



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VICTOR HENRIQUE SILVA DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES VIRAIS E
BACTERIANAS ASSOCIADAS A UM SURTO DE DOENÇA
RESPIRATÓRIA EM BEZERRAS LEITEIRAS**

Londrina
2014

VICTOR HENRIQUE SILVA DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES VIRAIS E
BACTERIANAS ASSOCIADAS A UM SURTO DE DOENÇA
RESPIRATÓRIA EM BEZERRAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48d Oliveira, Victor Henrique Silva de.

Diagnóstico molecular de infecções virais e bacterianas associadas a um surto de doença respiratória em bezerras leiteiras / Victor Henrique Silva de Oliveira. – Londrina, 2014.
82 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Bovino – Aparelho respiratório – Doenças – Teses. 3. Víruses em animais – Teses. 4. Diagnóstico molecular – Teses. 5. Virologia veterinária – Teses. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.2

VICTOR HENRIQUE SILVA DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES VIRAIS E
BACTERIANAS ASSOCIADAS A UM SURTO DE DOENÇA
RESPIRATÓRIA EM BEZERRAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Márcio Carvalho da Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Londrina, 2 de outubro de 2014.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

DEDICO

A meus pais Adalto e Rita;
e meu irmão Pedro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por tudo.

Aos meus pais pelo apoio à toda minha formação com amor incondicional.

Ao meu irmão pelo fortalecimento dos nossos laços de amor fraterno independente da distância.

Aos meus orientadores Prof^o Amauri A. Alfieri e Prof^a Alice F. Alfieri pelos 4 anos de orientação nas diferentes etapas da minha formação incluindo estágio curricular, residência médica e mestrado. Por serem exemplos de conhecimento e dedicação na pesquisa.

Aos membros da banca de qualificação Prof^o Selwyn A. Headley e Prof^a Elis Lorenzetti pela disponibilidade e considerações. Por terem sido decisivos em todo o conhecimento prático que adquiri no laboratório.

Aos membros da banca de defesa Prof^o Ulisses de Pádua Pereira e Prof^o Márcio Carvalho da Costa.

Ao pessoal do laboratório que contribuiu para a realização deste e de outros trabalhos.

Ao corpo docente do programa de Residência em Medicina Veterinária Preventiva e da pós-graduação em Ciência Animal pela formação científica.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À minha psicóloga Maria Luiza.

A todos os meus familiares do Rio de Janeiro e de Brasília.

Aos meus amigos de Brasília que nunca esqueci e em diversas ocasiões me visitaram em Londrina. Filipe, Giuliane, Jean Paul, Rafaela, Gabriel e Yna.

Aos meus amigos da Universidade de Brasília. Vanessa, Pollyanna, Paulo, Vinícius, Michele, Luiza, Rosana, Martha, Rebekah, Katia Lie (*in memoriam*) e à minha orientadora de iniciação científica Prof^a Simone Perecmanis

À cidade de Londrina onde fui muito bem recebido por todos e construí laços de amizade eterna com Ana Paula, Brígida (Bucha), Danilo, Dhyego, Edson, Juliana e Wagner.

“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem saber ver.”

Gabriel García Márquez.

OLIVEIRA, Victor Henrique Silva. Diagnóstico molecular de infecções virais e bacterianas associadas a um surto de doença respiratória em bezerras leiteiras. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

Infecções respiratórias em bovinos caracterizam-se por serem multifatoriais e multi-etiológicas. Na pecuária bovina leiteira as doenças respiratórias são mais frequentes em animais jovens, principalmente nas primeiras semanas de vida. Devido à prevalência e às altas taxas de morbidade e mortalidade, as doenças respiratórias podem ser responsáveis por consideráveis prejuízos econômicos para a cadeia produtiva do leite. Além da presença de micro-organismos patogênicos para o trato respiratório bovino como vírus e bactérias, condições estressantes como manejo sanitário e nutricional inadequados, falhas nos processos limpeza e desinfecção das instalações, criação coletiva incluindo animais de diferentes faixas etárias, condições ambientais desfavoráveis como extremos de temperaturas, entre outros são fatores predisponentes que contribuem para o aumento no número de casos e, principalmente, da gravidade das infecções respiratórias em bezerras leiteiras. Com relação à etiologia viral, os principais agentes associados às infecções respiratórias primárias em bovinos jovens são o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), herpesvírus bovino-1 (BoHV-1), coronavírus bovino (BCoV) e vírus da parainfluenza bovina 3 (BPIV-3). A *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma bovis* são os principais agentes bacterianos envolvidos em casos clínicos de doença respiratória em bezerras sendo geralmente responsáveis por infecções secundárias do trato respiratório ocasionando às pneumonias. Vírus e bactérias podem agir de forma independente ou, mais frequentemente, em associação dificultando o diagnóstico etiológico definitivo das infecções do trato respiratório bovino. O objetivo deste estudo foi identificar os agentes infecciosos envolvidos em um surto de doença respiratória em bezerras de uma unidade de criação de bezerras leiteiras. A unidade avaliada localizava-se na região Oeste do Estado do Paraná e recebia bezerras provenientes de 40 pequenos rebanhos leiteiros em sistema de produção familiar. Na ocasião, a unidade mantinha, aproximadamente, 125 bezerras sem raça definida que chegaram à unidade com 2 a 5 dias de idade e que foram mantidas em abrigos coletivos. Excetuando-se o controle compulsório de brucelose e tuberculose bovina, o manejo sanitário em cada rebanho de origem não era monitorado. Para o diagnóstico etiológico foram coletadas 21 amostras de lavados broncoalveolares (BALs) de bezerras com 2 a 90 dias de idade, sendo 15 BALs provenientes de bezerras com sinais clínicos evidentes de doença respiratória e seis BALs colhidos de bezerras assintomáticas no momento da colheita. Para o rápido diagnóstico dos principais agentes etiológicos envolvidos no surto, na dependência do micro-organismo, foram utilizadas técnicas moleculares como RT-PCR, PCR e *nested*-PCR. Pelo menos um micro-organismo foi detectado em 85,7% dos BALs avaliados. As coinfeções foram mais frequentes (72,2%) do que as infecções singulares (27,7%). Nas coinfeções a interação de vírus com bactéria foi a mais frequente (55,5%). A frequência dos agentes infecciosos envolvidos no surto de doença respiratória em bezerras deste estudo foi: BRSV (38,1%), BCoV (33,3%), BVDV (28,6%), *P. multocida* (42,85%), *M. bovis* (33,3%) e *H. somni* (19%). Esses resultados evidenciam a etiologia múltipla de infecções respiratórias em bezerras de uma unidade de criação de bezerras leiteiras e demonstraram a importância do diagnóstico etiológico da enfermidade com o objetivo de direcionar as medidas terapêuticas, de controle e prevenção das infecções bacterianas e virais responsáveis pelo desencadeamento das infecções respiratórias que muitas vezes são negligenciadas nos rebanhos bovinos leiteiros brasileiros.

Palavras-chave: Bovinos. Bezerras leiteiras. Doença respiratória. Diagnóstico molecular.

Oliveira, Victor Henrique Silva. Molecular diagnosis of viral and bacterial infections associated with an outbreak of respiratory disease in dairy calves. 2014. 82 p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Respiratory infections in cattle are recognized as being a multifactorial and multietiologic disorder. In dairy cattle, respiratory diseases are more frequent in calves during the first few weeks of life. Due to high morbidity and mortality rates, respiratory diseases represent an important cause of economic losses for dairy industry. In addition to the presence of pathogenic microorganisms to the bovine respiratory tract, such as viruses and bacteria, stressful conditions including inadequate sanitary and nutritional management, inefficient cleaning and disinfection procedures of facilities, older animals housed with younger, adverse conditions of temperature, among others, are predisposing factors for a greater number of cases, and specially for increasing the severity of respiratory disease in dairy calves. Regarding to viral etiology, the main agents associated with primary respiratory infections in calves are bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), bovine coronavirus (BCoV), and bovine parainfluenza 3 virus (BPIV-3). *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, and *Mycoplasma bovis*, are the main bacteria involved in clinical cases of respiratory disease in calves, and usually are associated with a secondary invasion of respiratory tract causing pneumonia. These etiologic agents may cause single infections but are more frequently associated with coinfections, which make an effective diagnosis more difficult. The aim of this study was to investigate the infectious agents in an outbreak of respiratory disease in calves from a dairy rearing unit. The farm was located in Paraná State, south region of Brazil, and received female calves from 40 small dairy herds of household production. Approximately 125 mixed breed calves were maintained in the rearing unit after arrival with 2 to 5 days of age and were housed in group pens. Except for the compulsory sanitary management against bovine brucellosis and tuberculosis, the sanitary management in each herd was not monitored. Bronchoalveolar lavages (BALs) were taken from 21 animals with age ranging from 2 to 90 days, with 15 BALs from calves showing clinical signs of respiratory disease and 6 from asymptomatic calves, at the time of collection. For the rapid diagnosis of the main etiologic agents associated with the outbreak, molecular techniques such as RT-PCR, PCR, and nested-PCR were performed, according to the microorganism evaluated. At least one microorganism was detected in 85.7% of samples evaluated. Coinfections of the respiratory tract were more frequent (72.2%) than single infections (27.7%). The interactions between viruses and bacteria were the most common in coinfections (55.5%). The frequency of BRD agents included BRSV (38.1%), BVDV (28.6%), BCoV (33.3%), *P. multocida* (42.85%), *M. bovis* (33.3%), and *H. somni* (19%). These results show the multiple etiologies of respiratory infections in dairy calves from a calf rearing unit and highlight the importance of etiologic diagnosis of the disease to provide guidelines related to therapy, prevention, and control measures against viruses and bacteria responsible for the induction of these infections that is currently neglected in dairy cattle of Brazil.

Keywords: Cattle. Dairy calves. Respiratory disease. Molecular diagnosis.

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Interação das bactérias associadas à doença respiratória em bezerrase o hospedeiro em homeostase. Bactérias colonizam o trato respiratório sem que ocorra sobrecarga dos fatores de virulência sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro..... 17
- Figura 2** – Fatores predisponentes prejudicam a homeostase ao induzir falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro e acarretam sobrecarga do trato respiratório ao favorecer a colonização por micro-organismos patogênicos/e ou oportunistas com o desenvolvimento da doença respiratória em bezerras..... 18
- Figura 3** – (A) Instalações de uma unidade de criação de bezerras leiteiras que apresentaram sinais clínicos respiratórios. (B) Bezerras compartilhando o bico do aleitador em um sistema de criação em abrigo coletivo. (C) Bezerra com sinais clínicos de doença respiratória apresentando secreção ocular e nasal 19

APÊNDICE

- Figura 4** – Árvore filogenética demonstrando que o BVDV 1d circulava na unidade de criação (círculo preenchido) durante um surto de doença respiratória em bezerras. A árvore foi construída utilizando-se sequências de 226 nucleotídeos da região 5' não traduzida do genoma do BVDV de cepas brasileiras da região geográfica do estudo (losango preenchido) e cepas referência dos subgenotipos de BVDV-1 e BVDV-2 (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2002). A cepa X818 do vírus da doença da fronteira foi utilizada como *outgroup*. Os números de acesso correspondentes para cada cepa utilizada são dados entre colchetes. A análise filogenética foi realizada no programa MEGA v.6.0 através do método de *neighbor-joining* com modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros. A árvore gerada foi testada com *bootstrap* de 1.000 replicações e valores abaixo de 50% foram omitidos 61

LISTA DE TABELAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Table 1** – List of primers with the corresponding target genome region used to detect bovine respiratory disease agents in clinical specimens..... 45
- Table 2** – Detection of infectious agents associated with BRD from bronchoalveolar lavages of dairy calves ($n=21$) 47
- Table 3** – Frequency of single and mixed infections in bronchoalveolar lavages samples during an outbreak of bovine respiratory disease in dairy calves..... 48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. SISTEMA RESPIRATÓRIO DOS BOVINOS	16
2.2. INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS EM BEZERROS	17
2.2.1 Agentes etiológicos.....	20
2.2.1.1. Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV).....	20
2.2.1.2. Vírus da parainflunza-3 (BPIV-3).....	21
2.2.1.3. Vírus da diarreia viral bovina (BVDV).....	22
2.2.1.4. Coronavírus bovino (BCoV).....	23
2.2.1.5. Herpesvírus bovino-1 (BoHV-1).....	24
2.2.1.6. <i>Pasteurella multocida</i>	24
2.2.1.7. <i>Mannheimia haemolytica</i>	25
2.2.1.8. <i>Histophilus somni</i>	26
2.2.1.9. <i>Mycoplasma bovis</i>	27
2.2.2. Diagnóstico laboratorial	27
2.2.3. Prevenção e Controle.....	29
2.3. REFERÊNCIAS.....	31
3. OBJETIVOS	38
3.1. OBJETIVO GERAL	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	40
<i>VIRUSES AND BACTERIA ASSOCIATED WITH SINGLE AND MIXED INFECTIONS IN AN OUTBREAK OF BOVINE RESPIRATORY DISEASE IN A DAIRY CALF REARING UNIT</i>	
<i>Introduction</i>	41
<i>Materials and Methods</i>	42
<i>Results</i>	46
<i>Discussion</i>	49
<i>References</i>	53
5. CONCLUSÕES.....	59
6. APÊNDICES	61
7. ANEXOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A produção leiteira mundial no ano de 2012 ultrapassou os 620 milhões de toneladas. O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo com mais de 32 milhões de toneladas produzidas, correspondendo a, aproximadamente, 5,2% da produção mundial (FAO, 2014). O último censo agropecuário do IBGE, em 2006, revelou que o Brasil possui aproximadamente 1,34 milhão de propriedades produtoras de leite. Nos últimos anos o país apresentou saldos positivos na balança comercial em relação aos produtos lácteos, com aumentos cada vez mais consistentes nas exportações. A demanda por produtos lácteos apresenta projeções de crescimento mundial e o Brasil figura como um país de grande potencial para suprir este mercado consumidor, devido ao seu amplo território e ao grande número de bovinos leiteiros (EMBRAPA, 2012; IBGE, 2013). Para atingir os mercados mais exigentes, o país precisa evoluir em qualidade de leite e melhorar em produtividade, ainda muito inferior à produção obtida pelos Estados Unidos e pelos países membros da União Europeia (USDA, 2013). Explorar ao máximo o potencial genético do rebanho nacional priorizando a criação adequada de bezerras é essencial para atingir essa condição.

A criação de bezerras leiteiras representa uma atividade secundária da cadeia produtiva do leite com o objetivo principal de produzir animais adultos de reposição para o rebanho leiteiro. Animais que atingem precocemente sua fase produtiva representam maior retorno econômico para o produtor. Atualmente, em rebanhos tecnificados, sistemas intensivos de criação vêm sendo adotados com o manejo de animais confinados em abrigos coletivos. Para que este tipo de manejo seja viável, uma das principais metas é a manutenção do *status* sanitário adequado do rebanho. Entretanto, como nessa fase da produção o animal não proporciona retorno direto para o produtor, os cuidados com as bezerras muitas vezes são negligenciados (EMBRAPA, 2005).

A doença respiratória em bezerras, também denominada, pneumonia enzoótica, junto com as diarreias neonatais são as doenças mais comuns e de maior importância econômica nas unidades de criação de bezerras de leite. Os custos para o produtor estão associados às altas taxas de morbidade e mortalidade, despesas com prevenção e tratamentos, além de redução na produtividade ocasionada pelo maior período de tempo necessário para que a bezerra atinja a fase produtiva (SVENSSON et al., 2003). Estimativas revelam que o custo por bezerro devido às infecções respiratórias varia de US\$9,84 a US\$16,35 (GORDEN;

PLUMMER, 2010), podendo ultrapassar os US\$120,00 quando ocorrem surtos em um rebanho (ANDREWS, 2000).

A doença respiratória em bezerras é uma desordem multietiológica e multifatorial tendo como principais agentes infecciosos envolvidos os vírus e as bactérias atuando de forma isolada ou, mais frequentemente, em associação. Os vírus de maior relevância nas infecções primárias do trato respiratório são: vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), herpesvírus bovino-1 (BoHV-1), coronavírus bovino (BCoV) e vírus da parainfluenza bovina 3 (BPIV-3). A *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma bovis* são os agentes bacterianos mais encontrados e geralmente associados às invasões secundárias do trato respiratório podendo causar pneumonia em bezerras jovens (GRIFFIN et al., 2010; PANCIERA; CONFER, 2010).

No Brasil, estudos relacionados às doenças respiratórias em bovinos são escassos e se limitam aos achados patológicos e à caracterização de apenas alguns poucos agentes infecciosos específicos e com pouca ênfase nas coinfeções. A diversidade de micro-organismos comensais e potenciais patógenos do trato respiratório dificulta o diagnóstico etiológico preciso das infecções respiratórias em bovinos. O presente estudo foi delineado com o objetivo principal de identificar os principais e potenciais agentes etiológicos de um surto de doença respiratória ocorrido em uma unidade de criação de bezerras leiteiras. Por meio do uso de técnicas moleculares foi possível identificar os principais micro-organismos virais e bacterianos em amostras de lavado broncoalveolares provenientes de bezerras assintomáticas e com sinais clínicos respiratórios. A padronização das metodologias de diagnóstico molecular e a gama de micro-organismos virais e bacterianos identificados nesse estudo tanto em infecções singulares quanto mistas abrem a perspectiva do delineamento de estudos epidemiológicos mais robustos que possibilitarão caracterizar as principais interações entre micro-organismos (vírus x bactérias) mais frequentes em infecções do trato respiratório de bovinos jovens e adultos manejados sob condições tropicais. Com isso, será possível avaliar e implantar medidas de controle e profilaxia que possibilitem redução na taxa e/ou na intensidade da infecção do trato respiratório de bovinos contribuindo com redução nos custos de produção, nas taxas de morbidade e mortalidade e, conseqüentemente, com aumento de produtividade e rentabilidade do agronegócio, com destaque para as cadeias produtivas do leite, no caso de bezerras, e da carne, particularmente em relação aos animais de corte terminados em sistema de confinamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SISTEMA RESPIRATÓRIO DOS BOVINOS

O trato respiratório superior (TRS) dos bovinos está exposto a diversos micro-organismos que são inalados e àqueles que são comensais na região da nasofaringe (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010). O trato respiratório inferior (TRI) possui uma árvore traqueobrônquica relativamente mais extensa em relação ao homem e às outras espécies de animais domésticos. A traqueia com um maior número de divisões resulta em mais ramificações em brônquios e uma quantidade maior de lobos pulmonares (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011). Além disso, o pulmão bovino possui número reduzido de poros de Kohn, ou conexões interalveolares, que servem como via alternativa para as trocas gasosas através de uma ventilação colateral. Devido tais características, os bovinos são predispostos à hipóxia pulmonar, resultado de uma hipoventilação alveolar, e as regiões afetadas ficam sob vasoconstricção, como tentativa de balancear a razão ventilação/perfusão (DELAUNOIS, 1989). Com isso, há um aumento do espaço morto das vias aéreas, onde não ocorrem trocas gasosas, e conseqüentemente há uma permanência maior do volume de ar inalado no trato respiratório (TR). O resultado disto é a deposição de uma grande quantidade de partículas na mucosa do TR, oriundas da inalação de vapores, gases e partículas em suspensão no ar (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010). O aporte sanguíneo pulmonar é então desviado para regiões onde ocorrem trocas gasosas eficientes e há um aumento da demanda de proteção imunológica em regiões afetadas do órgão, embora a ocorrência de reações inflamatórias extensas seja ainda mais prejudicial à função pulmonar (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Mesmo possuindo essas particularidades, existem mecanismos sofisticados de defesa, incluindo processos físicos, secretórios, celulares e microbiológicos que, sob condições favoráveis, previnem com eficiência a invasão e a proliferação de patógenos no TRI. O reflexo de tosse e a filtração aerodinâmica caracterizam-se por expelir partículas e diminuir a carga de potenciais patógenos que atingem as vias aéreas inferiores (ACKERMANN; BROGDEN, 2000). Há ainda o eficiente aparelho muco-ciliar, que recobre a superfície mucosa do TRS com muco, e dificulta a aderência e colonização de patógenos junto com um constante movimento ascendente provido pelos cílios do epitélio respiratório expelindo o

muco contaminado para o meio externo (SRIKUMARAN; KELLING; AMBAGALA, 2007). A mucosa respiratória é também recoberta pelo líquido superficial das vias respiratórias (LSR) que tem papel crucial na defesa imune inata contra patógenos respiratórios. O LSR é composto por diversas substâncias responsáveis por controlar a atividade inflamatória e modular a resposta imune no TR (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010). Moléculas de defensinas e proteínas surfactantes A e D presentes no LSR, por exemplo, desempenham funções bactericidas e podem se ligar a superfície de patógenos de forma a torná-los mais vulneráveis à defesa celular exercida por fagócitos como macrófagos e neutrófilos (GRIFFIN et al., 2010). A colonização do TRS por micro-organismos comensais também exerce função protetora, ao ocupar receptores celulares e tornar indisponíveis micronutrientes essenciais para a colonização por patógenos (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010) (Figura 1).



Figura 1 - Interação das bactérias associadas à doença respiratória em bezerras e o hospedeiro em homeostase. Bactérias colonizam o trato respiratório superior sem que ocorra sobrecarga dos fatores de virulência sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro. Fonte: Rice et al., 2007 (adaptado).

2.2. INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS EM BEZERROS

As práticas de manejo em grupo e algumas particularidades anatômicas e fisiológicas do TR dos bovinos favorecem a exposição a bactérias e vírus com potencial patogênico e causadores de enfermidades respiratórias, em especial as pneumonias, que são mais frequentes e de maior importância nas criações de bezerras (HÄRTEL et al., 2004; SVENSSON; LIBERG, 2006).

As infecções respiratórias podem afetar bovinos de todas as idades, embora a frequência seja maior em bezerros de até 3 meses. Em bezerras de leite, picos de ocorrência da doença acometem animais de 4 a 6 semanas de idade. Segundo estudos epidemiológicos realizados na América do Norte (SIVULA et al., 1996; DABO; TAYLOR; CONFER, 2007) e na Europa (SVENSSON et al., 2003), em bezerras de leite a doença respiratória atinge altas taxas de morbidade variando de 6 a 29% e mortalidade variando de 5 a 10%. No Brasil, um estudo retrospectivo revelou que essas taxas são superiores no país, podendo atingir uma morbidade de 100% e mortalidade de 34,6% em bovinos jovens (BRASIL et al., 2013).

A presença dos agentes infecciosos *per se* não é suficiente para acarretar os sinais clínicos da doença respiratória em bezerras, já que a presença destes é ubíqua nas criações (WINDEYER et al., 2014). Fatores predisponentes induzem falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro e favorecem uma sobrecarga do TR destes animais pelos micro-organismos patogênicos e/ou oportunistas, com o desenvolvimento da doença. O manejo inadequado de animais confinados, provenientes de diferentes locais, e condições ambientais desfavoráveis resulta em maior incidência de animais doentes e com quadro clínico de maior gravidade. A ausência de medidas quarentenárias, alta densidade de animais, más condições de higiene e ventilação das instalações, histórico de diarreias, falhas na transferência de imunidade passiva e sistemas de aleitamento compartilhado estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença respiratória em bezerras (SVENSSON et al., 2003; GULLIKSEN et al., 2009; TAYLOR et al., 2010) (Figura 2).

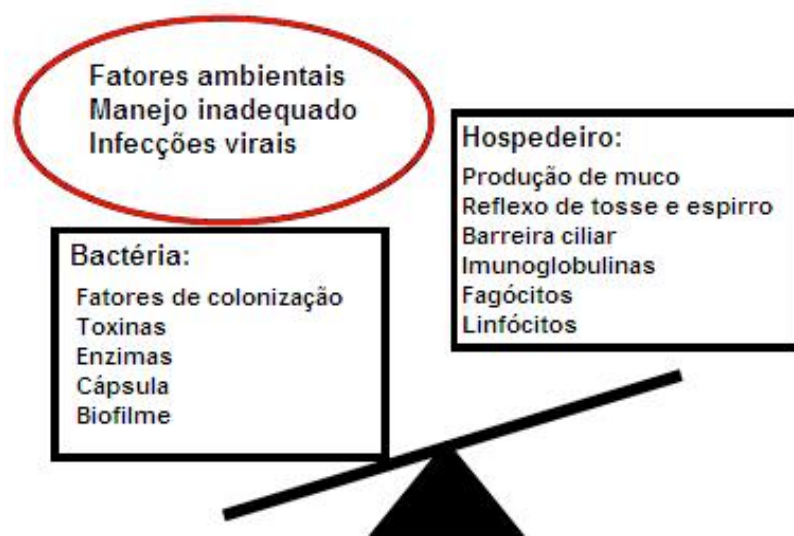


Figura 2 - Fatores predisponentes prejudicam a homeostase ao induzir falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro e acarretam uma sobrecarga do trato respiratório ao favorecer a colonização por micro-organismos patogênicos e/ou oportunistas com o desenvolvimento da doença respiratória em bezerras. Fonte: Rice et al., 2007 (adaptado).

A transmissão dos agentes etiológicos da doença respiratória de bezerras ocorre de forma direta quando os animais inalam os micro-organismos de secreções nasais ou oculares de algum animal infectado. A transmissão indireta ocorre principalmente através de água e alimentos contaminados, assim como por fômites (bico do aleitador ou objetos e utensílios utilizados pelos tratadores). Os sinais clínicos costumam ser observados de 7 a 10 dias após o contágio e são mais graves quando há associação entre os agentes infecciosos da doença agindo em sinergismo (APLEY, 2006; SVENSSON; LIBERG, 2006; DABO; TAYLOR; CONFER, 2007). No início, os sinais costumam ser brandos e evoluem a medida que há comprometimento do TRI pelas infecções bacterianas secundárias. Detectar precocemente e com precisão os animais doentes é primordial para aumentar as chances do sucesso terapêutico e para garantir o controle da doença no rebanho. Os principais sinais clínicos que sugerem doença respiratória em bovinos jovens são descargas nasais e oculares, tosse, sons respiratórios anormais, aumento da frequência respiratória (≥ 40 movimentos por minuto), aumento da temperatura retal ($\geq 39,5^{\circ}\text{C}$), apatia e anorexia (Figura 3) (APLEY, 2006; AUTIO et al., 2007; ANGEN et al., 2009; GRIFFIN et al., 2010).



Figura 3 - (A) Instalações de uma unidade de criação de bezerras leiteiras que apresentaram sinais clínicos respiratórios. (B) Bezerras compartilhando o bico do aleitador em um sistema de criação em abrigo coletivo. (C) Bezerra com sinais clínicos de doença respiratória apresentando secreção ocular e nasal.

Bezerras identificadas com doença respiratória devem ser tratadas precocemente e com fármacos adequados com o objetivo de aumentar as chances de sucesso terapêutico. Como normalmente espécies diferentes de bactérias estão envolvidas, preconiza-se o uso de antimicrobianos de amplo espectro e de duração prolongada. Os antimicrobianos mais utilizados, associados ou não, são espectinomicina, tulatromicina, florfenicol, enrofloxacin e oxitetraciclina. Durante o tratamento, as bezerras devem ser acompanhadas para avaliar a necessidade de estender o período do tratamento ou uma possível mudança de princípio ativo (APLEY, 2006). Falhas na terapia ocasionadas por resistência das bactérias aos antimicrobianos são comuns e, geralmente, são associadas às infecções por *M. bovis*. Em um estudo recente realizado na França, em 100% das 143 amostras avaliadas não houve isolados contemporâneos de *M. bovis* sensíveis a qualquer um dos antibióticos recomendados para o tratamento das infecções respiratórias (GAUTIER-BOUCHARDON et al., 2014).

2.2.1 Agentes etiológicos

2.2.1.1. Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV)

O BRSV é considerado o vírus mais importante que infecta o TR de bezerros como agente primário da doença respiratória. O vírus é classificado na família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus*. É um vírus envelopado, pleomórfico, de genoma RNA fita simples, não segmentado e de polaridade negativa. Possui características estruturais, genômicas e antigênicas similares aos vírus sinciciais ovino e caprino e ao vírus sincicial respiratório humano, principal causador de doença respiratória em crianças (ARNS et al., 2012).

O vírus possui distribuição mundial, e tem a capacidade de se replicar em células do TRS e TRI. Em regiões onde o vírus é endêmico, a soroprevalência em bovinos é alta, variando de 30 a 70%, inclusive em rebanhos de bom *status* sanitário. Em alguns surtos de doença respiratória, causados pelo BRSV, as taxas de morbidade podem atingir 80% e as de mortalidade 20%. Bezerros com presença de anticorpos contra o BRSV maternos podem ser acometidos pelo vírus, já que possivelmente a imunidade conferida seja parcial. Reinfecções pelo BRSV são comuns, no entanto, os sinais clínicos são menos graves após a aquisição de

imunidade específica devido às constantes exposições ao agente (VALARCHER; TAYLOR, 2007; SACCO et al., 2014).

Os isolados de BRSV são divididos em quatro subgrupos antigênicos (A, B, AB e atípicos), estabelecidos de acordo com a análise da atividade de anticorpos monoclonais contra as glicoproteínas de envelope G e F. Avaliações genômicas evidenciaram diferenças temporais e geográficas entre os isolados de BRSV e uma divisão em seis diferentes grupos genômicos foi proposta (I-VI) (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). Falhas vacinais ocorreram quando a cepa vacinal não continha o grupo circulante, possivelmente devido alterações na estrutura da proteína G, como estratégia evolutiva do vírus. Desta forma, o foco de diversos estudos moleculares é avaliar possíveis variações nos genes que codificam as proteínas responsáveis pela indução da resposta imune no hospedeiro contra o BRSV (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; SPILKI et al., 2006).

2.2.1.2. Vírus da parainflunza-3 (BPIV-3)

O BPIV-3 é outro representante da família *Paramyxoviridae*, pertencente a subfamília *Paramyxovirinae* e gênero *Respirovirus*, que causa infecções respiratórias em bovinos e ovinos. Este vírus tem relações genéticas e antigênicas com o parainfluenzavírus humano tipos 1 e 3 e características estruturais semelhantes a de outros membros da família, como o BRSV. Atualmente, baseando-se em sequências do gene que codifica a proteína M do vírus, propôs-se sua classificação em genótipos BPIV-3a e BPIV-3b (ELLIS, 2010).

É um vírus cosmopolita, e no rebanho brasileiro a taxa de animais soropositivos é alta ultrapassando 80% (ARNS et al., 2012). As infecções pelo BPIV-3 são menos graves e de baixa morbidade e mortalidade, comparado aos outros agentes virais da doença respiratória em bezerras (GULLIKSEN et al., 2009; ROSHTKHARI; MOHAMMADI; MAYAMEEI, 2012). O título de anticorpos contra o agente adquirido da mãe permanece alto por um longo período e o vírus é pouco excretado por animais jovens (FULTON et al., 2004). As informações disponíveis em bancos de dados públicos para análises genômicas do BPIV-3 são escassas. Estudos demonstraram alto grau de conservação genômica, superior a 95%, com exceção para o gene codificador da proteína P. Apesar disso, pouco se sabe sobre a influência das diferenças genômicas e antigênicas na virulência dos isolados de campo (ELLIS, 2010).

2.2.1.3. Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

O BVDV é um vírus pertencente a família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*. É um vírus pleomórfico com estrutura viral composta por um nucleocapsídeo icosaédrico, envelope e um genoma RNA fita simples de polaridade positiva com apenas uma ORF. Os isolados de BVDV possuem variações moleculares, antigênicas e de patogenicidade podendo ser classificados em biotipos e grupos genéticos. De acordo com o efeito citopático produzido em cultivo celular, o BVDV é classificado em cepas citopáticas (CP) e não citopáticas (NCP), sendo as NCP predominantes na natureza (RIDPATH, 2010). A classificação genética divide os BVDV em duas espécies geneticamente distintas (BVDV-1 e BVDV-2) e estas são subdivididas em 20 subgenotipos, 18 para cepas de BVDV-1 (1a-1r) e 2 para cepas de BVDV-2 (2a-2b) (FLORES et al., 2002; VILCEK et al., 2001; YESILBAG et al., 2014). O segmento 5'UTR do genoma do BVDV é o mais utilizado para a detecção e caracterização genética através da técnica de RT-PCR. Diferentes subgenotipos de BVDV predominam em certas regiões do mundo, e no Brasil os subgenotipos descritos são o BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 1d, BVDV 2a e BVDV 2b (OTONEL et al., 2014).

Disseminadas em rebanhos de todo o mundo, as infecções pelo BVDV em países da Europa e América do Norte são alvo dos principais programas de controle e erradicação em bovinos leiteiros e de corte. No Brasil, estudos sorológicos revelam que o agente está disseminado por todo o território com altas prevalências, atingindo mais de 70% de soropositividade em alguns estados (FLORES et al., 2005).

A principal característica epidemiológica do BVDV é a capacidade de produzir animais persistentemente infectados (PIs). Fetos infectados por uma cepa viral NCP, entre os 42 e 125 dias de gestação, ocasionalmente reconhecem o antígeno viral como próprio, e ao nascer permanecem como PIs. Embora a prevalência de animais PIs nos rebanhos seja baixa, variando de 0,5% a 2%, estes animais são os principais disseminadores do vírus e responsáveis pela manutenção do BVDV no rebanho, com papel crucial na epidemiologia da doença (HOUE, 1999).

A infecção pelo BVDV pode estar associada a diversas manifestações clínicas, incluindo imunossupressão, doença respiratória, gastrintestinal e reprodutiva (RIDPATH, 2010). Apesar de não ser o alvo primário do BVDV, a replicação pode ocorrer no epitélio do TR e, independente da virulência da cepa viral, a infecção aguda resulta em redução do número de linfócitos circulantes e redução da função do tecido linfóide (FULTON et al., 2000). Estudos mostraram que a exposição *in utero* de bezerros ao BVDV resulta em maior

suscetibilidade às doenças respiratórias após o nascimento (BARBER; NETTLETON; HERRING, 1985), independente da exposição ao vírus ter gerado ou não animais PIs. De forma similar, bezerros que ingeriram colostro de vacas soropositivas para BVDV tiveram probabilidade 28% menor de desenvolver doença respiratória (MOERMAN et al., 1994). Conclui-se que a exposição fetal ao BVDV, assim como a infecção aguda pós-nascimento, contribuem para o desenvolvimento de infecções respiratórias em bezerros não PIs (RIDPATH, 2010).

2.2.1.4. Coronavírus bovino (BCoV)

O BCoV é um vírus pneumoentérico que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus*. É um membro das espécies de *betacoronavirus 1*, junto com o coronavírus equino, o coronavírus de faisões, o coronavírus respiratório canino e alguns coronavírus humanos. Possui um vírion envelopado, pleomórfico, de genoma RNA fita simples e polaridade positiva. O vírus é um dos agentes envolvidos nas diarreia neonatal e na doença respiratória em bezerros (SAIF, 2010).

Surtos de doença respiratória associados ao BCoV acometem animais de 2 a 6 meses de idade, no entanto, o vírus é eliminado nas fezes e/ou secreções respiratórias de bezerros já nas primeiras semanas de vida podendo ou não estar associado a sinais clínicos. Os picos de eliminação do BCoV ocorrem num intervalo de tempo muito curto, de zero a quatro dias após o agrupamento dos animais. As reinfecções respiratórias pelo BCoV são constantes e o vírus é eliminado de forma intermitente pelos mesmos animais. Logo, sugere-se que a imunidade de mucosa contra o agente seja passageira (DECARO et al., 2008; SAIF, 2010).

O BCoV está disseminado em rebanhos de todo o mundo e a vacinação é adotada para o controle da doença. Entretanto, vacinas que incluam isolados respiratórios de BCoV não existem no mercado. O tropismo duplo, respiratório e entérico, dos coronavírus está associado com variações no gene que codifica a proteína S. Recentemente, diferenças antigênicas e genéticas foram detectadas comparando-se isolados de diferentes origens e apresentações clínicas com as cepas de referência. As cepas de BCoV com tropismo duplo emergem como potenciais causadores de infecções respiratórias. Acredita-se que a imunidade conferida por cepas protótipos, exclusivamente com tropismo entérico, não protege contra todos os tipos de manifestações clínicas do vírus (FULTON; RIDPATH; BURGE, 2013).

2.2.1.5. Herpesvírus bovino-1 (BoHV-1)

O BoHV-1 pertence a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. O vírion é envelopado, possui um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, e o genoma consiste em DNA linear dupla fita, que codifica cerca de 70 proteínas. Uma característica do BoHV-1 é a capacidade de estabelecer latência em neurônios do gânglio trigêmeo e em alguns outros tecidos como da tonsila. Após uma infecção aguda, ocorre interrupção da replicação do vírus, que mantém seu genoma integrado ao da célula do hospedeiro de forma inativa por toda a vida do animal, podendo ser ocasionalmente reativado e eliminado de forma intermitente. Conforme análises genômicas e antigênicas, o BoHV-1 é dividido em três subtipos, BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. Todos os subtipos podem induzir problemas respiratórios em bovinos, entre outras manifestações clínicas. No Brasil, todos os subtipos já foram identificados, embora o BoHV-1.2a seja o mais prevalente (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; JONES; CHOWDHURY, 2010).

Infecções pelo BoHV-1 ocorrem com alta frequência em rebanhos de todo o mundo, salvo em alguns países em que o vírus foi erradicado. No Brasil, inquéritos soroepidemiológicos revelam a distribuição do agente em altas taxas por todo o território, variando entre 30 e 80% (DIAS et al., 2013).

Em bezerros, o BoHV-1 está associado à infecções respiratórias por induzir imunossupressão no organismo do hospedeiro. Animais com infecção aguda ou intermitente podem eliminar o vírus em secreções respiratórias, oculares e genitais (JONES; CHOWDHURY, 2010). Nas primeiras semanas de vida, as infecções pelo BoHV-1 tem pouca importância na doença respiratória. Acredita-se que bezerros nascidos de rebanhos em que a infecção pelo vírus seja endêmica, a imunidade materna conferida pelo colostro é suficiente na proteção contra o agente (FULTON et al., 2004; RAAPERI et al., 2012).

2.2.1.6. *Pasteurella multocida*

Três bactérias associadas à doença respiratória em bovinos são membros da família *Pasteurellaceae*: *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni*. São cocobacilos Gram negativos, imóveis e anaeróbios facultativos. A *P. multocida* subespécie *multocida*, comensal do TR de mamíferos e aves, é a bactéria mais comumente isolada em bezerras com infecções respiratórias. Este patógeno é classificado em cinco sorogrupos capsulares (A, B, D, E e F) e 16 sorotipos somáticos (1-16), de acordo com sua estrutura capsular e composição de

lipopolissacarídeos. Existe relação direta entre o sorogrupo e sorotipo com a predileção da doença, sendo que a *P. multocida* do sorogrupo A e sorotipo 3 é a mais predominante em casos de pneumonia em bovinos (DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004; DABO; TAYLOR; CONFER, 2007; GRIFFIN et al., 2010).

Bezerros com sinais clínicos respiratórios associados à infecção por *P. multocida* apresentam lesões típicas de broncopneumonia supurativa (PANCIERA; CONFER, 2010). Neste tipo de pneumonia são comuns as coinfeções ocasionadas por *P. multocida* e outras bactérias encontradas no trato respiratório de bovinos (AUTIO et al., 2007). Entretanto, a *P. multocida*, antes reconhecida como micro-organismo exclusivamente oportunista, tem seu papel como patógeno da doença respiratória dos bovinos estabelecido, já que sua frequência é maior no TR de animais com sinais clínicos de doença respiratória do que em animais saudáveis podendo ainda estar associada à infecção respiratória de forma isolada, como patógeno primário. Adicionalmente, estudos determinaram que a presença de *P. multocida* no TRI de bezerros com doença respiratória ocasiona aumento considerável nas concentrações séricas de proteínas indicadoras de dano tecidual como resposta à infecção (NIKUNEN et al., 2007; ANGEN et al., 2009).

O isolamento e identificação da *P. multocida*, assim como da *M. haemolytica*, em meios de cultura é simples e rápido (16-24h) em comparação aos outros agentes bacterianos da doença respiratória dos bovinos. As bactérias isoladas podem ser identificadas por meio de análise das características de crescimento das colônias, morfologia celular e reações bioquímicas diferenciadas. Uma alternativa para a obtenção de diagnóstico espécie-específico da *P. multocida* é o emprego de técnicas moleculares que possibilitem a amplificação de uma região do genoma do clone KMT1 da bactéria pela PCR convencional (TOWNSEND et al., 1998; KUMAR et al., 2004).

2.2.1.7. *Mannheimia haemolytica*

A *M. haemolytica*, um dos cinco representantes do gênero *Mannheimia*, é um patógeno do TR de bovinos associado à síndrome conhecida como febre do transporte. Essa bactéria é classificada em 12 sorotipos (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16, e A17), sendo que os sorotipos A1 e A2 colonizam o TRS de bovinos saudáveis. Os sorotipos predominantes relacionados a broncopneumonia fibrinosa em bovinos são o A1 e A6 que ocorrem quando o equilíbrio imunológico é alterado. Geralmente, bezerros de corte recém-desmamados transportados aos confinamentos sob condições estressantes como, separação da

mãe, agrupamento com bezerros de várias origens, e submetidos a mudanças bruscas de temperatura e alimentação desenvolvem a doença (RICE et al., 2007; GRIFFIN et al., 2010). Nos casos de pneumonia enzoótica em bezerras leiteiras, a *M. haemolytica* é detectada com menor frequência ou está ausente. Apesar disso, a bactéria é incluída no diagnóstico diferencial das infecções respiratórias e métodos moleculares de diagnóstico vem substituindo os métodos tradicionais de detecção deste agente (HÄRTEL et al., 2004; ANGEN et al., 2009).

2.2.1.8. *Histophilus somni*

Outro gênero da família *Pasteurellaceae* associado às infecções respiratórias em bovinos é o *H. somni*. A histofilose é uma enfermidade predominante na América do Norte e surtos esporádicos ocorrem em rebanhos europeus. Recentemente, o *H. somni* foi identificado em rebanhos brasileiros causando diversas manifestações clínicas. Bovinos acometidos pela bactéria desenvolvem uma broncopneumonia fibrinosa, que geralmente é acompanhada de outras manifestações clínicas, incluindo meningoencefalite trombótica, pleurite, polisinovite, septicemia, miocardite, otite média, infertilidade, abortos e mastite (HEADLEY et al., 2013, 2014).

Os achados clínicos e anatomo-patológicos em bovinos com doença respiratória associada ao *H. somni* são de difícil diferenciação quando comparados com aqueles encontrados em pneumonias ocasionadas por outros agentes bacterianos (GRIFFIN et al., 2010; PANCIERA; CONFER, 2010). O isolamento de *H. somni*, mesmo a partir de material clínico obtido de casos suspeitos, não é frequente provavelmente devido ao lento crescimento da bactéria (72-96 h) e à exigência de meios suplementados e condições de microaerofilia. Os isolados de *H. somni* possuem grande variabilidade morfológica e bioquímica, o que dificulta a identificação do agente (ANGEN et al., 1998; SONGER; POST, 2005). Apesar disso, a amplificação parcial do gene 16S RNAr do *H. somni* pela PCR a partir de amostras de TR de bovinos demonstrou ser uma técnica de diagnóstico satisfatória na detecção do agente em animais com doença respiratória (HEADLEY et al., 2014).

2.2.1.9. *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis é um membro da classe dos *Mollicutes* e família *Mycoplasmataceae*. Essas bactérias filogeneticamente se originaram de bactérias Gram positivas, embora não se coram pelo método de Gram por não possuírem parede celular e são delimitados por uma membrana esteroide de três camadas. Os micoplasmas são anaeróbios facultativos, pleomórficos, de crescimento fastidioso, além de apresentarem resistência frente a várias classes de antimicrobianos (CASWELL; ARCHAMBAULT, 2007).

A prevalência do *M. bovis* nos rebanhos é bastante variável. Existem rebanhos livres de *M. bovis*, enquanto em outros a prevalência da bactéria pode chegar a 90%. Bezerros se infectam com *M. bovis* eliminado via aerossóis pela mãe logo após o nascimento. Uma vez estabelecido no sistema respiratório, o *M. bovis* pode persistir por toda a vida do animal acarretando ou não em sinais clínicos. O agente já foi detectado como agente da doença respiratória em bezerros sendo eliminado por animais com pneumonia a partir de 5 dias de vida (CASWELL; ARCHAMBAULT, 2007; GRIFFIN et al., 2010).

Os sinais clínicos e as lesões no TR causados pelo *M. bovis* não são específicas. Histórico de antibioticoterapia pouco responsiva acompanhada de artrite e otite média em bezerros e achados de necropsia de broncopneumonia caseonecrotica sugerem fortemente a infecção pelo agente. Animais suspeitos de infecções respiratórias associadas ao *M. bovis* são subdiagnosticados já que a pesquisa do agente muitas vezes não é incluída na rotina laboratorial. O isolamento do agente em cultura exige meios complexos e longos períodos de incubação (10 dias ou mais). Com isso, o crescimento anterior de outras bactérias comensais e/ou patogênicas, além de fungos, dificulta a sua identificação. O TR de bovinos é colonizado por diversas espécies de micoplasmas comensais, tornando os testes sorológicos uma alternativa duvidosa para o diagnóstico do *M. bovis*, devido possíveis reações cruzadas. Preconiza-se o uso da *nested*-PCR para detecção de *M. bovis* em amostras clínicas do TR, já que a PCR convencional apresenta baixa sensibilidade, semelhante ao isolamento em cultura (TENK et al., 2006; MAUNSELL; DONOVAN, 2009).

2.2.2. Diagnóstico laboratorial

Diagnosticar precocemente bezerras com infecções respiratórias em uma unidade de criação é essencial para o controle da disseminação dos agentes infecciosos envolvidos na etiologia da doença clínica e para o aumento das chances de sucesso terapêutico (APLEY,

2006). Comparado com outras doenças que comprometem bezerros nos primeiros meses de vida o diagnóstico definitivo da etiologia das infecções respiratórias é mais difícil de ser realizado com sucesso (SVENSSON et al., 2003). Além disso, bovinos afetados geralmente não expressam sinais ou lesões específicas para um dos agentes envolvidos, e desta forma, estabelecer a relação de causa e efeito se torna um desafio. O padrão ouro para o diagnóstico das doenças respiratórias dos bovinos, assim como a associação do agente etiológico detectado com a doença, é bastante discutido. No entanto, defende-se que para cada situação existe uma técnica ideal e cada uma com suas vantagens e desvantagens. Nas infecções respiratórias em bezerras, os micro-organismos suspeitos associados à doença podem ser confirmados através de técnicas de diagnóstico *ante-mortem*. Estas técnicas incluem a sorologia, o isolamento em cultura e técnicas moleculares (FULTON; CONFER, 2012).

A sorologia através de técnicas como a vírus neutralização e o ELISA são utilizadas na detecção de anticorpos contra alguns agentes causadores de doença respiratória em bovinos. Embora seja uma boa técnica para detectar resposta vacinal e o histórico de exposição contra algum agente infeccioso, utilizá-la em situações de surto tem suas limitações, já que muitas vezes a interpretação da sorologia exige mais de uma coleta para avaliar a soroconversão. Além disso, reações cruzadas com anticorpos de outros agentes não patogênicos ou comensais e a presença de anticorpos maternos nos animais jovens, podem fornecer resultados duvidosos (TENK et al., 2006; FULTON; CONFER, 2012).

O isolamento dos agentes etiológicos permite estabelecer a presença dos micro-organismos associados ao surto, que estão colonizando ou infectando o hospedeiro. O isolamento bacteriano ainda possibilita realizar testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. O uso de amostras clínicas de TRI, como lavados broncoalveolares (BALs), para o isolamento, favorece a obtenção de resultados mais fidedignos dos agentes infecciosos que podem estar associados às broncopneumonias em bezerros. Para alguns micro-organismos relacionados a doença respiratória dos bovinos, estas técnicas são laboriosas, podendo levar semanas para se obter os resultados. O isolamento viral exige manutenção de várias linhagens de células, além de exigir a necessidade de ser complementada por alguma outra técnica, já que nem todos os vírus acarretam efeitos citopáticos. Terapias antimicrobianas concomitantes influenciam negativamente na sensibilidade do isolamento nas culturas bacterianas. Algumas bactérias que causam infecções respiratórias em bezerras crescem mais lentamente e exigem meios de cultura seletivos, por exemplo, o *M. bovis* e o *H. somni*. Mesmo a *P. multocida* e *M. haemolytica*, de isolamento mais simples, podem não ser isoladas em virtude do crescimento

em excesso de bactérias comensais contaminantes (TENK et al., 2006; GRIFFIN et al., 2010; FULTON; CONFER, 2012).

A utilização de forma isolada de técnicas moleculares pode ter pouco valor diagnóstico nos casos de doença respiratória em bovinos. Em muitas ocasiões a alta sensibilidade dessas técnicas faz com que sejam detectados micro-organismos que podem ser equivocadamente associados com a doença. O ideal é que outros critérios sejam avaliados para enquadrar a PCR como uma técnica adequada. Perante um surto de doença respiratória em bezerras onde há suspeita clínica, a técnica permite detectar em poucas horas e em grande número de amostras clínicas, sequências do genoma de distintas espécies de micro-organismos, além de genótipos e fatores de virulência específicos de um determinado agente envolvido no quadro clínico infeccioso do trato respiratório bovino. Um inconveniente da técnica é a exigência de infraestrutura com laboratórios e equipamentos adequados para a realização de metodologias moleculares, que em algumas situações ainda pode ser considerada de alto custo, além da exigência de métodos e protocolos padronizados para a detecção de cada agente associado com doença respiratória em bezerras (FULTON; CONFER, 2012).

2.2.3. Prevenção e Controle

Em unidades de criação de bezerras confinadas, práticas adequadas de manejo sanitário são essenciais para mitigar os riscos de exposição aos agentes infecciosos que acometem os animais nas primeiras semanas de vida. Apesar disso, nas últimas décadas, o impacto das doenças respiratórias nesta categoria animal continuou alto, visto que as taxas de morbidade e mortalidade ocasionadas pelas pneumonias não sofreram grandes alterações (GORDEN; PLUMMER, 2010). Desta forma, para a redução da incidência desta infecção em bezerras, é primordial a implementação de medidas adequadas de prevenção e controle.

A prevenção de doença respiratória em bezerras deve ser iniciada logo após o nascimento. Deve-se evitar falhas no manejo sanitário dos animais neonatos por meio de condutas como cura e desinfecção do umbigo e o fornecimento de colostro de qualidade nas primeiras horas de vida em quantidade suficiente para minimizar falhas na transferência de imunidade passiva. Desta forma, previne-se a ocorrência de outras doenças como as onfalites, artrites e diarreias que, reconhecidamente, aumentam as chances de infecções respiratórias em bezerras. Além disso, práticas apropriadas de manejo nutricional reduzem o *stress* dos animais após a entrada nas unidades de criação e, em associação com as outras medidas,

auxiliam no adequado desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico das bezerras (GULLIKSEN et al., 2009).

As fontes de infecção para as bezerras nas unidades de criação incluem os agentes infecciosos introduzidos com a entrada de animais provenientes de rebanhos distintos. Antes de incorporar novas bezerras às unidades de criação recomenda-se quarentena de 14 a 21 dias como medida preventiva para as infecções respiratórias (GORDEN; PLUMMER, 2010). A vacinação nas primeiras semanas de vida não induz resposta imunológica protetiva nas bezerras e, atualmente, o uso de vacinas intranasais com o objetivo de indução de imunidade de mucosa tem sido relatado com bons resultados (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Uma prática de manejo sanitário aplicada com relativa frequência na bovinocultura de corte para a terminação de animais em confinamento, porém, ainda pouco estudada e adotada em bezerras na pecuária bovina leiteira é a metafilaxia. Essa prática preconiza a utilização de antimicrobianos de amplo espectro e ação prolongada antes da entrada dos animais nas unidades de criação (NICKELL; WHITE, 2010). O objetivo da metafilaxia é prevenir a doença respiratória em bezerras saudáveis, diminuindo a carga bacteriana no TR destes animais. A metafilaxia pode ainda atuar como medida terapêutica em animais sem sinais clínicos evidentes de doença respiratória. Cabe ressaltar que o uso da metafilaxia em bezerras requer avaliações mais criteriosas, pois o custo-benefício desta prática é questionável, já que os gastos do produtor com antibióticos são altos, assim como a probabilidade da seleção de cepas de bactérias resistentes a antibióticos e quimioterápicos.

Nas unidades de criação de bezerras quando as condições das instalações são adequadas é possível reduzir os fatores estressantes e diminuir a exposição dos animais aos agentes infecciosos. Os abrigos das bezerras devem oferecer boa ventilação, ambiente seco, sem acúmulo de dejetos, com camas confortáveis e de fácil limpeza. Deve-se ainda evitar alta densidade de animais por abrigo e/ou baía, fornecendo espaço físico mínimo de 2,3-2,8 m² por bezerra. Os tratadores devem ter especial atenção com higiene pessoal assim como com todos os utensílios utilizados uma vez que fômites contaminados podem carrear micro-organismos patogênicos para o TR bovino (LAGO et al., 2006; GORDEN; PLUMMER, 2010). Bezerras saudáveis, com infecções subclínicas podem eliminar os micro-organismos associados às infecções respiratórias (GULLIKSEN et al., 2009). Logo, o monitoramento dos animais durante o período que permanecerem nas unidades de criação, por meio da realização de avaliações clínicas e testes diagnósticos periódicos, pode promover o controle da disseminação dos potenciais patógenos do TR bovino com condutas simples como a

separação rápida e precoce das bezerras com sinais clínicos daquelas saudáveis e/ou assintomáticas (APLEY, 2006; GORDEN; PLUMMER, 2010).

Por fim, o reconhecimento da importância das doenças respiratórias em sistemas de criação de bezerras, assim como o conhecimento dos potenciais patógenos para o TR de bovinos e o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos, sensíveis, específicos e de baixo custo, em associação com a implantação de condutas rígidas de manejos sanitário e zootécnico em unidades de criação favorece a redução na frequência e intensidade de doenças respiratórias em bezerras.

2.3. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.R.; BROGDEN, K.A. Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 9, p. 1079-88, 2000.

ACKERMANN, M.R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J.A. Innate immunology of bovine respiratory disease. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 215-28, 2010.

ANDREWS, A.H. Calf pneumonia costs! **Cattle Practice**, v. 8, n. 2, p. 109-114, 2000.

ANGEN, O.; THOMSEN, J.; LARSEN, L.E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, P.M.H.; ENEMARK, J.M.D. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1-2, p. 165-71, 2009.

APLEY, M. Bovine respiratory disease: pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 399-411, 2006.

ARNS, C.W.; ALMEIDA, R.S.; SPILKI, F.R.; SANTOS, M.B. *Paramyxoviridae*. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria: editoraufsm, 2012. p. 761-793.

AUTIO, T.; POHJANVIRTA, T.; HOLOPAINEN, R.; RIKULA, U.; PENTIKÄINEN, J.; HUOVILAINEN, A.; RUSANEN, H.; SOVERI, T.; SIHVONEN, L.; PELKONEN, S. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 256-65, 2007.

BARBER, D.; NETTLETON, P.; HERRING, J. Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Record**, v. 117, n. 18, p. 459-464, 1985.

BRASIL, N.D.A.; HINNAH, F.L.; FISS, L.; SALLIS, E.S.V.; GRECCO, F.B.; LADEIRA, S.R.L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SCHILD, A.L. Respiratory diseases in

calves in southern Rio Grande do Sul: study of 33 outbreaks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 745-751, 2013.

CASWELL, J.L.; ARCHAMBAULT, M. Mycoplasma bovis pneumonia in cattle. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 2, p. 161-86, 2007.

CHASE, C.C.L.; HURLEY, D.J.; REBER, A.J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87-104, 2008.

DABO, S.M.; TAYLOR, J.D.; CONFER, A.W. Pasteurella multocida and bovine respiratory disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 129-50, 2007.

DAVIES, R.L.; MACCORQUODALE, R.; REILLY, S. Characterisation of bovine strains of Pasteurella multocida and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. **Veterinary Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 145-58, 2004.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CIRONE, F.; D'ABRAMO, M.; LORUSSO, E.; GRECO, G.; MARI, V.; COLAIANNI, M.L.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Respiratory Disease Associated with Bovine Coronavirus Infection in Cattle Herds in Southern Italy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 1, p. 28-32, 2008.

DELAUNOIS, L. Anatomy and physiology of collateral respiratory pathways. **The European Respiratory Journal**, v. 2, p. 893-904, 1989.

DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; FERREIRA-NETO, J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; MULLER, E.E. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 1, p. 39-47, 2013.

ELLIS, J.A. Bovine parainfluenza-3 virus. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 3, p. 575-93, 2010.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Criação de Bezerras em Sistemas de Produção de Leite**. 2005. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2005/ct-38.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Conjuntura do Mercado Lácteo**. 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/76307/1/2012-04-indicadores-leite.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. **Countries by commodity**. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

FLORES, E.F.; RIDPATH, J.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; GIL, L.H.V.G. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, n. 1, p. 51-60, 2002.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in Brazil: history, current situation and perspectives. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W.L.; FAILS, A.D. O Sistema Respiratório. In: _____. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 253-261.

FULTON, R.W.; PURDY, C.W.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; LOAN, R.W.; BRIGGS, R.E.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 3, p. 151-9, 2000.

FULTON, R.W.; BRIGGS, R.E.; PAYTON, M.E.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; RIDPATH, J.F.; BURGE, L.J.; DUFF, G.C. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus, bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline. **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 643-649, 2004.

FULTON, R.W.; CONFER, A.W. Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: Gold standards for diagnosis, do they exist? **The Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. July, 2012.

FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; BURGE, L.J. Bovine coronaviruses from the respiratory tract: antigenic and genetic diversity. **Vaccine**, v. 31, n. 6, p. 886-92, 2013.

GAUTIER-BOUCHARDON, A.V.; FERRÉ, S.; LE GRAND, D.; PAOLI, A.; GAY, E.; POUMARAT, F. Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87672-e87672, 2014.

GORDEN, P.J.; PLUMMER, P. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 243-59, 2010.

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M.M.; KUSZAK, J.; MCVEY, D.S. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 381-94, 2010.

GULLIKSEN, S.M.; JOR, E.; LIE, K.I.; LØKEN, T.; AKERSTEDT, J.; ØSTERÅS, O. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5139-46, 2009.

HÄRTEL, H.; NIKUNEN, S.; NEUVONEN, E.; TANSKANEN, R.; KIVELÄ, S.L.; AHO, R.; SOVERI, T.; SALONIEMI, H. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 45, n. 3-4, p. 193-200, 2004.

HEADLEY, S.; OLIVEIRA, V.S.; FIGUEIRA, G.; BRONKHORST, D.; ALFIERI, A. F.; OKANO, W.; ALFIERI, A. A. *Histophilus somni*-induced infections in cattle from southern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 7, p. 1579-1588, 2013.

HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; OLIVEIRA, V.H.S.; BEUTTEMULLER, E.A.; ALFIERI, A.A. Histophilus somni is a potential threat to beef cattle feedlots from Brazil. **The Veterinary Record**, 10.1136/vr.102562. p. 2013-2015, 2014.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 89-107, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário**. 2006. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecu_ario.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Quantidade de leite cru, resfriado ou não, industrializado**. 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?ti=1&tf=99999&e=c&p=LT&v=283&z=t&o=24%3E>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 303-21, 2010.

KUMAR, A.A.; SHIVACHANDRA, S.B.; BISWAS, A.; SINGH, V.P.; SRIVASTAVA, S.K. Prevalent serotypes of Pasteurella multocida isolated from different animal and avian species in India. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 8, p. 657-67, 2004.

LAGO, A.; MCGUIRK, S.M.; BENNETT, T.B.; COOK, N.B.; NORDLUND, K.V. Calf respiratory disease and pen microenvironments in naturally ventilated calf barns in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 4014-25, 2006.

MAUNSELL, F.P.; DONOVAN, G.A. Mycoplasma bovis Infections in young calves. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 139-77, vii, 2009.

MOERMAN, A.; STRAVER, P.J.; DE JONG, M.C.; QUAK, J.; BAANVINGER, T.; VAN OIRSCHOT, J.T. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 115-9, 1994.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 85-98, 2009.

NICKELL, J.S.; WHITE, B.J. Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 285-301, 2010.

NIKUNEN, S.; HÄRTEL, H.; ORRO, T.; NEUVONEN, E.; TANSKANEN, R.; KIVELÄ, S.L.; SANKARI, S.; AHO, P.; PYÖRÄLÄ, S.; SALONIEMI, H.; SOVERI, T. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 30, n. 3, p. 143-51, 2007.

OTONEL, R.A.A.; ALFIERI, A.F.; DEZEN, S.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 87-92, 2014.

PANCIERA, R.J.; CONFER, A.W. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 191-214, 2010.

RAAPERI, K.; BOUGEARD, S.; ALEKSEJEV, A.; ORRO, T.; VILTROP, A. Association of herd BHV-1 seroprevalence with respiratory disease in youngstock in Estonian dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 641-8, 2012.

RICE, J.A.; CARRASCO-MEDINA, L.; HODGINS, D.C.; SHEWEN, P.E. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 2, p. 117-28, 2007.

RIDPATH, J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105-21, 2010.

ROSHTKHARI, F.; MOHAMMADI, G.; MAYAMEEI, A. Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 5, p. 1105-10, 2012.

SACCO, R.E.; MCGILL, J.L.; PILLATZKI, A.E.; PALMER, M.V.; ACKERMANN, M.R. Respiratory syncytial virus infection in cattle. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 427-36, 2014.

SAIF, L.J. Bovine respiratory coronavirus. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 349-64, 2010.

SIVULA, N.J.; AMES, T.R.; MARSH, W.E.; WERDIN, R.E. Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 27, n. 3-4, p. 155-171, 1996.

SONGER, J.G.; POST, K.W. The genera Haemophilus, Histophilus and Taylorella. In: _____. **Veterinary Microbiology**. 1. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p. 273-288.

SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; DOMINGUES, H.G.; D'ARCE, R.C.F.; FERREIRA, H.L.; CAMPALANS, J.; COSTA, S.C.B.; ARNS, C.W. Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. **Virus Research**, v. 116, n. 1-2, p. 30-7, 2006.

SRIKUMARAN, S.; KELLING, C.L.; AMBAGALA, A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 2, p. 215-29, 2007.

SVENSSON, C.; LUNDBORG, K.; EMANUELSON, U.; OLSSON, S.-O. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 3-4, p. 179-197, 2003.

- SVENSSON, C.; LIBERG, P. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 1, p. 43-53, 2006.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.
- TAYLOR, J.D.; FULTON, R.W.; LEHENBAUER, T.W.; STEP, D.L.; CONFER, A.W. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 10, p. 1095-102, 2010.
- TENK, M.; BÁLINT, A.; STIPKOVITS, L.; BIRÓ, J.; DENCISO, L. Detection of *Mycoplasma bovis* with an improved pcr assay. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 54, n. 4, p. 427-35, 2006.
- TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J.; LEE, C.W.; PAPADIMITRIOU, J.M.; DAWKINS, H.J. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1096-100, 1998.
- USDA. United States Department of Agriculture. **Dairy: world markets and trades**. 2013. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2014.
- VALARCHER, J.F.; SCHELCHER, F.; BOURHY, H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of virology**, v. 74, n. 22, p. 10714-28, 2000.
- VALARCHER, J.-F.; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 153-80, 2007.
- VILČEK, Š.; HERRING, A.J.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P.; PATON, D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v. 136, n. 3-4, p. 309-323, 1994.
- VILČEK, S.; PATON, D.J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M.T.; PAIFI, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v. 146, n. 1, p. 99-115, 2001.
- WINDEYER, M.C.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.M.; HODGINS, D.C.; LISSEMORE, K.D.; LEBLANC, S.J. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 231-40, 2014.
- YESILBAG, K.; FORSTER, C.; OZYIGIT, M.O.; ALPAY, G.; TUNCER, P.; THIEL, H.J.; KONIG, M. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 1-2, p. 42-9, 2014.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Determinar os agentes etiológicos associados a um surto de doença respiratória em bezerras de rebanhos leiteiros criadas em uma unidade de criação de bezerras.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, por meio de técnicas moleculares (RT-PCR, PCR, *seminested*-PCR e *nested*-PCR), realizadas em amostras de lavados broncoalveolares a presença de vírus (BRSV, BPIV-3, BVDV, BCoV e BoHV-1) e bactérias (*P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* e *M. bovis*) associados à doença respiratória em bezerras
- Avaliar a prevalência de infecções singulares e de coinfeções em bezerras sintomáticas e assintomáticas durante um surto de doença respiratória.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

4. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Artigo editado de acordo com as normas do periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, disponível em:

(http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jvdi/JVDI%20Instructions%20to%20Authors_Final_Revised_7-9-2013.pdf).

Viruses and bacteria associated with single and mixed infections in an outbreak of bovine respiratory disease in a dairy calf rearing unit

Abstract. The etiological agents involved in a bovine respiratory disease (BRD) outbreak were investigated in a dairy calf rearing unit from Southern Brazil by a battery of molecular techniques. PCR/RT-PCR assays were performed to detect the most commonly viruses and bacteria associated with BRD such as bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), bovine coronavirus (BCoV), bovine parainfluenza 3 virus (BPIV-3), *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, and *Mycoplasma bovis*. Bronchoalveolar lavages (BAL) were taken from 21 animals ranging from 2 to 90 days, with 15 BALs from symptomatic calves with BRD clinical signs and 6 from asymptomatic calves. At least one microorganism was detected in 85.7% (18/21) of samples evaluated. Mixed infections in the respiratory tract were more frequent (72.2%) than single infections (27.7%). The interactions between viruses and bacteria were the most common in coinfections (55.5%). The frequency of BRD agents was BRSV (38.1%), BVDV (28.6%), BCoV (33.3%), *P. multocida* (42.85%), *M. bovis* (33.3%), and *H. somni* (19%). These respiratory pathogens were detected in symptomatic and asymptomatic calves, which show to be reservoirs, and contributed to the occurrence of new BRD cases in the rearing unit. These results show the multiple etiologies of respiratory infections in dairy calves from a calf rearing unit and highlight the importance of etiologic diagnosis of the disease to provide guidelines related to therapy, prevention, and control measures against viruses and bacteria responsible for the induction of these infections that is currently neglected in dairy cattle of Brazil.

Keywords: Cattle, dairy calves, respiratory disease, molecular diagnosis.

Introduction

Bovine respiratory disease (BRD) in calves represents an important cause of economic losses for dairy and beef industry worldwide due to costs with reduced weight gain, farm labor, treatment, prophylaxis, and the high morbidity and mortality rates^{5,24,35,37,39}. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), bovine coronavirus (BCoV), and bovine parainfluenza 3 virus (BPIV-3) are the main viral pathogens infecting the respiratory system^{3,5,24,30}. *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, and *Mycoplasma bovis* are the major bacteria involved in secondary infection of the respiratory tract and are associated with pneumonia in young dairy calves^{2,5,23,42}. These etiologic agents may cause single infection or act in synergy in co-infections enhancing the severity of the disease²⁰.

Although BRD may affect cattle of different ages; it is more commonly diagnosed in calves up to 3 months and the peak of the disease usually occurs between 4 and 6 weeks of age^{38,39,50}. Outbreaks of BRD in calves are commonly related to animals from different herds that are grouped and exposed to adverse conditions of transportation, nutrition, temperature, sanitary and environmental managements that may lead to immunosuppression and increased susceptibility to pathogens of the respiratory system^{39,49}.

In Brazil, BRD reports are limited to specific pathogens and do not completely describe etiology of the disease. Most of the Brazilian studies are conducted in post-mortem examination of calves, shortening the knowledge based on the possible simultaneous infections by several etiological agents^{7,9,10}. Pneumonia is a major cause of deaths in dairy calves^{22,25}; the difficult diagnosis often has poor reciprocity between farmers and veterinarians contributing to the lack of prevention and control measures^{22,37,38}. The knowledge regarding the microorganisms associated with BRD is essential to ensure a better sanitary status of the herd.

The present study reports a molecular diagnostic survey for multiple etiological agents during an outbreak of BRD in heifers of a dairy rearing unit.

Materials and Methods

Calf rearing unit

The BRD outbreak occurred during April and May 2011, in a dairy calf rearing unit, located in Medianeira city (25°17'42''S; 54°05'38''W), Parana state, Southern Brazil. The region has humid subtropical climate with hot, humid summer and mild winter with average temperature of 21°C. The rearing unit maintained approximately 125 female mixed breed calves received from 40 nearby dairy farms that were members of a dairy cooperative.

Data on housing, feeding, and management of the calves were collected through an interview with the veterinarian in charge. Calves arrived at the rearing unit with 2-5 days of age and were housed in 5 group pens (5x3m) with open sides and divided by brick walls (1.5m high). Twenty to 25 calves were grouped in each pen. The calves from different dairy herds were kept in the same pen until approximately 60 days of age. All pens had concrete floor and were covered with hay as bedding material in approximately 70% of the pen area. Calves had free access to an outdoor fresh starter grain area. Feeding and water troughs were positioned in ground level and not shared between pens. Calves were fed in automatic feeder system for each pen with milk replacement in a common nipple and concentrates on pelleted calf feed containing 23% crude protein was given *ad libitum*.

Data about the sanitary status of the original herds of the calves were unknown, except for the compulsory sanitary management practices against bovine brucellosis and tuberculosis, according to the national program for control and eradication of these diseases. Health protocols for processing calves at the arrival in the rearing unit were not adopted. According to the veterinarian, the morbidity rate of calves with acute manifestations of respiratory distress reached 30% in April 2011; furthermore, the time elapsed between the appearance of clinical signs and death of symptomatic calves due to BRD was 5-7 days. Calves up to 30 days of age were more frequently affected than older animals. Symptomatic calves with BRD signs were not separated from the asymptomatic animals, even during the clinical treatment. The treatment of BRD-affected calves was performed with broad-spectrum antibiotics (spectinomycin and tulathromycin) and anti-inflammatory drugs. Calves treated early had greater success in therapy with low recurrence rate.

Inclusion criteria

First, asymptomatic and symptomatic calves with BRD were identified by clinical examination. Typical clinical signs of respiratory disease were not present in calves classified as asymptomatic. Calves classified as symptomatic showed clinical signs of coughing and copious nasal discharge in association with at least 2 of the following clinical manifestations: rectal temperature above 39.5°C, prolonged capillary refill time, pale mucous membranes, heart rate above 120 beats per minute, respiratory discomfort and respiratory rate above 40 breaths per minute^{3,5}.

Bronchoalveolar samples

After clinical examination, 21 bronchoalveolar lavages (BAL) were collected from asymptomatic ($n=6$) and symptomatic ($n=15$) calves, following the collection procedures previously described³. The collection procedures of BALs were conducted by a trained veterinary surgeon. At least 4 samples per pen were randomly collected from animals aged between 2-30 days, 31-60 days, and over 60 days, including asymptomatic and symptomatic calves. The samples were placed in sterile tubes, shipped on ice baths and stored at -80°C until use.

Detection of infectious agents associated with BRD

Nucleic acids were extracted from 500 μ L aliquots of BALs pretreated with sodium dodecyl sulphate (SDS) and Proteinase K^f incubated at 56°C for 30 min at a final concentration of 1% (v/v) and 0.2 mg/mL, respectively. BAL samples were then processed following a silica/guanidine isothiocyanate protocol⁸. The extracted nucleic acid was eluted in 50 μ L of ultra-pure nuclease-free diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile waterⁱ and stored at -80 °C until used for molecular analysis.

Molecular diagnostic assays were performed for the detection of the main infectious agents associated with BRD, targeting genome sequences of each microorganism using species-specific primers previously described (Table 1). Aliquots of sterile ultrapure water were included as negative controls in all procedures. Samples previously known as positive for each of the pathogens investigated herein were included as positive control, as follows: prototype Los Angeles strain for BoHV-1; prototype NADL strain for BVDV; RNA derived

from a commercial vaccine for BRSV and BPIV-3^c; nucleic acid from previous reports for BCoV⁴¹ and *H. somni*²⁶; and housekeeping samples for *P. multocida*, *M. haemolytica*, and *M. bovis*²⁷.

Table 1. List of primers with the corresponding target genome region used to detect bovine respiratory disease agents in clinical specimens.

Organism	Molecular technique	Target genome region	Primer sequence*	Fragment length (bp)
Bovine viral diarrhea virus	RT-PCR	5' untranslated region (5'UTR)	324-F: 5' -ATGCCCWTAGTAGGACTAGGCA-3' 326-R: 5' -TCAACTCCATGTGCCATGTAC-3'	288 ⁴⁸
Bovine respiratory syncytial virus	RT-PCR / nested PCR	G attachment glycoprotein gene	B5A-F: 5' -CCACCCTAGCAATGATAACCTTGAC-3' B6A-R: 5' -AAGAGAGGATGCCTTGCTGTGG-3' B7A-F: 5' -CATCAATCCAAAGCACCACACTGTC-3' B8-R: 5' -GCTAGTTCTGTGGTGGATTGTTGTC-3'	371 ⁴⁷
Bovine coronavirus	RT-PCR / seminested PCR	Nucleocapsid protein gene	BCoV1-F: 5' -CGATGAGGCTATTCCGAC-3' BCoV2-R: 5' -TGTGGGTGCGAGTTCTGC-3' BCoV3-F: 5' -TTGCTAGTCTTTGTTCTGGC-3'	251 ⁴¹
Bovine parainfluenza 3 virus	RT-PCR	Hemagglutinin-neuraminidase gene	HNfwd-F: 5' -GAATGACTCATGATAGAGGTAT-3' HNseq1-R: 5' -AGGACAACCAGTTGTATTACAT-3'	647 ⁵¹
Bovine herpesvirus 1	Seminested PCR	Glycoprotein D gene	P3-F: 5' -GCTGTGGGAAGCGGTACG-3' P4-R: 5' -GTCGACTATGGCCTTGTGTGC-3' P5-F: 5' -ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG-3'	425 ⁴⁰
<i>Pasteurella multocida</i>	PCR	Open reading frame of the clone KMT1	KMT1SP6-F: 5' -GCTGTAAACGAACTCGCCAC-3' KMT1T7-R: 5' -ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3'	460 ⁴⁶
<i>Histophilus somni</i>	PCR	16S ribosomal DNA gene	HS453-F: 5' -GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3' HS860-R: 5' -TTCGGGCACCAAGTRTTCA -3'	408 ²
<i>Mannheimia haemolytica</i>	PCR	lktA-artJ intergenic region	Mh-F: 5' -GTCCCTGTGTTTTTCATTATAAG-3' Mh-R: 5' -CACTCGATAAATTATTCTAAATTAG-3'	385 ³
<i>Mycoplasma bovis</i>	Nested PCR	16S-23S ribosomal DNA intergenic region	Molli-F: 5' -CCGTCAAACYATGGGAGC-3' Molli-R: 5' -GTGYCCCCGCCMTACTCAGG-3' nMb-F: 5' -GTACACTTGTCTTTTATCACTATA-3' nMb-R: 5' -AAGGTATCTCGCTTTATGTCCT-3'	488 (Voltarelli et al., unpublished data)

*Primers F (forward); R (reverse).

Aliquots of 5 μ L of the amplified products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL), and visualized under UV light.

Nucleotide sequence analysis

One positive sample of each BRD pathogen detected was sequenced to confirm the diagnosis. Amplicons obtained were purified and quantified using commercial Kits^{g,h}. The direct sequencing was performed using a BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit^b with the forward and reverse primers, in a 3500 Genetic Analyzer^a sequencer. Sequence quality analyses and consensus sequences were obtained using the Phred/CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank nr database using the BLAST highly similar tool software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Results

The frequencies of detection were 6/21 (28.6%) for BVDV, 8/21 (46.6%) for BRSV, 7/21 (33.3%) for BCoV, 9/21 (42.85%) for *P. multocida*, 4/21 (19%) for *H. somni*, and 7/21 (33.3%) for *M. bovis*. All these respiratory pathogens were detected in asymptomatic and symptomatic calves (Table 2). The detection of viruses and bacteria occurred in all age groups (data not shown). BPIV-3, BoHV-1, and *M. haemolytica* were not detected in this study.

Eighteen (85.7%) of the 21 calves were infected with at least one infectious agent of BRD. Among the positive animals, mixed infections were more frequent (13/18; 72.2%) than single infections (5/18; 27.7%). Single infections occurred more frequently associated with bacteria 4/18 (22.2%) than with viruses 1/18 (5.5%). Associations between viruses and bacteria were the most frequent 10/18 (55.5%). Other mixed infections presented frequency of 3/18 (16.6%) (Table 3).

The identity of the respective microorganisms detected was confirmed by its similarities with other nucleotide sequences deposited in nr database using BLAST software. All obtained DNA sequences were clearly readable and have been deposited in GenBank. The accession numbers for samples from the outbreak are as follows: BVDV (KM982443), BRSV (KM982441), BCoV (KM982442), *P. multocida* (KM982445), *H. somni* (KM982444), and *M. bovis* (KM982446).

Table 2. Detection of infectious agents associated with BRD from bronchoalveolar lavages of dairy calves ($n=21$).

Infectious agents	Bronchoalveolar Lavages of calves																				Total	
	Asymptomatic						Symptomatic (BRD)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21
Bovine viral diarrhea virus	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	6/21 (28.6%)
Bovine respiratory syncytial virus	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	8/21 (38.1%)
Bovine coronavirus	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	7/21 (33.3%)
Bovine parainfluenza 3 virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Bovine herpesvirus 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Pasteurella multocida</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	9/21 (42.85%)
<i>Histophilus somni</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	4/21 (19%)
<i>Mannheimia haemolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Mycoplasma bovis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	7/21 (33.3%)

(+) positive; (-) negative.

Table 3. Frequency of Single and mixed infections in bronchoalveolar lavages samples during an outbreak of bovine respiratory disease in dairy calves.

Microorganisms	Positive samples <i>n</i> =18/21 (85.7%)
Single infections	<i>n</i> =5/18 (27.7%)
BoHV-1	-
BVDV	1
BPIV-3	-
BRSV	-
BCoV	-
<i>M. haemolytica</i>	-
<i>P. multocida</i>	1
<i>M. bovis</i>	2
<i>H. somni</i>	1
Mixed infections	<i>n</i> =13/18 (72.2%)
BVDV + <i>P. multocida</i>	1
BVDV + BRSV + <i>P. multocida</i>	1
BVDV + BRSV + BCoV	2
BVDV + BRSV + BCoV + <i>P. multocida</i>	1
BRSV + BCoV + <i>P. multocida</i>	1
BRSV + BCoV + <i>H. somni</i>	2
BRSV + <i>P. multocida</i> + <i>M. bovis</i>	1
BCoV + <i>P. multocida</i> + <i>M. bovis</i>	1
<i>P. multocida</i> + <i>M. bovis</i>	2
<i>M. bovis</i> + <i>H. somni</i>	1

*BVDV (bovine viral diarrhea virus); BRSV (bovine respiratory syncytial virus); BCoV (bovine coronavirus); BPIV-3 (bovine parainfluenza 3 virus); BoHV-1 (bovine herpesvirus 1); *P. multocida* (*Pasteurella multocida*); *H. somni* (*Histophilus somni*); *M. haemolytica* (*Mannheimia haemolytica*); *M. bovis* (*Mycoplasma bovis*); *n* (number of calves affected by single or mixed infections).

Discussion

To the knowledge of the authors, the current study is the first molecular-based investigation for the main pathogens involved in BRD during an outbreak. The present study also represents the first South American report of BRD mixed infections in calves with respiratory disease clinical signs. Results obtained in the current study add to what was described on pathogens associated with BRD in dairy calves³, since most studies of BRD infections were conducted in feedlot cattle^{15,18,20,34,45}.

Considering that the upper airways may be colonized by a variety of bacterial pathogens¹ without clinical signs in calves, the present study was carried out using BALs as clinical specimens. These samples of lower respiratory tract are suitable to achieve a more reliable result of microorganisms associated with the etiology of BRD³. In addition, the molecular diagnosis adopted in the current study permitted a large number of species-specific tests for each pathogen after molecular assays were standardized.

Diagnostic techniques used in previous investigations of mixed infections in BRD cases usually include pathological examination, serology, bacterial cultures and/or virus isolation^{18,20,34,45}. However, these techniques may be appropriate for one agent but not for the other due to different sensitivity values^{6,17}. Additionally, serology tests in young cattle may have the interference of colostral antibodies and cross-reactions of pathogens with other commensals microorganisms that difficult interpretation of test results. Classical viruses and bacteria isolation are laborious and require a long period for obtaining the results^{17,43,44}. Among the ante-mortem diagnostic procedures applicable to BRD-affected calves, molecular techniques may be considered the most appropriate due to its fast and reliable results⁶.

The detection of infectious agents that are circulating in a herd is important to define the preventive and therapeutic strategies that should be adopted. In the rearing unit of this study calves did not have contact with older animals of dairy herds after arrival. Calves housed together are the main reservoir of infectious agents to susceptible young cattle²⁴; thus, possibly asymptomatic and symptomatic calves may have contributed to pathogen dissemination among calves.

In Brazil, there are few reports about BRD, and these studies have focused in the efforts to detect the involvement of respiratory tract organs by gross and microscopic lesions, serological evaluations, and characterization of specific pathogens^{7,9,10,14,36}. A retrospective study conducted in southern Brazil revealed that the morbidity and mortality rates reached 100% and 34%, respectively⁹, in post-mortem examination of calves suspected of having

BRD with conclusive diagnosis of pneumonia. However, preventive and control measures are not usually performed in Brazilian herds³⁶. The findings of 85.7% positive samples for at least one of the pathogens associated with BRD in BAL samples evaluated, highlights the importance of this disease in the rearing unit, especially of the mixed infections that were more frequent (72.2%) than single infections (27.7%).

In this study, the most frequent mixed infections were between viruses and bacteria (55.5%), which show the synergisms of these infectious agents in BRD, similarly to severe pneumonia in children and puppies^{11,12}. Single viruses associated with BRD rarely are lethal to cattle. Severe pneumonia usually occurs when commensals bacteria from the nasopharynx invade the lower airways of cattle after stressful conditions and viral infections. These predisposing factors affect the host defense mechanisms by altering mucosal surface components and decreasing the activity of innate immune system cells such as T lymphocytes, B-lymphocytes, monocytes, and macrophages, increasing the exposure to pathogens³⁰.

Within the viruses evaluated in the rearing unit that were not detected in BALs (BPIV-3 and BoHV-1), the latter has high frequency of seropositivity in adult cattle of this region¹⁴. BRD associated with BoHV-1 usually occur in older animals. Thus, it is likely that maternal antibodies acquired by calves against BoHV-1 provided adequate protection in the first months of age¹⁶.

BRSV had the highest prevalence during this outbreak (46.6%). This result is in agreement with previous studies conducted in Demark and Finland that this virus as the most important in BRD of dairy calves^{3,5}.

In this outbreak, BCoV is the second report of this virus associated with respiratory symptoms in cattle of Brazil. The first cases in the country were detected in feedlot beef cattle (Beuttemüller, manuscript in preparation). The role of this virus in BRD has been recognized recently with the dual enteric and respiratory tropism of some strains¹³. BRD related to BCoV is a potential threat to calves in rearing units especially if considering that the peak of virus shedding is very short occurring at up to 4 days after arrival at facilities for rearing practices³³.

The immunosuppressive effect of BVDV in the host organism is considered the main factor associated with the development of BRD in cattle of affected herds due to an increased risk of infections by other pathogens^{18,31}. Multiple strains of BVDV have been reported in cattle from the same geographic region of the rearing unit such as BVDV 1a, BVDV 1b, and BVDV 1d associated with reproductive failure. Within these subgenotypes, BVDV 1b was

suggested as the predominant associated with BRD in calves¹⁹. However, the phylogenetic analysis performed using 5'UTR sequences of BVDV strains in the BALs of the current outbreak, clustered with BVDV 1d subgenotype. This finding shows the role of BVDV 1d participating in different clinical manifestations in herds of the studied region. Furthermore, susceptible calves do not become ill until 5 weeks of age after exposure to BVDV virulent strains when passive immunity is acquired, even supposing a low virus replication may occur in this animals³². However, in the present study, BVDV was detected in BALs of calves in the first weeks of age. This is possibly due to the infection of these calves with different BVDV strains of their herds of origin since cross protection between different BVDV subgenotypes is incomplete^{29,31}.

Among the four bacterial pathogens in BRD cases evaluated in this study, only *M. haemolytica* was not detected. *Pasteurella multocida*, *M. bovis*, and *H. somni* were detected in single or in mixed infection with other BRD pathogens. Recently, a study evaluated the bacteria present in the lower respiratory tract of healthy and diseased calves in Brazil with BRD and revealed similar results compared to studies conducted within Brazil during the last decades⁷. It revealed that *enterobacteriaceae* are the predominant bacteria in BALs without the isolation of any of the bacteria detected in the outbreak herein presented. Although enterobacteria were not investigated in the present study since it is not associated with BRD, the difference in findings may be explained by the diagnostic technique used. Bacteria isolation associated with BRD from BAL cultures usually has less sensitivity and specificity compared to PCR assays^{3,43,44}. Furthermore, several factors may interfere in BALs cultures such as proper maintenance and transportation of the samples, multiple bacteria growth on the plate, and false-negative results due to antimicrobial therapies¹⁷.

The findings of *P. multocida* as the most prevalent pathogen (42.85%) in the outbreak is in accordance to other investigations that revealed this as the most common bacteria isolated in dairy calves with BRD^{3,28}. The *H. somni* presence in this study is a new evidence of the disease caused by this underdiagnosed bacteria in Brazil, which have been described for the first time less than 2 years ago in diseased cattle of this country associated with systemic disease, reproductive manifestations, thrombotic meningoencephalitis, and respiratory distress^{26,27}. Diagnoses of *M. bovis* are difficult by cultivation due to overgrowth of contaminants in a nutritionally complex media after a long period of incubation; furthermore, conventional PCR may have low sensitivity in clinical samples^{44,45}. The current study presents an alternative to detect *M. bovis* specifically in BAL samples by nested-PCR and

differentiate from other species of mycoplasmas that are opportunistic and/or commensals of respiratory tract.

At the time of sampling, the outbreak in the rearing unit was not controlled. Antimicrobial drugs used in calves (spectinomycin and tulathromycin) are commonly used for BRD treatment^{4,21}. However, these drugs were not used as metaphylaxis and/or therapy in early stages of BRD that increase the success of treated calves^{4,22}. In association with this condition, potential risk factors to BRD previously described were detected at the rearing unit^{25,38,50}. It includes automatic milk-feeder with common nipple, large group pens (>12 calves), older calves housed with younger, and calves from various sources with unknown sanitary status.

A decrease in bacteria susceptibility to antibiotics and/or lack of appropriate evaluation of calves under treatment for further therapy are other important causes of failure in the control of BRD, especially for mycoplasmal infections. A study with *M. bovis* isolated from young cattle in France revealed that 100% of recent strains are resistant to common antibiotics used to control BRD²¹. Thus, it may be suggested that when calves are challenged with so many etiologic agents and risk factors, maternal immunity, and broad-spectrum antimicrobial drugs may not be sufficient to control BRD in calves.

In conclusion, the findings of this study revealed the presence of several microorganisms associated with BRD in a calf rearing unit from Brazil that differs from previously reports carried out with lower respiratory tract samples in the country. Molecular assays provided rapid and reliable results of different types of infections occurring in the herd during the outbreak. Further studies focusing in the characterization of etiological agents detected are extremely important to clarify the circulating strains in epidemiological studies. Elucidating the pathogens involved in BRD is essential to provide guideline data on the infectious agents involved and define proper measures to prevent and control the disease.

Sources and manufactures

- a. 3500 Genetic Analyzer for Resequencing & Fragment Analysis, Applied Biosystems, Carlsbad, CA.
- b. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Carlsbad, CA.
- c. CattleMaster[®] 4+L5, Pfizer Animal Health, Lincoln, NE.
- d. dNTP Set (100mM) Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA.
- e. Platinum taq DNA Polymerase Invitrogen, Life Technologies, São Paulo, Brasil.

- f. Proteinase K Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY.
- g. PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit, Life Technologies, São Paulo, Brasil.
- h. Quant-iT High-Sensitivity DNA Assay Kit, Eugene, OR.
- i. UltraPure DEPC-Treated Water, Life Technologies, Carlsbad, CA.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The Brazilian Institutes CNPq, CAPES, FINEP, and Araucaria Foundation provided funding for this study. AA Alfieri and AF Alfieri are recipients of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil) fellowships.

References

1. Ackermann MR, Derscheid R, Roth JA: 2010, Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:215-228.
2. Angen O, Ahrens P, Tegtmeier C: 1998, Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. *Vet Microbiol* 63:39-48.
3. Angen O, Thomsen J, Larsen LE, et al.: 2009, Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol* 137:165-171.
4. Apley M: 2006, Bovine respiratory disease: pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22:399-411.
5. Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R, et al.: 2007, Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Vet Microbiol* 119:256-265.
6. Bell CJ, Blackburn P, Elliott M, et al.: 2014, Investigation of polymerase chain reaction assays to improve detection of bacterial involvement in bovine respiratory disease. *J Vet Diagn Invest* 26:631-634.
7. Benesi FJ, Bertagnon HG, Wachholz L: 2013, Bacterial pathogens and cytology of tracheobronchial region in calves during neonatal period. *Pesq Vet Bras* 33:700-704.

8. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, et al.: 1990, Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503
9. Brasil NDA, Hinnah FL, Fiss L, et al.: 2013, Respiratory diseases in calves in southern Rio Grande do Sul: study of 33 outbreaks. *PesqVet Bras* 33:745-751.
10. Cardoso MV, Sforsin AJ, Scarcelli E: 2002, Importance of differential diagnosis in an outbreak of bovine enzootic pneumonia. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)*:111-113.
11. Chiu CY, Chen CJ, Wong KS, et al.: 2013, Impact of bacterial and viral coinfection on mycoplasmal pneumonia in childhood community-acquired pneumonia. *J Microbiol Immunol Infect.* pii: S1684-1182(13)00110-2.
12. Dear JD: 2014, Bacterial pneumonia in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 44:143-159.
13. Decaro N, Campolo M, Desario C, et al.: 2008, Respiratory Disease Associated with Bovine Coronavirus Infection in Cattle Herds in Southern Italy. *J Vet Diagn Invest* 20:28-32.
14. Dias JA, Alfieri AA, Ferreira-Neto JS, et al.: 2013, Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. *Transbound Emerg Dis* 60:39-47.
15. Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, et al.: 2009, Lung Pathology and Infectious Agents in Fatal Feedlot Pneumonias and Relationship with Mortality, Disease Onset, and Treatments. *J Vet Diagn Invest* 21:464-477.
16. Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, et al.: 2004, Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline. *Vaccine* 22:643-649.
17. Fulton RW, Confer AW: 2012, Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: gold standards for diagnosis, do they exist? *Can Vet J* 53:754-761.
18. Fulton RW, Purdy CW, Confer aW, et al.: 2000, Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with Pasteurella spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can Vet J* 64:151-159.
19. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, et al.: 2002, Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can Vet J* 66:181-190.
20. Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, et al.: 2006, Diseases and Pathogens Associated with Mortality in Ontario Beef Feedlots. *J Vet Diagn Invest* 18:18-28.

21. Gautier-Bouchardon AV, Ferré S, Le Grand D, et al.: 2014, Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PLoS one* 9:e87672-e87672.
22. Gorden PJ, Plummer P: 2010, Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:243-259.
23. Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS: 2010, Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:381-394.
24. Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, et al.: 2009, Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci* 92:5139-5146.
25. Gulliksen SM, Lie KI, Løken T, Osterås O: 2009, Calf mortality in Norwegian dairy herds. *J Dairy Sci* 92:2782-2795.
26. Headley S, Oliveira VHS, Figueira G, et al.: 2013, *Histophilus somni*-induced infections in cattle from southern Brazil. *Trop Anim Health Prod* 45:1579-1588.
27. Headley SA, Alfieri AF, Oliveira VHS, et al.: 2014, *Histophilus somni* is a potential threat to beef cattle feedlots from Brazil. *Vet Rec*:2013-2015.
28. Nikunen S, Härtel H, Orro T, et al.: 2007, Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30:143-151.
29. Otonel RAA, Alfieri AF, Dezen S, et al.: 2014, The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 46:87-92.
30. Panciera RJ, Confer AW: 2010, Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:191-214.
31. Ridpath JF: 2010, Bovine viral diarrhea virus: global status. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:105-121.
32. Ridpath JF: 2003, BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals* 31:127-131.
33. Saif LJ: 2010, Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:349-364.
34. Shahriar FM, Clark EG, Janzen E, et al.: 2002, Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can Vet J* 43:863-868.
35. Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL: 2006, Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci* 84:1999-2008.

36. Spilki FR, Almeida RS, Domingues HG, et al.: 2006, Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. *Virus Res* 116:30-37.
37. Stokka GL: 2010, Prevention of respiratory disease in cow/calf operations. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:229-241.
38. Svensson C, Hultgren J, Oltenacu PA: 2006, Morbidity in 3-7-month-old dairy calves in south-western Sweden, and risk factors for diarrhoea and respiratory disease. *Prev Vet Med* 74:162-179.
39. Svensson C, Lundborg K, Emanuelson U, Olsson S-O: 2003, Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Prev Vet Med* 58:179-197.
40. Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF, Alfieri AA: 2005, Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res Vet Sci* 79:85-88.
41. Takiuchi E, Stipp DT, Alfieri AF, Alfieri AA: 2006, Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *J Virol Methods* 131:148-154.
42. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, et al.: 2010, The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J* 51:1095-1102.
43. Tegtmeier C, Angen O, Ahrens P: 2000, Comparison of bacterial cultivation, PCR, in situ hybridization and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. *Vet Microbiol* 76:385-394.
44. Tenk M, Bálint A, Stipkovits L, et al.: 2006, Detection of *Mycoplasma bovis* with an improved PCR assay. *Acta Vet Hung* 54:427-435.
45. Thomas A, Ball H, Dizier I, et al.: 2002, Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet Rec* 151:472-476.
46. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, et al.: 1998, Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 36:1096-1100.
47. Vilček S, Elvander M, Ballagi-Pordány A, Belák S: 1994, Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J Clin Microbiol* 32:2225-2231.
48. Vilček Š, Herring AJ, Herring JA, et al.: 1994, Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136:309-323.

49. Virtala AM, Gröhn YT, Mechor GD, Erb HN: 1999, The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life. *Prev Vet Med* 39:25-37.
50. Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, et al.: 2014, Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev Vet Med* 113:231-240.
51. Zhu Y-M, Shi H-F, Gao Y-R, et al.: 2011, Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Vet Microbiol* 149:446-451.

5 CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- A frequência de diagnóstico de alguns dos principais e mais reconhecidos micro-organismos implicados em doença respiratória em bovinos, tais como BRSV, BCoV, BVDV, *P. multocida*, *M. bovis*, *H. somni*, foi alta em um surto de doenças respiratória em bezerras de uma unidade de criação.
- Bezerras com sinais clínicos evidentes de doença respiratória e também bezerras assintomáticas podem albergar no trato respiratório inferior potenciais patógenos respiratórios de bovinos.
- A utilização de técnicas moleculares (PCR, RT-PCR, *seminested*-PCR e *nested*-PCR) em amostras de lavado broncoalveolar possibilitou o diagnóstico *ante-mortem* de agentes etiológicos associados a doença respiratória em bezerras.
- As infecções mistas, ocasionadas pela associação de etiologia vírica e bacteriana, foram mais frequentes em um surto de doença respiratória em bezerras leiteiras de uma unidade de criação.
- O vírus da diarreia viral bovina subgenotipo 1d, anteriormente identificado em outros quadros clínicos, também pode estar associado a infecção respiratória sintomática em bezerras leiteiras mantidas em uma unidade de criação.

6 APÊNDICES

6. APÊNDICES

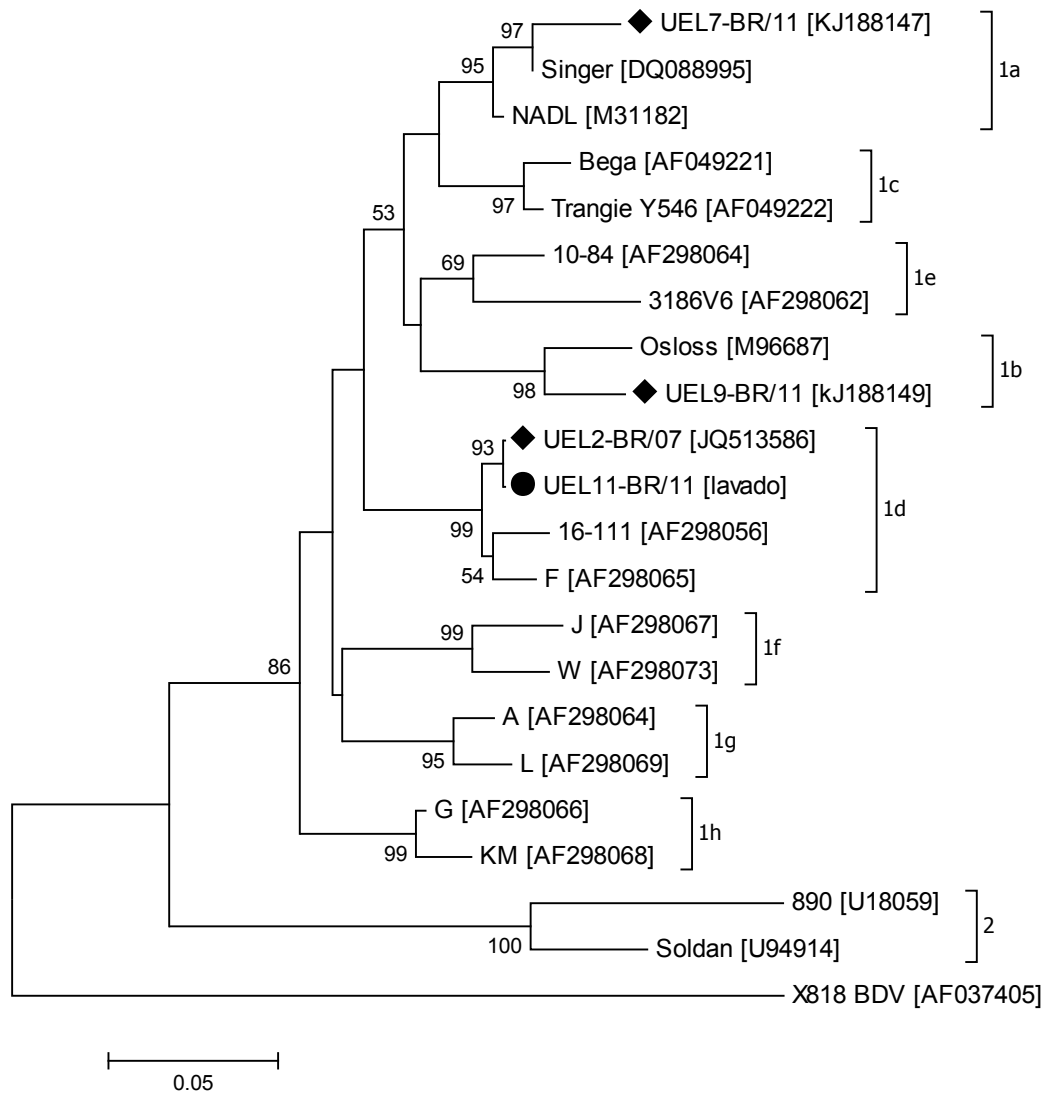


Figura 4 - Árvore filogenética demonstrando que o BVDV 1d circulava na unidade de criação (círculo preenchido) durante um surto de doença respiratória em bezerras. A árvore foi construída utilizando-se sequências de 226 nucleotídeos da região 5' não traduzida do genoma do BVDV de cepas brasileiras da região geográfica do estudo (losango preenchido) e cepas referência dos subgenótipos de BVDV-1 e BVDV-2 (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2002). A cepa X818 do vírus da doença da fronteira foi utilizada como *outgroup*. Os números de acesso correspondentes para cada cepa utilizada são dados entre colchetes. A análise filogenética foi realizada no programa MEGA v.6.0 através do método de *neighbor-joining* com modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros. A árvore gerada foi testada com *bootstrap* de 1.000 replicações e valores abaixo de 50% foram omitidos.

7. ANEXOS

ANEXO A: Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP *Set*, 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
2. 5x *first-strand* PCR-*Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
3. 10x PCR-*Buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
4. 123 bp DNA *Ladder* (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
5. Acetona P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
6. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Sicalab®)
7. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
8. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
9. Agarose (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
10. Água DEPC (Diethyl pirocarbonato) (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
11. Álcool etílico absoluto (C₂H₅OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
12. Azul de bromofenol (Sigma®, EUA)
13. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®, EUA)
14. Cloreto de Potássio P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
15. Cloreto de Sódio P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
16. Dimetilsulfóxido (DMSO) (C₂H₆SO) F.M. 78,13 (Sigma®, EUA)
17. Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®, EUA)
18. Dodecil Sulfato de Sódio - Lauril Sulfato de Sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (BDH)
19. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) P.M. 141,96 (Synth®)
20. Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄ . 2H₂O) P.M. 155,99 (Reagen®)
21. Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Mallinckrodt Chemicals®)
22. Hidroximetil amino metano - TRIS 99%, P.M. 121,14 (Merck®)

23. Isotiocianato de Guanidina P.M. 118,16 (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
24. *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) *Reverse Transcriptase* (RT), 40.000 unidades (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
25. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) 324 *forward* (5'-UTR/BVDV) (5'-ATGCCCW-TAGTAGGACTAGGCA-3', onde W= A ou T) VILČEK et al. (1994) – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
26. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) 326 *reverse* (5'-UTR/BVDV) (5'-TCAACTCCATG-TGCCATGTAC -3') VILČEK et al. (1994) – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
27. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B5a *forward* (gene G/BRSV) (5'-CCACCCTAGCA-ATGATAACCTTGAC-3') VILČEK et al. (1994) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
28. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B6a *reverse* (gene G/BRSV) (5'-AAGAGAG-GATGCCTTGCTGTGG-3') VILČEK et al. (1994) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
29. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B7a *forward* (gene G/BRSV) (5'-CATCAATC-CAAAGCACCACTGTC-3') VILČEK et al. (1994) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
30. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B8a *reverse* (gene G/BRSV) (5'-GCTAGTTCTGT-GGTGGATTGTTGTC-3') VILČEK et al. (1994) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
31. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BCoV1 *forward* (gene N/BCoV) (5'-CGATGAGG-CTATTCGAC-3') TAKIUCHI et al. (2006) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
32. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BCoV2 *reverse* (gene N/BCoV) (5'-TGTGGGT-GCGAGTTCTGC-3') TAKIUCHI et al. (2006) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
33. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BCoV3 *forward* (gene N/BCoV) (5'-TTGCTAG-TCTTGTCTGGC-3') TAKIUCHI et al. (2006) – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
34. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) HNfwd *forward* (gene HN/BPIV-3) (5'-GAATGA-CTCATGATAGAGGTAT-3') ZHU et al. (2011) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)

35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) HNseq1 *reverse* (gene HN/BPIV-3) (5'-AGGACA-ACCAGTTGTATTACAT-3') ZHU et al. (2011) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) HS-453F *forward* (gene 16S DNAr/*H. somni*) (5'GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3') ANGEN et al. (1998) – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) HS-860R *reverse* (gene 16S DNAr/*H. somni*) (5'-TT-CGGGCACCAAGTRTTCA-3', onde R= G ou A) ANGEN et al. (1998) – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
38. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) KMT1T7 *reverse* (gene KMT1/*P.multocida*) (5'-AT-CCGCTATTTACCCAGTGG-3') TOWNSEND et al. (1998) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
39. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) KMT1SP6 *forward* (gene KMT1/*P.multocida*) (5'-G-CTGTAAACGAACTCGCCAC-3') TOWNSEND et al. (1998) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
40. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) nMb-fw *forward* (região intergênica 16S-23S DNAr/*M. bovis*) (5'-GTACACTTGTCTTTTATCACTATA-3') não publicado – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
41. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) nMb-rv *reverse* (região intergênica 16S-23S DNAr/*M. bovis*) (5'-AAGGTATCTCGCTTTATGTCCT-3') não publicado – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
42. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) Mh-fw *reverse* (região intergênica lktA-artJ/*M. haemolytica*) (5'-GTCCCTGTGTTTTTATTATAAG-3') ANGEN et al., (2009) – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
43. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) Mh-rv *reverse* (região intergênica lktA-artJ/*M. haemolytica*) (5'-CACTCGATAATTATTCTAAATTAG-3') ANGEN et al., (2009) – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
44. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) Molli-fw *forward* (região intergênica 16S-23S DNAr/*Mollicutes* spp.) (5'-CCGTCAAACYATGGGAGC-3', onde Y= T ou C) não publicado – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)
45. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) Molli-rv *reverse* (região intergênica 16S-23S DNAr/*Mollicutes* spp.) (5'-GTGYCCCGCCMTACTCAGG-3', onde Y= T ou C; M= A ou C) não publicado – 200 pmol (Integrated DNA Technology®, EUA)

46. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) P3 *forward* (gene gD/BoHV-1) (5'GCTGTGGGAAGCGGTACG-3') TAKIUCHI et al. (2005) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
47. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) P4 *reverse* (gene gD/BoHV-1) (5'-GTCGACTATGGCCTTGTGTGC-3') TAKIUCHI et al. (2005) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
48. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) P5 *forward* (gene gD/BoHV-1) (5'-ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG-3') TAKIUCHI et al. (2005) – 200 pmol (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
49. *Platinum*® *Taq* DNA Polymerase, 500 unidades (Invitrogen™ Life Technologies™, BRA)
50. Proteinase K 20 mg / mL (Ambion® Life Technologies™, EUA)
51. Sacarose P.A. (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen®)
52. *Superscript*™ II *Reverse Transcriptase* (RT), 10,000 *units* (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
53. Triton x-100 (J.T.Baker®)

ANEXO B: Lista de Kits

1. *BigDye*® *Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems® Life Technologies™, EUA)
2. *Quant-iT*™ *dsDNA BR assay kit* (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
3. *Qubit*® *dsDNA BR assay kit* (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)
4. *PureLink*® *quick gel extraction and PCR purification combo kit* (Invitrogen™ Life Technologies™, EUA)

ANEXO C: Lista de Softwares

1. *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3:*
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
2. *BLAST The Basic Local Alignment Search Tool:*
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3. *MEGA package software version 6.05:*
(<http://www.megasoftware.net>)

ANEXO D: Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica: suspensão de sílica**
 - 6 g de sílica (O_2Si)
 - Adicionar 50 mL de água bidestilada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 50 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 44 mL do sobrenadante
 - Adicionar 100 μ L de HCl fumegante para ajustar o pH=2,0.
 - Aliquotar

- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton x-100

- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão fosfato salina (PBS)**
 - 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
 - 3 mM cloreto de potássio (KCl)
 - 8 mM fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4)
 - 15 mM fosfato de potássio monobásico ($K_2H_2PO_4$)
 - Água ultrapura autoclavada 1L q.s.p. pH 7,2

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**
 - 0,25 g de azul de bromofenol (0,25%)
 - 45 g de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) (45%)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 100 mL

- **Tampão de corrida: TEB (TRIS - Ácido bórico - EDTA) 10 x []**
 - 107,78 g de TRIS (0,89 M)
 - 55,03 g de ácido bórico (0,89 M)
 - 7,45 g de EDTA (0,02 M)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1 L

- SDS 10%
 - 5 g de dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 50 mL

- Gel de agarose 2%
 - 1 g de agarose
 - 50 mL de tampão TEB 1 x
 - 30 µL de brometo de etídeo

- Diluição de dNTP
 - solução estoque - concentração 100 mM - 100 µL de cada dNTP
 - solução uso - concentração 10 mM - 10 µL da solução estoque + 90 µL de água ultrapura

- **Preparação dos oligonucleotídeos**
 - Solução estoque: Eluição do *primer* liofilizado para uma concentração final de 200 pmol (*primer* mãe) através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{concentração em nmol} \times 1.000}{200 \text{ pmol}} = \text{volume em } \mu\text{L de água ultrapura adicionada}$$

- Solução de uso de todos os primers: concentração final de 20 pmol (*primer* uso) através da seguinte fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

- *Primer 324*

Concentração: 34,8 nmol

Data de fabricação: Mai. 2013

$34,8 \times 1000 = 34800$ pmol

$34800 / 200 = 174$ µL de água ultrapura adicionada

- *Primer 326*

Concentração: 48,5 nmol

Data de fabricação: Mai. 2013

$48,5 \times 1000 = 48500$ pmol

$48500 / 200 = 242,5$ µL de água ultrapura adicionada

- *Primer B5a*

Concentração: 23,57 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$23,57 \times 1000 = 23570$ pmol

$23570 / 200 = 117,85$ µL de água ultrapura adicionada

- *Primer B6a*

Concentração: 27,33 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$27,33 \times 1000 = 27330$ pmol

$27330 / 200 = 136,65$ µL de água ultrapura adicionada

- *Primer B7a*

Concentração: 23,69 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$23,69 \times 1000 = 23690$ pmol

$23690 / 200 = 118,45$ µL de água ultrapura adicionada

- *Primer* B8a

Concentração: 25,19 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$25,19 \times 1000 = 25190$ pmol

$25190 / 200 = 125,95$ μ L de água ultrapura adicionada

- *Primer* BCoV1

Concentração: 28,57 nmol

Data de fabricação: Dez. 2007

$28,57 \times 1000 = 28570$ pmol

$28,57 / 200 = 142,85$ μ L de água ultrapura adicionada

- *Primer* BCoV2

Concentração: 30,7 nmol

Data de fabricação: Dez. 2007

$30,7 \times 1000 = 30700$ pmol

$30700 / 200 = 153,5$ μ L de água ultrapura adicionada

- *Primer* BCoV3

Concentração: 33,8 nmol

Data de fabricação: Dez. 2013

$33,8 \times 1000 = 33800$ pmol

$33800 / 200 = 169$ μ L de água ultrapura adicionada

- *Primer* HNFwd

Concentração: 29,96 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$29,96 \times 1000 = 29960$ pmol

$29960 / 200 = 149,8$ μ L de água ultrapura adicionada

- *Primer* HNseq1

Concentração: 30,92 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$30,92 \times 1000 = 30920$ pmol

$30920 / 200 = 154,6 \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* HS-453F

Concentração: 33,9 nmol

Data de fabricação: Nov. 2013

$33,9 \times 1000 = 33900 \text{ pmol}$

$33900 / 200 = 169,5 \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* HS-860R

Concentração: 40,6 nmol

Data de fabricação: Nov. 2013

$40,6 \times 1000 = 40600 \text{ pmol}$

$40600 / 200 = 203 \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* KMT1T7

Concentração: 44,6 nmol

Data de fabricação: Fev. 2014

$44,6 \times 1000 = 44600 \text{ pmol}$

$44600 / 200 = 223 \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* KMT1SP6

Concentração: 54,4 nmol

Data de fabricação: Fev. 2014

$54,4 \times 1000 = 54400 \text{ pmol}$

$54400 / 200 = 272 \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* nMb-fw

Concentração: 29,1 nmol

Data de fabricação: Ago. 2013

$29,1 \times 1000 = 29100 \text{ pmol}$

$29100 / 200 = 145,5 \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* nMb-rv

Concentração: 38,4 nmol

Data de fabricação: Ago. 2013

$38,4 \times 1000 = 38400 \text{ pmol}$

$38400 / 200 = 192 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* Mh-fw

Concentração: 32,4 nmol

Data de fabricação: Ago. 2013

$32,4 \times 1000 = 32400 \text{ pmol}$

$32400 / 200 = 162 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* Mh-rv

Concentração: 31,7 nmol

Data de fabricação: Ago. 2013

$31,7 \times 1000 = 31700 \text{ pmol}$

$31700 / 200 = 158,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* Molli-fw

Concentração: 34,8 nmol

Data de fabricação: Ago. 2013

$34,8 \times 1000 = 34800 \text{ pmol}$

$34800 / 200 = 174 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* Molli-rv

Concentração: 35,7 nmol

Data de fabricação: Ago. 2013

$35,7 \times 1000 = 35700 \text{ pmol}$

$35700 / 200 = 178,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer* P3

Concentração: 40,46 nmol

Data de fabricação: Set. 2005

$40,46 \times 1000 = 40460 \text{ pmol}$

$40460 / 200 = 202,3 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura adicionada

- *Primer P4*

Concentração: 46,59 nmol

Data de fabricação: Set. 2005

$46,59 \times 1000 = 46590$ pmol

$46590 / 200 = 232,95$ μL de água ultrapura adicionada

- *Primer P5*

Concentração: 42,66 nmol

Data de fabricação: Set. 2005

$42,66 \times 1000 = 42660$ pmol

$42660 / 200 = 213,3$ μL de água ultrapura adicionada

ANEXO E: Protocolo de técnicas

- Extração do RNA/DNA pela técnica de Boom et al. (1990)
 - Adicionar 500 μL de lavado broncoalveolar (completar com PBS se necessário) em microtubo de 1,5 mL
 - Adicionar 10 μL de Proteinase K
 - Adicionar 25 μL de SDS 10 %
 - Homogeneizar em vórtex
 - Incubar em termobloco à 56°C / 30 min
 - Centrifugar 10.000 x g / 30 s
 - Adicionar 500 μL da solução L6
 - Adicionar 25 μL de sílica hidratada
 - Homogeneizar em vórtex
 - Agitar em temperatura ambiente / 30 min
 - Centrifugar 10.000 x g / 30 s
 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
 - Adicionar 500 μL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar 10.000 x g / 30 s
 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 μL de solução L2

- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 1000 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 μ L de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em descarte comum
- Secar o *pellet* em termobloco à 56°C (aproximadamente 2 min)
- Adicionar 50 μ L de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar em termobloco à 56°C / 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x g / 5 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μ L
- Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização

• **Reações das técnicas moleculares:**

Quadro 1 - Reação de RT-PCR para BVDV:

Mix das reações	Variações de temperatura das reações:
Mix Desnaturação: - Água DEPC – 2,5 µL - <i>Primer</i> 326 (20 pmol) – 0,5 µL - RNA extraído – 9 µL - Volume final = 12 µL	Desnaturação: - 70°C / 10 min - Banho de gelo / 5 min
Mix RT-PCR: - 5x <i>first-strand buffer</i> pH 8,3 – 4 µL - DTT 0,1 M – 2 µL - dNTP 2,5 mM – 1 µL - Água DEPC – 0,7 µL - M-MLV RT 200U/µL – 0,3 µL - RNA desnaturado – 12 µL - Volume final = 20 µL	RT-PCR: - 37°C / 50 min - 72°C / 15 min
Mix PCR: - Água DEPC – 34 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 2 µL - MgCl ₂ 50 mM – 1,5 µL - <i>Primer</i> 324 (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> 326 (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA complementar – 5 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 3 min - 94°C / 45 s - 56°C / 30 s - 72°C / 30 s - 72°C / 7 min <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> } 35 ciclos </div>

Quadro 2 - Reação de RT-PCR + *nested*-PCR para BRSV:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
Mix Desnaturação: - Água DEPC – 6 µL - <i>Primer</i> B6a (20 pmol) – 1 µL - RNA extraído – 5 µL - Volume final = 12 µL	Desnaturação: - 70°C / 10 min - Banho de gelo / 5 min
Mix RT-PCR: - 5x <i>first-strand buffer</i> pH 8,3 – 4 µL - DTT 0,1 M – 2 µL - dNTP 2,5 mM – 1 µL - Água DEPC – 0,5 µL - <i>SuperScript II RT</i> 200U/µL – 0,5 µL - RNA desnaturado – 12 µL - Volume final = 20 µL	RT-PCR: - 42°C / 50 min - 72°C / 15 min
Mix PCR: - Água DEPC – 35,5 µL - 10x <i>PCR Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 1 µL - <i>Primer</i> B5a (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> B6a (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA complementar – 2 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 3 min - 94°C / 45 s - 55°C / 45 s - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min } 30 ciclos
Mix <i>nested</i>-PCR: - Água DEPC – 35,5 µL - 10x <i>PCR Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 1,0 µL - <i>Primer</i> B7a (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> B8 (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA produto da PCR – 2 µL - Volume final = 50 µL	<i>Nested</i>-PCR: - 94°C / 3 min - 94°C / 45 s - 62°C / 45 s - 72°C / 1min - 72°C / 7 min } 30 ciclos

Quadro 3 - Reação de RT-PCR para BPIV-3:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
<p>Mix Desnaturação:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Primer</i> HNfwd (20 pmol) – 1 μL - <i>Primer</i> HNseq1 (20 pmol) – 1 μL - RNA extraído – 10 μL - Volume final = 12 μL 	<p>Desnaturação:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 70°C / 10 min - Banho de gelo / 5 min
<p>Mix RT-PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5x <i>first-strand buffer</i> pH 8,3 – 4 μL - DTT 0,1 M – 2 μL - dNTP 2,5 mM – 1 μL - Água DEPC – 0,5 μL - <i>SuperScript II RT</i> 200U/μL – 0,5 μL - RNA desnaturado – 12 μL - Volume final = 20 μL 	<p>RT-PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 42°C / 50 min - 72°C / 15 min
<p>Mix PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Água DEPC – 23 μL - 10x <i>PCR Buffer</i> pH 8,4 – 5 μL - MgCl₂ 50 mM – 3 μL - <i>Primer</i> HNfwd (20 pmol) – 3 μL - <i>Primer</i> HNseq1 (20 pmol) – 3 μL - dNTP 2,5 mM – 2,5 μL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/μL – 0,5 μL - DNA complementar – 10 μL - Volume final = 50 μL 	<p>PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 94°C / 4 min - 94°C / 45 s - 49°C / 45 s - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min <p style="text-align: right;">} 35 ciclos</p>

Quadro 4 - Reação de RT-PCR + *seminested*-PCR para BCoV:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
Mix Desnaturação: - Água DEPC – 4 µL - <i>Primer</i> BCoV2 (20 pmol) – 1 µL - RNA extraído – 5 µL - Volume final = 10 µL	Desnaturação: - 70°C / 10 min - Banho de gelo / 5 min
Mix RT-PCR: - 5x <i>first-strand buffer</i> pH 8,3 – 4 µL - Água DEPC – 2,5 µL - DTT 0,1 M – 2 µL - dNTP 2,5 mM – 1 µL - M-MLV 200U/µL – 0,5 µL - RNA desnaturado – 10 µL - Volume final = 20 µL	RT-PCR: - 37°C / 50 min - 72°C / 15 min
Mix PCR: - Água DEPC – 26 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 7,5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 2 µL - <i>Primer</i> BCoV1 (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> BCoV2 (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA complementar – 8 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 4 min - 94°C / 1 min - 55°C / 1 min - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> } 35 ciclos </div>
Mix <i>seminested</i>-PCR: - Água DEPC – 33,5 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 2 µL - <i>Primer</i> BCoV3 (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> BCoV2 (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA produto da PCR – 3 µL - Volume final = 50 µL	<i>Seminested</i>-PCR: - 94°C / 4 min - 94°C / 1 min - 62°C / 1 min - 72°C / 1min - 72°C / 7 min <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> } 30 ciclos </div>

Quadro 5 - Reação de *seminested*-PCR para BoHV-1:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
Mix PCR: - Água DEPC – 28,8 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 1,5 µL - <i>Primer</i> P3 (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> P4 (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DMSO – 3,2 µL - DNA extraído – 5 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 4 min - 94°C / 30 s - 60°C / 30 s - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min } 35 ciclos
Mix <i>seminested</i>-PCR: - Água DEPC – 31,8 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 1,5 µL - <i>Primer</i> P4 (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> P5 (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DMSO – 3,2 µL - DNA produto da PCR – 2 µL - Volume final = 50 µL	<i>Seminested</i>-PCR: - 94°C / 4 min - 94°C / 30 s - 60°C / 30 s - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min } 30 ciclos

Quadro 6 - Reação de PCR para *H. somni*:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
Mix PCR: - Água DEPC – 32 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 1,5 µL - <i>Primer</i> HS453-F (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> HS860-R (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA extraído – 5 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 3 min - 94°C / 1 min - 55°C / 1 min - 72°C / 1 min - 72°C / 5 min } 35 ciclos

Quadro 7 - Reação de PCR para *P. multocida*:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
Mix PCR: - Água DEPC – 32 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 1,5 µL - <i>Primer</i> KMT1SP6 (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> KMT1T7 (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA extraído – 5 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 5 min - 94°C / 30 s - 55°C / 30 s - 72°C / 30 s - 72°C / 5 min <div style="display: flex; align-items: center; margin-left: 100px;"> } 35 ciclos </div>

Quadro 8 - Reação de PCR para *M. haemolytica*:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
Mix PCR: - Água DEPC – 25,9 µL - dNTP 2,5 mM – 8 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - <i>Primer</i> Mh-fw (20 pmol) – 3,25 µL - <i>Primer</i> Mh-rv (20 pmol) – 3,25 µL - MgCl ₂ 50 mM – 2,5 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,1 µL - DNA extraído – 2 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 5 min - 94°C / 1 min - 58°C / 1 min - 72°C / 1 min - 72°C / 5 min <div style="display: flex; align-items: center; margin-left: 100px;"> } 35 ciclos </div>

Quadro 9 - Reação de *nested-PCR* para *M. bovis*:

Mix das reações:	Variações de temperatura das reações:
Mix PCR: - Água DEPC – 31 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,0 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 2,5 µL - <i>Primer</i> Molli-fw (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> Molli-rv (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,5 µL - DNA extraído – 5 µL - Volume final = 50 µL	PCR: - 94°C / 5 min - 94°C / 1 min - 55°C / 1 min - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min <div style="display: flex; align-items: center; margin-left: 100px;"> } 35 ciclos </div>
Mix <i>nested-PCR</i>: - Água DEPC – 34,7 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,0 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl ₂ 50 mM – 3 µL - <i>Primer</i> nMb-fw (20 pmol) – 1 µL - <i>Primer</i> nMb-rv (20 pmol) – 1 µL - <i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> 5 U/µL – 0,3 µL - DNA produto da PCR – 1 µL - Volume final = 50 µL	<i>Nested-PCR</i>: - 94°C / 5 min - 94°C / 1 min - 58°C / 1 min - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min <div style="display: flex; align-items: center; margin-left: 100px;"> } 35 ciclos </div>

- **Eletroforese em gel de agarose 2%**
 - Misturar 5 μL do produto de PCR com 2 μL de tampão de amostra
 - submeter a eletroforese sob voltagem (100 V) e amperagem (80A) constantes, por aproximadamente 60 min.
 - Submeter o gel sob luz UV para fotodocumentação.

- **Purificação do produto de PCR utilizando – *PureLink[®] quick gel extraction and PCR purification combo kit***
 - Misturar quatro volumes de *Binding buffer* (B2) com isopropanol para cada volume de amostra de produto de PCR (50 μL -100 μL) em microtubo de 1,5 mL
 - Homogeneizar em vórtex
 - Transferir a amostra para a coluna *PureLink[®] clean-up spin* inserida em um microtubo de lavagem.
 - Centrifugar a $> 10.000 > g / 1 \text{ min}$
 - Descartar o filtrado e recolocar no mesmo microtubo de lavagem
 - Adicionar 650 μL de *Wash Buffer* (W1) com etanol
 - Centrifugar a $> 10.000 > g / 1 \text{ min}$
 - Descartar o filtrado e recolocar no mesmo microtubo de lavagem
 - Centrifugar a velocidade máxima / 3 min
 - Transferir a coluna para um novo microtubo de eluição (1,5 mL)
 - Adicionar 25 μL de *Elution Buffer* (E1) na coluna
 - Centrifugar a velocidade máxima / 1 min
 - Transferir o purificado para um microtubo de 0,5 μL
 - Proceder com a etapa de quantificação ou estocar o fragmento de DNA purificado a - 20°C

- **Quantificação de produto de PCR em Qubit[™] fluorometer utilizando *Quant-iT[™] dsDNA BR assay kit* e *Qubit[®] dsDNA BR assay kit***
 - Preparar a solução *Quant-iT[™] Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT[™]* no *Buffer Quant-iT[™]*, 1:200. São necessários 200 μL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100
 - Homogeneizar em vórtex

- No microtubo das amostras adicionar 198 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 2 μL do DNA purificado
 - No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 0
 - No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 100
 - Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s
 - Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
 - Realizar a leitura usando *QubitTM fluorometer* (InvitrogenTM Life TechnologiesTM, EUA)
 - Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra
- **Preparo de amostras para sequenciamento**
 - Adicionar 5 μL da amostra purificada na concentração adequada ajustada com água ultrapura (2 ng / μL para produtos de PCR com até 300 pb e 4 ng / μL para produtos de PCR acima de 300 pb) em microtubo de 0,2 mL.
 - Adicionar 1 μL do *primer* na concentração de 5 pmol