAIS	BRSV - 88	BRSV - 375	SORO - BRASIL ^a
BRSV-88	10,5	9,5	8,0
BRSV-375	9,5	11,0	8,5
BRSV-25-BR	9,5	10,5	8,5

a : Soro procedente de rebanho com alto título neutralizante.

Pelos resultados apresentados na tabela 16, foi observado que todas as amostras virais, tanto as padrões como o isolado no Brasil, cruzaram com seus respectivos antisoros, sugerindo assim a provável existência de semelhança antigênica entre os BRSV estudados o qual deveria ser confirmado com o antisoro homólogo.

4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

O vírus isolado no Brasil foi estudado morfológicamente através da análise de imagens geradas ao microscópio eletrônico, obtidas de vírus purificado em gradiente de sacarose segundo método indicado. O título neutralizante da amostra purificada foi de $10^{5,3}$ DICT₅₀/ml.

A amostra colocada diretamente na grade, e observada ao microscópio eletrônico proporcionaram imagens de um vírus de características pleomórficas, tamanho aproximado de 100 a 300 nm, com presença de espículas. Notou-se grande quantidade de espécimes incompletos ou destruídos.

Foi realizada também imunofotografia eletrônica, na qual a amostra do vírus purificado foi incubada duas horas com anticorpos específicos anti-BRSV e aderida à grade. Após esse tratamento, as imagens mostraram vírus imunologicamente ativos e que nos permitiu ratificar as observações feitas no primeiro teste.

As imagens observadas (Figura 8) estão de acordo com as características morfológicas do BRSV, permitindo afirmar que o vírus isolado no Brasil procedente de bovinos, trata-se de uma amostra brasileira deste vírus.

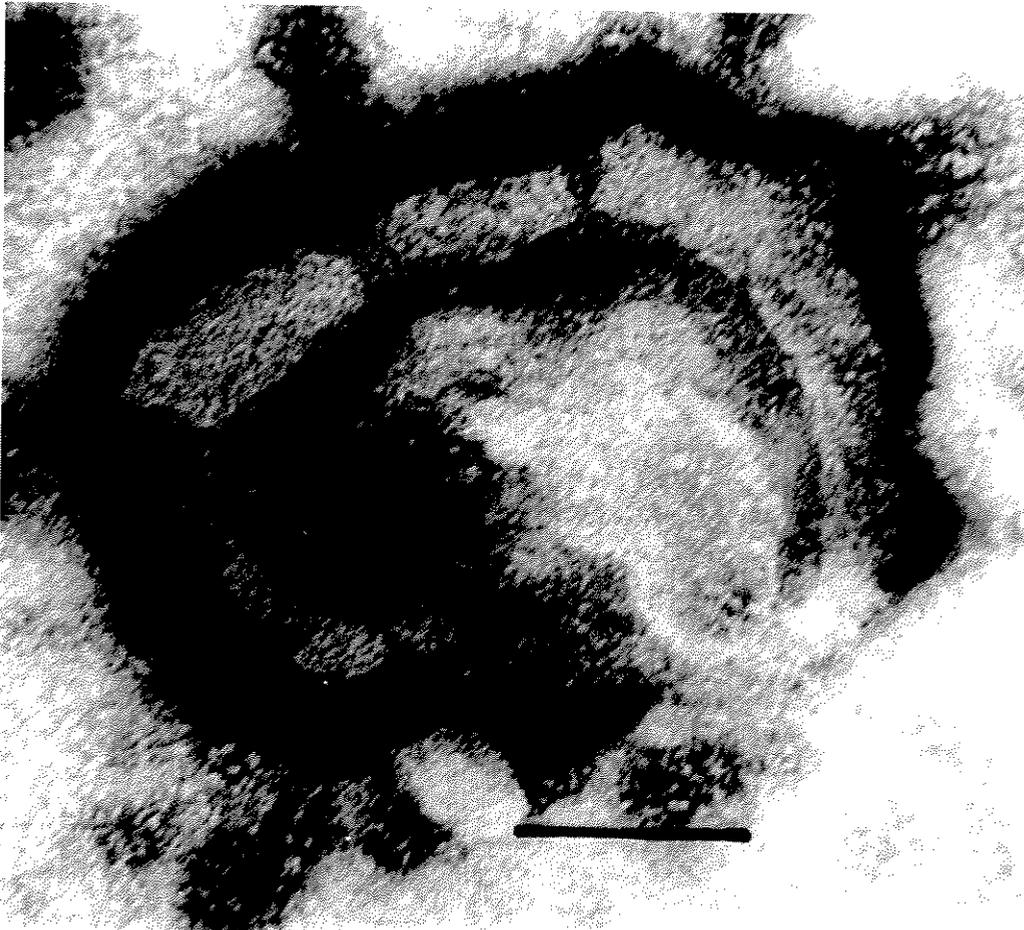


FIGURA 8 : MICROFOTOGRAFIA ELETRÔNICA DO BRSV-25-BR ISOLADO DAS
AMOSTRAS DO BRASIL, CORADAS NEGATIVAMENTE, AUMENTO
131.000 x, 100 nm.

V. DISCUSSÃO

A labilidade deste vírus tem dificultado seu reconhecimento e detecção, tornando-se difícil demonstrar sua presença através de métodos de isolamento viral, preferindo-se a detecção por outros métodos tais como a imunofluorescência direta ou a pesquisa de anticorpos no soro (DUBOVI, 1993).

Neste estudo, pesquisamos a ocorrência de anticorpos anti-BRSV nos Estados brasileiros do sudeste e sul do país (RS, PR, SP, MS, RJ e MG) utilizando dois testes sorológicos diferentes: o teste de soroneutralização (SN) e o ensaio imunoenzimático (ELISA).

Os resultados demonstraram a presença de anticorpos anti-BRSV em todas as regiões estudadas (Figura 1, Tabelas 4 e 5). Das 864 amostras de soros bovinos testadas, foram encontrados 75% e 68% de animais reagentes (Tabela 3, testes ELISA e SN respectivamente). Este alto grau de positividade, semelhante ao encontrado em países

longamente afetados pela doença (DUBOVI, 1993; DURHAM et al., 1991), e a ampla área envolvida, sugere um prolongado convívio com o vírus. No entanto, até o presente momento no Brasil a doença não tinha sido identificada, principalmente porque todas as doenças respiratórias apresentam sintomatologia semelhante (KIMMAN et al., 1988; JACOBS & EDINGTON, 1975).

Em relação aos resultados dos dois testes sorológicos desenvolvidos, observou-se uma leve diferença, significativa a $p < 0.05$, mostrando maior porcentagem de soros positivos usando o teste ELISA (75%) o qual seria mais sensível do que o teste de soroneutralização (68%) para a detecção destes anticorpos. Estes resultados estão de acordo com a literatura, a qual indica o teste ELISA como sendo mais sensível, pois detecta anticorpos adquiridos passivamente, e diferentes classes de imunoglobulinas em relação a outras provas sorológicas (GILLETTE, 1983; FLORENT & MARNEFFE, 1986 e WESTERBRINK & KIMMAN, 1987). Porém, não é um teste amplamente utilizado no diagnóstico pela dificuldade de se obter o antígeno em condições apropriadas (DUBOVI, 1993). Nossos resultados seriam explicados, provavelmente, pelo fato de que as amostras foram colhidas de animais sem a doença clínica. Por esta razão, as imunoglobulinas devem

ser da classe IgG, as quais persistem por mais tempo na circulação sanguínea. O teste ELISA detecta essa classe de imunoglobulinas e elimina numerosos problemas derivados do trabalho com um vírus extremamente lábil como é o BRSV, minimizando assim fatores que fazem diminuir a sensibilidade dos testes de soroneutralização. Pelas diferenças obtidas usando os dois testes, seria recomendável sempre usar mais do que um teste para tomar decisões em relação a tratamentos.

É interessante notar que a maioria das amostras procediam de fêmeas (98%) e as amostras procedentes de machos (1,2%) foram negativas nos dois testes sorológicos utilizados (dados não mostrados). Pelo número reduzido de amostras seria ousado fazer qualquer afirmação da suscetibilidade ao vírus relacionada ao sexo, em especial considerando que na literatura consultada não há sido relatadas diferenças na suscetibilidade entre sexos (AMES, 1993). Este fato poderia ser atribuído a outras variáveis, tais como, diferenças de manejo dentro do rebanho. Igualmente, seria interessante aprofundar os estudos considerando esse aspecto.

Analisando as porcentagens de soros positivos classificados por Estado (Tabelas 4 e 5, figura 1), tanto o teste de ELISA como o teste de soroneutralização mostraram uma maior proporção de soropositivos nos Estados do sul (figura 5), regiões onde as estações são mais definidas, sugerindo que o fator climático esteja fortemente associado à dispersão viral, fundamentalmente por práticas de manejo, pois favorece o contato entre animais infectados e animais susceptíveis não infectados e portanto ajudando na dispersão do vírus. Estas observações estão de acordo com a literatura (CALDOW et al., 1993; KIMMAN et al., 1988; KELLING, 1993).

As amostras do Estado de Mato Grosso do Sul, devido ao número reduzido de soros (n=14), parecem ser pouco representativas para se realizar uma análise. Porém, dada a alta ocorrência de animais soropositivos nos Estados vizinhos acredita-se que um maior número de amostras elevaria os níveis de animais reagentes nesse Estado.

A comparação dos resultados obtidos em 103 amostras de soros de diferentes procedências, com o teste de soroneutralização, usando a amostra padrão BRSV-88 e a amostra recentemente isolada no Brasil, indica que os resultados são semelhantes e não existem diferenças significativas entre elas ($p < 0.05$), (Tabela 8). Isto demonstra que

estamos ante uma variedade de BRSV muito próxima da amostra padrão dos nossos estudos. Porém, os títulos dos soros obtidos com o vírus brasileiro foram maiores (até 1:1024), o que sugere uma maior especificidade causada pela formação de anticorpos contra esse vírus. Estes resultados estão em conformidade com a literatura, já que não há evidência de uma marcada variação antigênica entre os isolados BRSV, a não ser da leve heterogeneidade no tamanho das proteínas do BRSV (DUBOVI, 1993).

Em relação à influência da idade no aparecimento da doença, os animais jovens seriam os mais afetados pelo vírus, apesar de existir algumas diferenças quanto aos meses de maior prevalência da doença, dependendo da produção (corte ou leite), talvez devido a diferenças no manejo entre os lotes (AMES, 1993). Os 306 animais menores de 13 meses em nosso estudo (Tabela 6), apresentaram altos níveis de anticorpos anti-BRSV (ELISA 82% e TSN 87%), maiores que a média geral (ELISA 75% e TSN 68%). Isto corrobora a informação encontrada na literatura indicando essa faixa etária como sendo a mais afetada pelo vírus. Cabe fazer notar, que nesse grupo o teste mais sensível foi o TSN, provavelmente pelo fato de não ser seletivo quanto à classe de imunoglobulina (IgM ou IgG) detectada. Em alguns bezerros é muito provável que a doença estaria nos primeiros estágios, onde predominam imunoglobulinas da classe IgM, não detectadas pelo teste de

ELISA utilizado. Resultados também encontrados por GILLETTE (1983) e WESTENBRINK et al.(1985), indicam o teste SN como sendo o mais sensível para animais em estado agudo da doença e que seria o caso dos bezerros com infecção primária.

A realização do teste de SN é um procedimento laborioso e demorado, mas altamente sensível, principalmente em amostras procedentes de animais jovens com infecções primárias na fase aguda, por detectar também imunoglobulinas da classe IgM, as primeiras a surgirem. O teste de ELISA no entanto, é um teste medianamente complexo, mas rápido e sensível em animais com resposta secundária (GILLETTE, 1983; WESTENBRINK & KIMMAN, 1987). As vantagens do teste ELISA em relação ao teste de soroneutralização são principalmente no tocante as técnicas, ou seja, é menos laborioso, não depende sempre de culturas celulares, é adequado para monitoramento e exames rotineiros (WESTENBRINK et al., 1985). Por estas razões, é conveniente utilizar-se na pesquisa ambos os testes pela sua complementaridade.

Para o isolamento viral, foram colhidas amostras de secreções nasotraqueais de 33 animais vivos. A dificuldade de se conseguir amostras confiáveis foram grandes, ou seja, foi necessário que alguns procedimentos básicos fossem obedecidos, como por exemplo:

colheita asséptica do material, refrigeração da amostra e remessa rápida ao laboratório, bem como realizar a colheita no período ideal, ou seja, no início da enfermidade na provável ausência de contaminantes, principalmente bactérias.

O pequeno número de amostras processadas deve-se a estas complicações, como também, a dificuldade de acesso aos animais, pelo fato de não atuarmos diretamente como médicos veterinários em propriedades rurais.

O isolamento viral do BRSV é um procedimento trabalhoso e de resultados imprevisíveis, porque animais que evidentemente desenvolveram a doença não são os mais indicados para o isolamento (FREY, 1982; DUBOVI, 1993). Amostras de tecidos contendo altas concentrações de antígeno BRSV frequentemente não reproduzem o vírus em culturas celulares (DUBOVI, 1993). Vários fatores estão envolvidos, principalmente a alta labilidade do vírus, a qual requer cuidados especiais no intervalo entre a colheita das amostras até a inoculação à cultura celular. O tempo entre esses dois fatores deve ser reduzido ao mínimo (se possível, menos de 24 horas) e o vírus mantido a baixas temperaturas. Outra dificuldade encontrada é o elevado número de passagens celulares necessários para se obter sucesso no isolamento. Embora o BRSV esteja presente nas amostras, o isolamento não é conseguido,

provavelmente porque as células com alto número de passagens tenham menos receptores capazes de adsorver o vírus. Outro obstáculo encontrado, é o fato do vírus isolado perder a infectividade logo após às primeiras passagens, razão pela qual a reprodução experimental da doença ainda é de resultados não satisfatórios.

O isolamento viral a partir das amostras do Brasil foi realizado com sucesso com uma amostra procedente de Rio Grande do Sul, de um bezerro de 2 meses de idade, pertencente a um rebanho com sintomas respiratórios e soropositivo contra BRSV. Várias outras amostras da mesma procedência não chegaram a ser isoladas, embora tenham sido submetidas ao mesmo tratamento laboratorial. Estes resultados são explicados pela extrema labilidade do vírus (FREY, 1982; DUBOVI, 1993), que reflete em problemas que possam ter ocorrido durante a manipulação das amostras, levando a uma destruição da infectividade viral, e conseqüentemente, afetando sua replicação e detecção.

O êxito alcançado no isolamento, acredita-se que também tenha sido favorecido pela utilização de amostras de animais vivos, que continham ainda um número suficiente de partículas virais nas células com capacidade infectante. Entretanto, amostras procedentes de tecidos de animais necropsiados, como foi estudado no trabalho de GONÇALVES et. al (1993) no RS, a dificuldade de conseguir esses vírus livres e infectivos parece ser maior,

devido ao tempo transcorrido entre a morte, necrópsia e inoculação em culturas celulares. Além disso, é menos provável conseguir amostras de tecidos de animais necropsiados na fase aguda (inicial) da doença, ou seja, com sintomas leves da enfermidade (DUBOVI, 1993).

Os procedimentos utilizados para caracterizar o vírus, ou seja, testes de termoestabilidade, sensibilidade ao clorofórmio, efeito do IUDR, estabilidade ao pH, hemoaglutinação e hemadsorção, resumidos nas tabelas, 12, 13 e 14 mostram que estaríamos ante a presença de um vírus procedente de bovinos, não hemoaglutinante, envelopado, de RNA, cujo efeito citopático é a formação de sincícios. Essas características do BRSV também foram descritas por STOTT & TAYLOR, (1985) e MALLIPEDDI, (1990).

A morfologia encontrada por meio da microscopia eletrônica deste isolado (Figura 8), que mostra um vírus pleomórfico, espiculado e de tamanho aproximado de 100 a 300 nm, permitiram-nos identificar este isolado como sendo uma amostra brasileira de BRSV. A grande variabilidade morfológica e o grande número de partículas incompletas encontradas, vão de encontro com os achados de MALLIPEDDI, (1990).

O resultado do teste de soroneutralização cruzada, mostrou que existe uma semelhança antigênica entre os BRS-Vírus estudados, onde a amostra BRSV-25-BR neutralizou os antisoros específicos das amostras BRSV-88 e BRSV-375 e vice-versa. Resultados semelhantes foram comentados por DUBOVI (1993), quando foram comparadas diferentes amostras. Apesar de não termos concluído a produção de soros policlonais específicos para BRSV-25-BR, os soros colhidos de animais de campo neutralizaram as tres amostras virais de BRS, ou seja, a amostra brasileira cruza com as outras cepas estudadas. Isto nos leva a confirmar a presença deste vírus em nosso meio.

VI. CONCLUSÕES

1. Em 864 amostras de soro bovinos provenientes de diversas propriedades de criações localizadas em diferentes regiões geográficas do país, foi detectada a presença de anticorpos anti- BRSV por ELISA e soroneutralização.
2. O ELISA detectou 649 amostras positivas (75%) e a soroneutralização 578 (68%).
3. O ELISA foi ligeiramente mais sensível do que o teste de soroneutralização, diferença significativa a $p < 0.05$.
4. Embora o número de amostras colhidas por região não fosse uniforme, observou-se maior frequência de amostras positivas em animais criados na região sul do país.
5. Em 33 amostras colhidas de conteúdo nasotraqueal de animais no início da sintomatologia clínica, isolou-se uma amostra viral que foi denominada BRSV-25-BR.
 - 5.1. O isolamento foi realizado em células das linhagens MDBK e CER.

5.2. O efeito citopático e o título viral foram melhor observados na
Inhagem CER.

6. A amostra BRSV-25-BR demonstrou ser sensível ao clorofórmio, genoma
constituído por RNA, termolábil, estável em faixa de pH 6,0 a 9,0, não
hemoaglutinante e sem atividade de hemoadsorção.

7. A microscopia eletrônica revelou que a morfologia do vírus BRSV-25-BR é de
um vírus de 100 até 300 nm, arredondado, pleomórfico e espiculado,
características dos vírus respiratórios sinciciais.

8. Análises sorológicas comparando a amostra BRSV-88 (padrão nos nossos
estudos) e a amostra brasileira, não mostraram diferenças significativas ($p < 0.05$).

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-DARRAJI, A.M.; CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D; GRAHAM, D.L.; KLUGE, J.P.
& FRANK, G.H. Experimental infection of lambs with BRSV and *Pasteurella*
haemolytica: clinical and microbiologic studies. **Am. J. Vet. Res.**, **43**: 236-240,
1982.
2. AMES, T.R. The epidemiology of BRSV infection. **Vet. Medicine**, 881-885, 1993.
3. BAKER, J.C. & FEY, M.L. Bovine respiratory syncytial virus. **Vet. Clin. North, Am.**
(Food Anim. Pract.) 1(2): 259-275, 1985.
4. BAKER, J.C. Bovine respiratory syncytial virus: Pathogenesis, Clinical signs, Diagnosis,
Treatment and Prevention. **Compend. Cont. Ed. 8(9)**: F31-F38, 1986.
5. BAKER, J. & VELICER, L.F. Bovine respiratory syncytial virus vaccination: current
status and future vaccine development. **Comp. on Continuing Education for the
practicing .Vet.13**: 1323-1335, 1991.

6. BARTH, O. M. Estudos sobre a **contrastação** negativa de suspensões virais. **Rev. Brasil. Biol.**, **44(1)**: 71-80, 1984.
7. BELKNAP, E.B. Recognizing the clinical signs of BRSV infection. **Vet. Medicine**, 886-887, 1993.
8. BRYSON, D.G.; McCONNEL, s.; McALISKEY, M. & McNULTY, M.S. Ultrastructural features of alveolar lesions in induced respiratory syncytial virus pneumonia of calves. **Vet. Pathol.** **28**: 286-292, 1991.
9. BRYSON, D.G.; McFERRAN, J.B.; BALL, H.J. & NEILL, S.D. Observations on outbreaks of respiratory diseases in calves associated with parainfluenza type 3 and respiratory syncytial virus infection. **Vet. Rec.** **104**: 45-49, 1979.
10. BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M. & WIEDBRAUK, D.L. **Virology: A Laboratory Manual.** **Academic Press, INC.** San Diego, California. 1992.

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

12. DUBOVI, E.J. Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective **Vet. Medicine.** 888-893, 1993.

13. DURHAM, P.J.K; HASSARD, L.E. & VAN DONKERSGOED, J. Serological studies of infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine viral diarrhoea, and bovine respiratory syncytial viruses in calves following entry to a bull test station. **Can. Vet. J.**: 427-429, 1991.

14. ELLIS, J.A.; BELDEN, E.L.; HAVEN, T.R. & CAVENDER, J. Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of proliferation and secretion of lymphokines by leukocytes in vitro. **Vet. Immunol. and Immunopatol.** 34 :21-34, 1992.

15. FLORENT, G. & MARNEFFE DE, C. Enzyme-linked immunosorbent assay used to monitor serum antibodies to bovine respiratory disease viruses. **Vet. Microb. 11**: 309-317, 1986.
16. FREY, M.L. The clinical significance of bovine respiratory syncytial virus. **Proc. Fall Conference for Veterinarians**, University of Minnesota, St. Paul, pp 31-41, 1982.
17. FURZE, J.; WERTZ, G.; LERCH, R. & TAYLOR, G. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology 75(2)**: 363-370, 1994.
18. GELB, J.Jr. Infections bronchitis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. H.G. Purchase, L. H. Arp, C.H. Domermuth, and J.E. Pearson, eds. **American Association of Avian Pathologist, Kennett Square, Penn.** pp 124-127, 1989.
19. GILLETTE, K.G. Enzyme-linked immunosorbent assay for serum antibody to bovine respiratory syncytial virus: Comparison with complement-fixation and neutralization tests. **Am.J.Vet.Res. 44(12)**: 2251-2255, 1983.

20. GOUGH, R.E. & COLLINS, M.S. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. **Avian Path.** **18**: 227-238, 1989.
21. GRAHAM, B.S.; PERKINS, M.D.; WRIGHT, P.F. & KARZON, D.T. Primary respiratory syncytial virus infection of mice. **Jour. Med. Virol.** **26**: 153-162, 1988.
22. GRANT, M.; BAXTER-JONES, C. & WILDING, G.P. An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection. **Vet. Rec.** **21**: 279-280, 1987.
23. GONÇALVES, I.P.D.; JOST, H.C.; SOGLIO, A.D.; SIMANKE, A.T.; HOTZEL, I. & MOOJEN, V. Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria. **23**(3):389-390, 1993.
24. HÄNEL, A. Der Nachweis von Antikörpern gegen das Bovine Respiratorische Synzytialvirus (BRSV) in Rinderbeständen mit einem selbst-hergestellten indirekten ELISA. **Tierärztl. Umschau** **48**: 487-490, 1993.

- 25.HAFEZ, H.M. & WEILAND, F. Preliminary studies of a virus associated with turkey rhinotracheitis in West Germany. **Tieraerztl.Umschau.** 45:103-11, 1990.
- 26.HEALY, A.M.: MONAGHAN, M.L.: BASSETT, H.F.: GUNN, H.M.: MARKEY, B.K. & COLLINS, J.D. Morbidity and mortality in a large Irish feedlot; Microbiological and serological findings in cattle with acute respiratory disease. **British Veterinary Journal** 149 (6): 549-560, 1993.
- 27.INABA, Y.; TANAKA, Y.; SATO, K.; OMORI, T. & MATUMOTO, M. Bovine respiratory syncytial virus: Studies on an outbreak in Japan, 1968-1969. **Jap. J. Microbiol.** 16: 373-383, 1972.
- 28.JACOBS, J.W. & EDINGTON, N. Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. **Res. Vet. Sc.** 18: 299-306, 1975.
- 29.KELLING, C.L. Controlling BRSV infection in calves. **Vet. Medicine.** 903-906, 1993.

- 30.KIMMAN, T.G.; WESTENBRINK, F.; SCHREUDER, B.E. & STRAVER P.J. 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, 1987.
- 31.KIMMAN, T.G.; ZIMMER, G.M.; WESTENBRINK, F.; MARS, J. & VAN LEEUWEN, E. Epidemiological study of Bovine Respiratory syncytial virus infections in calves; influence of maternal antibodies on the outcome of disease. **Vet. Rec.**, **123**: 104-109, 1988.
- 32.LEHMKUHL, H.D. et al. Characterization and identification of a bovine respiratory syncytial virus isolated from young calves. **A.J.V.R.** **40**: 124-126, 1979.
- 33.LERCH, R.A.; STOTT, E.J. & WERTZ, G.W. Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins mRNAs and generation of cDNA clones to the viral mRNAs. **J. Virol.** **63**: 833-840, 1989.
- 34.LEVIN, J. Estatística Aplicada a Ciências Humanas. 2ª Edição. Editora Harbra Ltda., Harper & Row do Brasil, São Paulo, 1987.

35. MALLIPEDDI, S.K.; SAMAL, S.K. & MOHANTY, S.B. Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus infected cells. **Arch. Virol.** **115**: 23-36, 1990.
36. MASOT, A.J.; GOMEZ, L.; GOMEZ-TEJEDOR, C.; MARTINEZ, S. & REDONDO, E. The immunologic response to experimental infection with bovine respiratory syncytial virus in lambs. **J.Vet.Med. B** **40**: 659-666, 1993.
37. MASSON, C.; DELVERDIER, M.; SCHELCHER, F.; ABELL, N.; VALARCHER, J.F.; ESPINASSE, J. & CABANIE, P. Mise en évidence immunopéroxydasique du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) sur coupes en paraffine de tissu pulmonaire bovin. **Revue Méd. Vét.** **144 (2)**: 99-104, 1993.
38. MATHEISÉ, J.P.; WALRAVENS, K.; COLLARD, A.; COPPE, P. & LETESSON, J.J. Antigenic analysis of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: Identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition. **Arch. of Virol.** **140(6)**: 993-1005, 1995.

39. MATUMOTO, M.; INABA, Y.; KUROGI, H.; SATO, K.; OMORI, T.; GOTO, Y. & HIROSE, O. Bovine respiratory syncytial virus: host range in laboratory animals and cell culture. **Arch. Ges. Virusforsch.** 44: 280-290, 1974.
40. MAYR, A.; BACHMANN, P.A.; BIBRACK, B. & WITTMANN, G. Virologische Arbeitsmethoden. **Gustav Fischer Verlag** 1974.
41. MOHANTY, S.B.; INGLING, A.L. & LILLIE, M.G. Experimentally induced respiratory syncytial viral infection in calves. **Am.J.Vet.Res.** 36: 417-419, 1975.
42. OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; HENNESSY, K.J.; STINE, L.C.; EVERMANN, J.F. & KELLING, C.L. Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridizations. **J.Clin.Microbiol.** 31: 1237-1240, 1993.
43. OERVELL, C.; NORRBY, E. & MUFSON, M.A. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. **J. Gen. Vir.** 68: 3125-3135, 1987.

44. OLCHOWY, T.W.J.; AMES, T.R. & MOLITOR, T.W. Interaction of Bovine Respiratory Syncytial Virus with Bovine Alveolar Macrophages in vivo: Effects of Virus Infection upon Selected Cell Functions. **Canadian Journal of Veterinary Research** **58(1)** : 42-48, 1994.
45. PACCAUD, M.G. & JACQUIER, C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Arch. Ges. Virusforsch.** **30**: 327-342, 1970.
46. PEETZ, V.S.; BORTOLETO, E.E. & BUENO, C.R.F. **Informações Econômicas.** **25(11)** 05-112, 1995.
47. PICAULT, J.P. Isolation of a TRT-like virus from chickens with swollen head syndrome. **Vet. Rec.** 121-135, 1989.
48. PIRIE, H.M.; PETRIE, L.; PRINGLE, C.R.; ALLAN, E.M. & KENNEDY, G.J. Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus. **Vet. Rec.** **108**: 411-416, 1981.
49. REED, J.L. & MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **Amer. J. Hyg.** **27**:493, 1938.

- 50.ROSENQUIST, B.D. Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory diseases. **J. Infect. Dis.** **130**: 177-182, 1974.
- 51.ROSSI, C.R. & KIESEL, G.K. Serological evidence for the association of bovine respiratory syncytial virus with respiratory tract disease in Alabama cattle. **Infect. Immun.** **10**: 293-298, 1974.
- 52.SAMAL, S. & ZAMORA, M. Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. **J.of Gen. Virol.** **72**: 1715-1720, 1991.
- 53.SCHRIJVER, R.S.; KRAMPS, J.A.; MIDDEL, W.G.J.; LANGEDIJK, J.P.M. & VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine respiratory syncytial virus replicates minimally in bovine alveolar macrophages. **Arch. of Virol.** **140 (11)** : 1905-1917, 1995.
- 54.SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. **Vet. microbiol.** **23**: 267-272, 1990 a.

55. SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. Increased susceptibility to *Pasteurella haemolytica* in lambs infected with bovine respiratory syncytial virus. **J. Comp. Path.** 103: 411-420, 1990 b.
56. SHARMA, R.; WOLDEHIWET, Z. Immune responses of lambs experimentally infected with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*. **J. Comp. Path.** 105: 157-166, 1991.
57. SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. Class-specific antibodies to bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. **Epidemiol. Infect.** 108: 135-145, 1992a.
58. SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. Reinfection of lambs with bovine respiratory syncytial virus. **Res. Vet. Science**, 52: 72-77, 1992b.
59. SMITH, M.H.; FREY, M.L. & DIERKS, R.E. Isolation, characterization, and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. **Arch. Virol.** 47: 237-247, 1975.

60. SMITH, A.L.; TIGNOR, G.H. & MIFUNE, K. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. **Intervirology** 8: 92-99, 1977.
61. STEWART, R. & GERSHWIN, L. Detection of IgE antibodies to bovine respiratory syncytial virus. **Vet. immunol. and immunopatol.** 20: 313-323, 1989.
62. STEINHAGEN, P.; HUEBERT, P. Epidemiological observations on viral diseases of cattle, 1986 to 1993. **Tieraerztliche Umschau.** 50(4) : 264-271, 1995.
63. STOTT, E.J.; THOMAS, L.H.; COLLINS, A.P.; CROUGH, S.; JEBBETT, J.; SMITH, G.S.; LUTHER, P.D. & CASWELL, R.A. Survey of virus infection of the respiratory tract of cattle and their association with disease. **J. Hyg.** 85: 257-270, 1980.
64. STOTT, E.J. & TAYLOR, G. Respiratory syncytial virus. Brief Review. **Arch. Virol.** 84: 1-52, 1985.
65. TAYLOR, G.; STOTT, E.J.; BEW, M.; FERNIE, B.F.; COTE, P.J.; COLLINS, A.P.; HUGHES, M. & JEBBETT, J. Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus in mice. **Immunology** 52: 137-142, 1984.

66. VAN den INGH, T.S.G.A.M.; VERHOEFF, J. & VAN NIEUWSTADT, A.P.K.M.I.
Clinical and pathologic observations on spontaneous bovine respiratory syncytial virus infections in calves. **Res. Vet. Sc.** **33**: 152-158, 1982.
67. VAN DER POEL, W.H.M.; KRAMPS, J.A.; MIDDEL, W.G.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. & BRAND, A. Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: A longitudinal epidemiological study in dairy herds. **Archives of Virology** **133(3-4)**: 309-321, 1993.
68. VAN DER POEL, W.H.M.; MOURITS, M.C.M.; NIELEN, M.; FRANKENA, K.; VAN OIRSCHOT, J.T. & SCHUKKEN, Y.H. Bovine respiratory syncytial virus reinfections and decreased milk in dairy cattle. **Vet. Quarterly** **17(3)**: 77-81, 1995.
69. VAN DONKERSGOED, J.; VAN DEN HURK, J.V.; McCARTNEY, D. & HARLAND, R.J. Comparative serological responses in calves to eight commercial vaccines against infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses. **Can. Vet. J.** **32**: 727-733, 1991.

70. VERHOEFF, J. & VAN NIEUWSTADT, A.P.K.M.I. Bovine respiratory syncytial virus.
Vet, Rec. 114: 288, 1984.
71. VERHOEFF, J. & WIERDA, A.; VAN NIEUWSTADT, A.P.K.M.I. & BUITELAAR,
J.W. Spontaneous bovine respiratory syncytial virus infections in calves: Arterial
blood gas, pH and bicarbonate values. **Vet, Rec. 117:** 202-204, 1985.
72. VERHOEFF, J.; WIERDA, A. & BOON, J.H. Clinical signs following experimental
lungworm infection and natural bovine respiratory syncytial virus infection in calves.
Vet, Rec. 123: 346-350, 1988.
73. WESTENBRINK, F.; BRINKHOF, J.M.A.; STRAVER, P.J.; QUAK, J. & DE
LEEuw, P.W. Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent
assay with complement fixation and neutralization tests for serology of bovine
respiratory syncytial virus infections. **Res. in Vet. Scien. 38:** 334-340, 1985.
74. WESTERNBRINK, F. & KIMMAN, T.G. Immunoglobulin M-specific enzyme-linked
immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine respiratory syncytial virus
infections. **Am.J.Vet.Res., 48(7):** 1132-1137, 1987.

75. ZAMORA, M. & SAMAL, S.K. Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.** 73: 737-741, 1992