



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

LUCIANA DE CARVALHO BALBO

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA PROTEÍNA G DE
CEPAS BRASILEIRAS DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL BOVINO**

Londrina
2016

LUCIANA DE CARVALHO BALBO

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA PROTEÍNA G DE
CEPAS BRASILEIRAS DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Balbo, Luciana de Carvalho.

Análise molecular do gene da proteína G de cepas brasileiras do Vírus Respiratório Sincicial Bovino. / Luciana de Carvalho Balbo. - Londrina, 2016.
77 f.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Teses. 2. Doença respiratória bovina - Teses. 3. Vírus Respiratório Sincicial Bovino - BRSV - Teses. 4. Proteína G - genogrupos - Teses. I. Fernandes Alfieri, Alice. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

LUCIANA DE CARVALHO BALBO

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA PROTEÍNA G DE CEPAS
BRASILEIRAS DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. ^a Dr. ^a Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Edsel Alves Beuttemüller
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Londrina, 11 de abril de 2016.

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 da Prof. ^a Dr.^a Alice Fernandes 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 este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força para continuar a caminhada, por ter me iluminado e abençoado esses anos e pelas conquistas alcançadas.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Amauri A. Alfieri e a Prof. ^a Dr.^a Alice F. Alfieri, pela oportunidade, confiança, paciência e serem exemplo de profissionalismo.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e banca de defesa Prof. Dr. Selwyn A. Headley, Prof. ^a Dr.^a Elis Lorenzetti, Prof. Dr. Márcio Carvalho da Costa e ao Dr. Edsel Alves Beuttemüller pela disponibilidade e considerações que engrandeceram esse estudo.

Agradeço ao meu pai, Otavio e a minha mãe, Gisleine, que me ensinaram que minha cabeça é a minha sentença, me educaram a cada dia com todo amor, carinho e paciência e me apoiaram todos dias e me deram suporte para cada conquista alcançada.

Agradeço as minhas irmãs Juliana e Adriana por me escutarem, me incentivarem e me darem força em cada batalha do dia a dia mostrando o quanto eu sou capaz.

Agradeço minha tia “avó “ Neusa que me sacode todos os dias às 6:00 da manhã, e nunca me abandonou nos dias difíceis e complicados, estando sempre ao meu lado.

Agradeço a minha madrinha, Marcy, por ser minha segunda mãe e mesmo longe ajudou a tornar esse sonho realidade.

Agradeço ao meu afilhado, Leandro Jr e a minha sobrinha Maria Luísa por me ensinar a compreender o verdadeiro significado do amor.

Agradeço aos meus amigos Marcos Vinicíus, Rodrigo, Jaqueline e Luana que me escutaram e me deram força para superar todos os obstáculos.

Agradeço a todos do laboratório de virologia animal, por me ajudarem diretamente e indiretamente a concretizar esse trabalho.

E a todos os meus familiares, meus cunhados e amigos que estiveram sempre ao meu lado me dando força e apoio.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

BALBO, Luciana de Carvalho. **Análise molecular do gene da proteína G de cepas brasileiras do Vírus Respiratório Sincicial Bovino**. 2016. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) é um dos principais agentes etiológicos envolvidos em doenças respiratórias de bovinos ocasionando grandes perdas econômicas para a pecuária, devido às altas taxas de morbidade em bezerros de rebanhos leiteiros e em bovinos confinados. A proteína G do BRSV é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e induz anticorpos neutralizantes, por isso, o gene da proteína G é amplamente utilizado em análises epidemiológicas e filogenéticas de cepas de BRSV. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de cepas de BRSV identificadas em infecções respiratórias em bezerras leiteiras e em bovinos de corte em confinamento. O estudo foi realizado com sete cepas de BRSV, selecionadas aleatoriamente a partir de uma coleção de amostras biológicas (swabs nasais), provenientes de rebanhos do estado do Paraná, previamente avaliadas quanto à presença do genoma do BRSV e de outros agentes patogênicos (bactérias e vírus) do trato respiratório superior de bovinos. As sete cepas incluídas neste estudo foram identificadas em infecções singulares por BRSV, sendo três cepas provenientes de um surto de doença respiratória aguda em animais de uma unidade de criação de bezerras leiteiras e quatro cepas provenientes de surtos de doença respiratória em bovinos de três confinamentos. As análises filogenéticas realizadas por meio do sequenciamento de nucleotídeos de produtos com 371 pb do gene da proteína G amplificado pela técnica de nested-PCR, revelaram que as sete cepas de BRSV incluídas neste estudo pertenciam ao genogrupo III, sendo esta a primeira descrição desse genogrupo em bovinos no Brasil. Adicionalmente, cinco cepas analisadas demonstraram mutações na região imunodominante da proteína G. Este estudo acrescenta novas informações sobre as características moleculares de cepas BRSV que circulam em rebanhos bovinos brasileiros bem como pode contribuir para a adoção de medidas imunoprofiláticas mais eficazes para o controle das infecções pelo BRSV no Brasil.

Palavras-chave: Bovino. Doença respiratória bovina. BRSV. Proteína G. Genogrupos.

BALBO, Luciana de Carvalho. **Molecular analysis of G protein gene of Brazilian wild-type strains of bovine respiratory syncytial virus**. 2016. 77p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is considered a major etiologic agent involved in bovine respiratory diseases, which causes great economic losses to livestock, due to high rates of morbidity in dairy calves and feedlot animals. The BRSV G protein is responsible for binding the virus to the host's cells and induces neutralizing antibodies. Hence, the G protein gene is the most widely used in the phylogenetic analysis of BRSV strains. The aim of this study was to perform molecular characterization of the BRSV strains identified in bovine respiratory infection in dairy calves and beef feedlot. The study was performed in seven BRSV strains, randomly selected from a collection of biological samples (nasal swabs), from herds located in Paraná state, Brazil, previously evaluated for the presence of the genome of BRSV and other pathogens (bacteria and virus) of upper respiratory tract of cattle. The seven strains included in this study were identified in single infections for BRSV, of which three strains were from an outbreak of acute respiratory distress in dairy calves of a calf unit and the other four strains were from bovine respiratory disease outbreaks in steers of three feedlots. Phylogenetic analyzes performed by nucleotide sequencing of products with 371 bp of the G protein gene amplified by nested-PCR, have revealed that the seven BRSV strains included in this study belong to the genogroup III, this being the first description of this genogroup in cattle in Brazil. Additionally, five BRSV strains analyzed demonstrated mutations located in the immunodominant region of G protein. This study adds new information about the molecular characteristics of BRSV strains circulating in Brazilian cattle and can contribute to the adoption of more effective immunoprophylactic measures for the control of BRSV infections in Brazil.

Keywords: Cattle. Bovine respiratory disease. BRSV. Protein G. Genogroups.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Representação anatômica do pulmão bovino 13

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do vírus respiratório sincicial bovino 17

Figura 3 – Representação esquemática dos genes das proteínas estruturais e não estruturais do vírus respiratório sincicial bovino..... 19

Figura 4 – Árvore filogenética realizada com sequências de nucleotídeo da proteína G para demonstrar os subgrupos antigênicos e os genogrupos do vírus respiratório sincicial bovino 23

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Figure 1 -Phylogenetic analysis of the BRSV strains based on the partial fragment (371bp) of G protein gene. The sequences of this study are indicating with Brazil's flag and other Brazilian strains are indicated with a filed circle. The phylogenetic tree was constructed using the maximum-likelihood method and the pairwise nucleotide distances were valued using the Tamura-Nei model. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. The bootstrap values are shown next to the branches, with values less than 50 removed..... 50

Figure 2 - Alignment of amino acid sequences of the Brazilian BRSV strains analyzed in this study, the prototype strain of subgroup A –genogroup III (391.2 strain), and the strains used in commercial vaccines, Bayovac (subgroup A – genogroup III), Vacores, and Rispoval (subgroup AB –genogroup II), and Brazilian strain BRSV-25-BR (subgroup B - genogroup I), demonstrating replacement of amino acids in the immunodominant region of the G protein. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas virais e suas funções.....	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
BCoV	Coronavírus Bovino
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i> – ferramenta de pesquisa básica para alinhamento local
BoHV-1	Herpesvírus Bovino 1
BRSV	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
BT	Células da linhagem finita de corneto bovino
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
CDRB	Complexo de Doença Respiratória de Bovinos
CER	Linhagem de célula de embrião de galinha
CRIB	Linhagem de células de rim de bovino resistente ao BVDV
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked. Immunosorbent Assay</i> – ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
EUA	Estados Unidos da América
HEP	Linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano
HRSV	Vírus Respiratório Sincicial Humano
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
M	Molar
MDBK	Linhagem de células de rim bovino
min.	Minuto
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
nt	Nucleotídeo(s)
ORF	Fase aberta de leitura
p.b.	Pares de bases
PI3	Vírus da parainfluenza bovina tipo 3
q.s.p.	Quantidade suficiente para

RdRp	RNA dependente de RNA polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa
SH	<i>Small Hydrofobic</i>
STAT 2	Proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição 2
Th2	Células auxiliaadoras 2 (<i>T helper 2</i>)
VERO	Linhagem de células renais de macaco verde africano
μL	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO	17
2.1.1	Características gerais do vírus	17
2.1.2	Proteínas virais	18
2.1.3	Replicação viral	21
2.1.4	Variabilidade antigênica dos subgrupos de BRSV	22
2.1.5	Epidemiologia	24
2.1.6	Patogenia e sinais clínicos	25
2.1.7	Imunidade	27
2.1.8	Diagnóstico	27
2.1.9	Prevenção e controle	28
3	REFERÊNCIAS	31
4	OBJETIVOS	40
4.1	OBJETIVO GERAL	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO - ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA PROTEÍNA G DE CEPAS BRASILEIRAS DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO	41
	RESUMO	41
	ABSTRACT	42
5.1	Introduction	42
5.2	Materials and methods	44
5.2.1	<i>Sampling and data collection</i>	44
5.2.2	<i>Virological analysis</i>	45
5.2.3	<i>Phylogenetic analysis</i>	45
5.3	Results	46
5.4	Discussion	47
5.5	References	52

6	CONCLUSÕES	62
	ANEXOS	63
	ANEXO A - Lista de reagentes.....	64
	ANEXO B - Lista de kits	67
	ANEXO C - Lista de <i>Softwares</i>	68
	ANEXO D - Soluções e tampões	69
	ANEXO E - Protocolos de técnicas.....	73

1. INTRODUÇÃO

A produção de bovinos é uma atividade do agronegócio brasileiro que se destaca por sua importância na economia. O país possui o maior rebanho comercial do mundo. No ano de 2014, o lucro bruto gerado pela bovinocultura foi de aproximadamente R\$70 bilhões (IBGE, 2014). Neste mesmo ano, o rebanho brasileiro era composto por 208,3 milhões de cabeças, das quais 42,07 milhões foram abatidas, sendo que 11% do abate total foi representado por bovinos em regime de confinamento. A produção total de carne foi de aproximadamente 10,1 milhões de toneladas equivalente carcaça dos quais 7,9 milhões foram destinadas ao mercado interno e 2,1 milhões destinadas à exportação (ABIEC, 2015a). Em 2015 foram abatidos 24.468 milhões de animais e foram exportadas 1,8 milhões de toneladas equivalente carcaça, rendendo US\$ 5,939 milhões (ABIEC, 2015b).

Estudos realizados nos Estados Unidos da América (EUA) avaliaram o impacto econômico das doenças respiratórias sobre a produção de bovinos. Os resultados demonstraram a incidência de 14,4% de enfermidades respiratórias nos rebanhos e custos adicionais com o tratamento dos animais acometidos que variaram em torno de US\$ 15.57 por cabeça (SNOWDER et al., 2006). Estima-se que o prejuízo com bezerro devido à doença respiratória seja em torno de US\$ 9.84 a US\$ 16.35. Esse custo pode ser ainda maior pois as infecções respiratórias podem interferir diretamente na produtividade, principalmente se ela ocorrer nos primeiros dias de vida do bezerro (GORDEN; PLUMMER, 2010). Custos com tratamento, prevenção e prejuízos na produção relacionados a doenças respiratórias e diarreias podem chegar a 86% do lucro total da propriedade (SISCHO et al., 1990). O prejuízo gerado a cada 1000 animais acometidos pode chegar a aproximadamente US\$ 13,895 (SNOWDER et al., 2006).

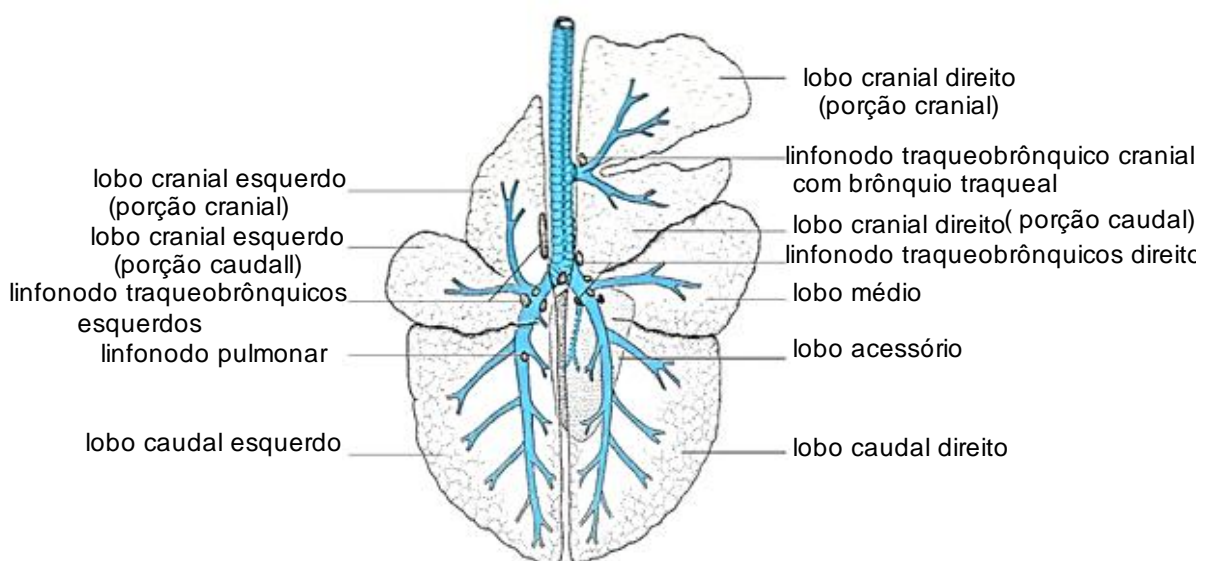
Estudo realizado por Batista e colaboradores, no Brasil, que acompanhou aproximadamente 200 mil cabeças de bovinos de corte, da região sudeste, durante um período de dois anos, diagnosticou 11.577 mil animais com doenças do complexo respiratório bovino, sendo essa a principal responsável pela morbidade dos bovinos envolvidos nesse estudo. A taxa de mortalidade observada foi baixa 0,21% e os custos adicionais resultantes da alta morbidade do rebanho acarretado pela doença respiratória foi de R\$ 16,315.40 / 10.000 gado e custo estimado com mortalidade de R\$ 14,334.00 / 10.000 bovinos (Comunicação pessoal). Acredita-se que no Brasil o prejuízo econômico por ano com animais acometidos por infecções no trato respiratório é de aproximadamente R\$ 12 milhões de reais, deste R\$ 6,31 milhões / ano associados a morbidade do rebanho e R\$ 5,54 milhões devido as perdas por

mortalidade (Comunicação pessoal).

Características anatômicas relativas à compartimentação do pulmão dos bovinos favorecem a hipóxia em porções distais de brônquios e de bronquíolos predispondo à atelectasia e vaso constrição que diminuem a eficiência das trocas gasosas (Figura 1) (DELAUNOIS, 1989; KIRSCHVINK, 2008). Essas alterações aumentam a demanda do sistema imunológico nas áreas comprometidas. Os processos inflamatórios extensos favorecem a descamação celular e a liberação de mediadores químicos pode gerar graves danos ao tecido pulmonar que interferem com a sua principal função, que é a realização das trocas gasosas (VIUFF et al., 2002; ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Adicionalmente, os bovinos apresentam características anatômicas, como baixo número de conexões interalveolares, que resulta em insuficiente perfusão de oxigênio ao nível dos lobos cranioventrais, o que predispõem a instalação de micro-organismos nessa porção do trato respiratório inferior (DELAUNOIS, 1989; KIRSCHVINK, 2008). Outro fator relevante é que esses animais geralmente respiram por meio da cavidade oral para dissipar calor. Os bovinos apresentam ainda a região traqueobrônquica mais alongada, que pode predispor a infecções no trato respiratório devido à facilidade da deposição de partículas estranhas na superfície, além de aumentar o trajeto de gases e outras partículas inaladas, comprometendo os mecanismos de defesa (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Figura 1 - Representação anatômica do pulmão bovino.



Fonte: Adaptado de Gethie, 1958

Em bovinos imunodeprimidos e/ou estressados e em situações desfavoráveis de manejo, a inalação de aerossóis contaminados favorece o aumento da população bacteriana que pode colonizar o pulmão (SVENSSON; LIBERG, 2006).

Dentre os principais e diferentes fatores envolvidos na redução da produtividade de rebanhos bovinos, tanto leiteiro quanto de corte e, principalmente, animais submetidos ao sistema de manejo confinado, o complexo de doença respiratória de bovinos (CDRB) apresenta papel de destaque, devido às altas taxas de morbidade do plantel (SNOWDER et al., 2006). Na maioria das ocasiões, o CDRB é decorrente do desequilíbrio entre o sistema imune do animal e os desafios ambientais e de manejo aos quais os bovinos são submetidos, tais como estresse decorrente da superlotação; condições climáticas desfavoráveis; transporte e mudança de ambiente; alteração abrupta na dieta; elevada umidade relativa do ar; mistura de animais de diferentes idades e diferentes perfis imunológicos no mesmo lote; doenças concomitantes; além de condições sanitárias deficientes que impõem ao animal maior exigência do sistema imune frente aos desafios microbiológicos (SVENSSON; LIBERG, 2006).

O CDRB é considerado uma síndrome multietiológica e multifatorial, determinando grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária devido às altas taxas de morbidade do plantel (SNOWDER et al., 2006; PANCIERA; CONFER, 2010). Diversos vírus e bactérias atuando de forma singular ou em associação estão envolvidos no desenvolvimento do CDRB. Em relação aos agentes bacterianos que podem estar relacionados na etiologia do CDRB, *Manheimia haemolytica* é isolada com maior frequência em amostras biológicas provenientes de animais com sinais clínicos de doença respiratória. Entretanto, de acordo com estudos mais recentes, observou-se aumento na detecção de outras bactérias envolvidas na etiologia do CDRB tais como *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (PANCIERA; CONFER, 2010; GERSHWIN et al., 2015). Dentre os agentes virais, destacam-se os vírus da diarreia viral bovina (BVDV), herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bPI3), coronavírus bovino (BCoV) e vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) (APLEY, 2006; GRISSETT; WHITE; LARSON, 2015).

Em 1970, o BRSV foi isolado pela primeira vez em um surto de doença respiratória em bezerros na Suíça (PACCAUD; JACQUIER, 1970). O vírus recebeu essa denominação por apresentar características genômicas, estruturais e antigênicas semelhantes ao vírus respiratório sincicial humano (HRSV), principal responsável por doenças respiratórias em crianças (BORCHERS et al., 2013). No Brasil, o BRSV foi descrito pela

primeira vez em 1993, detectado em amostras de pulmão de bezerros com algumas semanas de idade, provenientes de abatedouros do Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 1993).

O BRSV é considerado o agente mais importante na infecção do trato respiratório de bezerros atuando como agente primário da doença respiratória, possuindo a capacidade de se replicar em células do trato respiratório superior e inferior (VAN DER POEL et al., 1994; VALARCHER; TAYLOR, 2007). A disseminação do vírus no rebanho ocorre principalmente por aerossóis ou por contato direto entre os animais (LARSEN; TJORNEHOJ; VIUFF, 2000). A infecção pelo BRSV favorece o desenvolvimento de pneumonias bacterianas, uma vez que o vírus aumenta a colonização e a aderência bacteriana, devido às alterações nos mecanismos de defesa do trato respiratório, tanto específicos quanto inespecíficos (LARSEN; TJORNEHOJ; VIUFF, 2000).

O BRSV é responsável por enfermidades respiratórias graves, frequentemente caracterizadas por bronquiolite e pneumonia intersticial, sendo que em animais jovens os sinais clínicos geralmente são mais graves (GERSHWIN, 2007; SACCO et al., 2014). Mais de 90% dos bovinos são infectados antes dos três anos de idade, sendo que desses, 70% são infectados antes de completarem um ano de vida (FURZE et al., 1997). As taxas de mortalidade são baixas, no entanto, a morbidade pode chegar a 80%, principalmente em surtos. No entanto, o prejuízo econômico com o estabelecimento do vírus no rebanho pode ser elevado (SNOWDER et al., 2006).

No Brasil, estudos relacionados à caracterização dos agentes etiológicos envolvidos em doença respiratória, principalmente em infecções ocasionadas pelo BRSV são escassos e geralmente se limitam a técnicas sorológicas de diagnóstico. Contudo, os poucos isolados de BRSV identificados em nosso território foram agrupados no genogrupo I, subgrupo B, entretanto, devido às poucas informações referentes a este vírus em nosso meio, não se pode confirmar a ausência de outros genogrupos circulando em nosso território. O presente estudo teve como principal objetivo realizar a caracterização molecular de cepas brasileiras BRSV em surtos de doenças respiratórias em bovinos de confinamento e em bezerros provenientes de uma unidade de criação de bezerras destinada à produção leiteira. Técnicas moleculares, como a *nested*-PCR, para a amplificação parcial do gene da proteína G possibilitaram a caracterização de cepas de genogrupo diferente de BRSV em amostras de *swabs* nasais de animais adultos e bezerros do estado do Paraná. Esses estudos comprovam a necessidade de novas investigações sobre as cepas de BRSV circulantes no Brasil. A avaliação molecular e epidemiológica dos rebanhos brasileiros deve contribuir para a adoção de medidas imunoproláticas que contribuam para o controle dessa importante doença

respiratória que compromete o rebanho bovino, minimizando assim os prejuízos econômicos impostos por essa infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

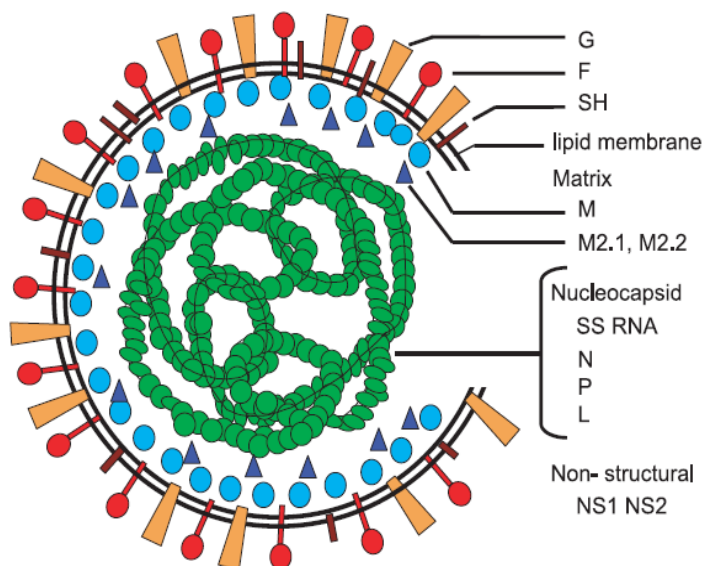
2.1 VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO

2.1.1 Características gerais do vírus

O BRSV está classificado na família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus*. É um vírus envelopado, pleomórfico, de genoma RNA fita simples, não segmentado e de polaridade negativa (ICTV, 2016). As características estruturais, genômicas e antigênicas do vírus são similares às do vírus respiratório sincicial ovino, caprino e humano (TRUDEL et al., 1989).

O genoma do BRSV é envolto por uma camada de nucleoproteína que protege o RNA de ação de enzimas (BUCHHOLZ; FINKE; CONZELMANN, 1999). O RNA genômico possui aproximadamente 15000 nucleotídeos, responsáveis pela transcrição de 10 RNAs mensageiros subgenômicos, sendo que cada um contém uma única fase aberta de leitura (ORF), com exceção do gene M2, que apresenta as ORFs M2-1 e M2-2, que subsequentemente são traduzidas em 11 proteínas (Tabela 1) (COLLINS; CHANOCK; MURPHY, 2001). As proteínas externas, de adesão (G) e de fusão (F) são os principais alvos do sistema imune do hospedeiro (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura do vírus respiratório sincicial bovino.



Fonte: Valarcher e Taylor, 2007.

O BRSV é sensível a pH baixo e aquecimento a 56°C por 30 minutos, mas permanece estável à -50°C ou em temperaturas mais baixas por muitos meses, embora episódios de congelamento e descongelamento possam diminuir a infectividade, ou até mesmo, destruir a partícula viral (LARSEN, 2000). Adicionalmente, a exposição ao dietiléter, clorofórmio e outros solventes lipídicos destrói o virion (LARSEN; TJORNEHOJ; VIUFF, 2000).

O vírus se dissemina no rebanho principalmente em secreções respiratórias e aerossóis e pode ser transmitido por meio do contato direto entre os animais ou indiretamente, por fômites (LARSEN, 2000; LARSEN; TJORNEHOJ; VIUFF, 2000).

2.1.2 Proteínas virais

A proteína G é uma proteína transmembrana tipo II, uma vez que a sua porção N-terminal fica exposta ao citoplasma e a porção C-terminal permanece no lúmen (LANGEDIJK et al., 1998). A proteína G é considerada uma proteína de adesão, responsável pela ligação do vírus à célula, sendo a principal indutora de anticorpos do tipo neutralizante (LEVINE; KLAIBER-FRANCO; PARADISO, 1987). De acordo com a cepa viral isolada a proteína G é constituída por cerca de 260 a 263 aminoácidos (MALLIPEDDI; SAMAL, 1993). Essa proteína apresenta uma região de domínio central, composta por 32 resíduos de aminoácidos, denominada de nó de cisteínas, que é a região imunodominante, responsável por induzir eosinofilia pulmonar nas infecções experimentais por HRSV em camundongos (LANGEDIJK et al., 1997; OUMOUNA et al., 2005). A proteína G apresenta maior variação genética quando comparada às outras proteínas virais (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). A porção do RNA que codifica a proteína G frequentemente é utilizada para a realização de estudos envolvendo investigação epidemiológica molecular e análises filogenéticas (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

Em 95% dos isolados de BRSV a proteína de fusão (F) é homóloga, sendo considerada uma proteína altamente conservada (GERSHWIN et al., 1998). A proteína F é responsável pela penetração do vírus na célula hospedeira por meio da fusão entre as membranas da célula do hospedeiro e o vírus. Essa proteína também é responsável pela fusão de membranas citoplasmáticas de células infectadas e não infectadas formando sincícios que são considerados uma importante característica de efeito citopático desse vírus (VALARCHER; TAYLOR, 2007). A proteína F apresenta 574 aminoácidos e também possui

importante função na indução de anticorpos neutralizantes, além de conferir resistência à infecção pelo BRSV (TAYLOR et al., 1992; PASTEY; SAMAL, 1993).

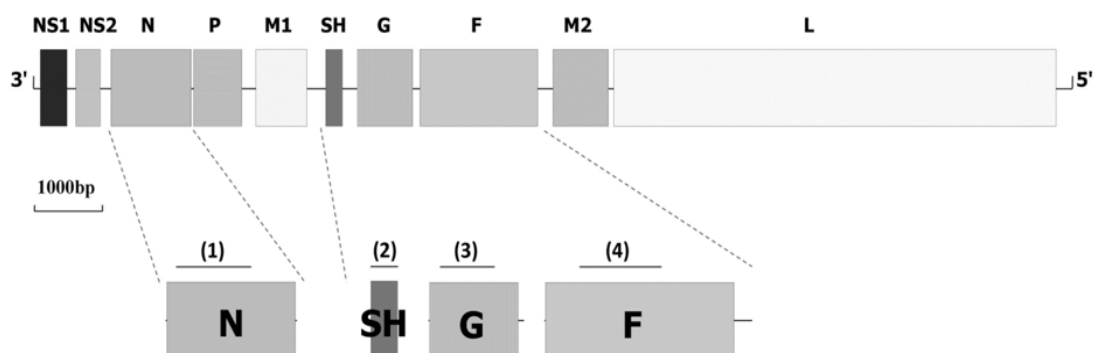
A proteína *small hydrofobic* (SH) é uma proteína pequena, integral de membrana, de característica hidrofóbica, de função ainda pouco conhecida (KARGER; SCHMIDT; BUCHHOLZ, 2001). Acredita-se que essa proteína interage com a proteína F, auxiliando na adesão da partícula viral à membrana celular, uma vez que ela altera a permeabilidade da membrana (SAMAL; ZAMORA, 1991).

Ao contrário dos outros membros da família *Paramyxoviridae*, as proteínas não-estruturais (NS-1 e NS-2) do BRSV são codificadas por dois genes (SCHLENDER et al., 2000). As proteínas NS-1 e NS-2 bloqueiam a ativação do fator 3 do interferon (IFN) e inibem a expressão das proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição 2 (STAT2) inibindo com isso a síntese e ação de interferons alfa e beta pela célula infectada diminuindo a resposta celular à ação dos interferons (VALARCHER et al., 2003).

A proteína M é uma proteína de matriz, localizada na camada mais interna da partícula viral, responsável pela interação do vírus com as membranas biológicas do hospedeiro (WESTOVER; HUGHES, 2001). A função mais importante da proteína M é na formação de novas partículas virais, além de interagir com a proteína não-estrutural NS1 (TENG; COLLINS, 1998; HENGST; KIEFER, 2000).

A proteína M2 apresenta duas ORFs responsáveis pela tradução das proteínas M2.1 e M2.2 (Figura3) (VALARCHER; TAYLOR, 2007). A proteína M2.1 é responsável por impedir a interrupção abrupta da transcrição de mRNA virais, enquanto que a proteína M2.2 está associada a regulação da síntese de RNA (YUNUS; COLLINS; SAMAL, 1998; BERMINGHAM; COLLINS, 1999)

Figura 3: Representação esquemática dos genes das proteínas estruturais e não-estruturais do vírus respiratório sincicial bovino.



Fonte: Sarmiento-Silva et al., 2012.

O nucleocapsídeo é constituído de três proteínas: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P) e a polimerase viral (L), todas elas envolvidas na replicação do RNA viral (TAYLOR et al., 1997).

A proteína N está presente em grande quantidade no vírion, conferindo forte ligação entre os RNAs genômicos e anti-genômicos protegendo o genoma viral contra a ação de RNAses (MALLIPEDDI; SAMAL, 1993). Adicionalmente, acredita-se que a proteína N apresenta importante função nas fases de transcrição e replicação do genoma viral (MALLIPEDDI; LUPIANI; SAMAL, 1996).

A fosfoproteína P age como chaperonina, auxiliando a proteína N a atingir conformação funcional, e prevenindo interações indesejáveis na forma solúvel da proteína N (YUNUS; COLLINS; SAMAL, 1998; KHATTAR et al., 2001). A proteína P ainda atua como fator de regulação entre a transcrição e a replicação viral, além de atuar como cofator para a ação da proteína L que é a polimerase viral (YUNUS; COLLINS; SAMAL, 1998).

A proteína L é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) responsável pela transcrição e replicação do genoma do BRSV (Tabela 1) (YUNUS; COLLINS; SAMAL, 1998).

Tabela 1- Proteínas virais e suas funções.

<i>Proteínas</i>	<i>Função</i>
Adesão – G	Ligação do vírus aos receptores celulares
Fusão –F	Penetração viral e formação de sincícios
SH	Desconhecida
Matriz – M	Formação de novas partículas virais
M2.1	Impedir o término abrupto da síntese de mRNA virais
M2.2	Regula a síntese de RNA
NS-1 e NS-2	Inibem a síntese e ação de interferons
Nucleoproteína –N	Ligação entre os RNAs e protege o genoma viral da ação de RNAses
Fosfoproteína – P	Chaperonina e cofator para a proteína L
Polimerase – L	RNA polimerase dependente de RNA

Fonte: Adaptada Valarcher e Taylor, 2007.

2.1.3 Replicação viral

A adesão do vírion à célula hospedeira ocorre pela ligação da proteína G aos receptores celulares específicos, provavelmente receptores glicosaminoglicanos, ainda não determinados (FELDMAN; AUDET; BEELER, 2000). Em seguida, completando essa fase, ocorre a ligação da proteína F à parede celular e, possivelmente, ainda pode ocorrer a ligação da proteína SH à superfície celular (SCHLENDER et al., 2003).

Após a adesão do vírion à célula, ocorre a penetração por fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, que é mediada pela proteína F (EASTON; DOMACHOWSKIE; ROSENBERG, 2004; KONIG et al., 2004). Após a entrada do vírion na célula, o complexo ribonucleoproteína é liberado no interior do citoplasma e por ação da RdRp é iniciada a transcrição viral em mRNAs (VALARCHER; TAYLOR, 2007).

As células infectadas podem se fundir e levar à formação de sincícios ou células gigantes multinucleadas, que é uma característica desta família viral. As células não infectadas, mas próximas às células infectadas, também podem se fundir (ARSLANAGIC et al., 1996; VALARCHER; TAYLOR, 2007).

A transcrição viral inicia-se na extremidade 3' do RNA e envolve um mecanismo de *start-stop* sequencial, ou seja, iniciando e terminando a cada uma das junções intergênicas, levando a produção de RNAs subgenômicos (KUO; FEARNES; COLLINS, 1997). Esse mecanismo é guiado por um sinal curto conservado presente em cada unidade de mRNA (KUO; FEARNES; COLLINS, 1997; VALARCHER; TAYLOR, 2007).

A formação de RNAs anti-genômicos é realizada pela mesma polimerase, ela só é iniciada após a tradução dos primeiros transcritos em proteínas (YUNUS et al., 2001). No entanto, para a síntese de RNA anti-genômico todas as junções intergênicas são ignoradas pelo complexo enzimático (BUCHHOLZ; FINKE; CONZELMANN, 1999).

Os nucleocapsídeos são montados no citoplasma. A proteína N empacota os RNAs, formando hexâmeros, de modo que cada proteína N se liga a seis bases de RNA, formando um complexo de ribonucleoproteína. Em seguida, as proteínas P e L se ligam ao complexo formando o nucleocapsídeo (MOUSSA, 1994). Com o auxílio da proteína M o nucleocapsídeo migra para a membrana celular, onde também estão presentes as proteínas de superfície viral (RIFFAULT et al., 2006; VALARCHER; TAYLOR, 2007). A liberação de novas partículas virais pode ocorrer tanto na superfície da membrana celular, quanto em forma de vesículas citoplasmáticas (VALARCHER; TAYLOR, 2007).

2.1.4 Variabilidade antigênica dos subgrupos de BRSV

Os isolados de BRSV, de acordo com a análise da ação de anticorpos monoclonais contra as proteínas G (adesão) presentes no envelope viral, podem ser divididos em quatro subgrupos antigênicos, denominados A, B, AB e atípicos (FURZE et al., 1994; SCHRIJVER et al., 1996).

Análises das principais proteínas (G, F e N) realizadas em diferentes isolados virais e comparações com sequências de nucleotídeos e aminoácidos disponíveis em bancos de dados (GenBank), sugerem o estabelecimento de nova sistemática de classificação genômica do vírus. Com relação à proteína G foram estabelecidos seis (I – VI) grupos genômicos distintos. Considerando as análises tendo como base as proteínas F e N foram descritos cinco (I – V) grupos genômicos (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). Esse estudo avaliando a evolução do BRSV evidenciou correlação entre a diversidade antigênica e os grupos genômicos, além disso, foi possível observar grande semelhança entre os grupos quanto à distribuição geográfica e temporal dos isolados de BRSV (Figura 4) (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

O subgrupo antigênico A apresentou grande correlação com o genogrupo III e o subgrupo B com o genogrupo I. O subgrupo intermediário AB apresentou correlação com quatro genogrupos distintos (II, IV, V e VI) (ELVANDER et al., 1998; VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

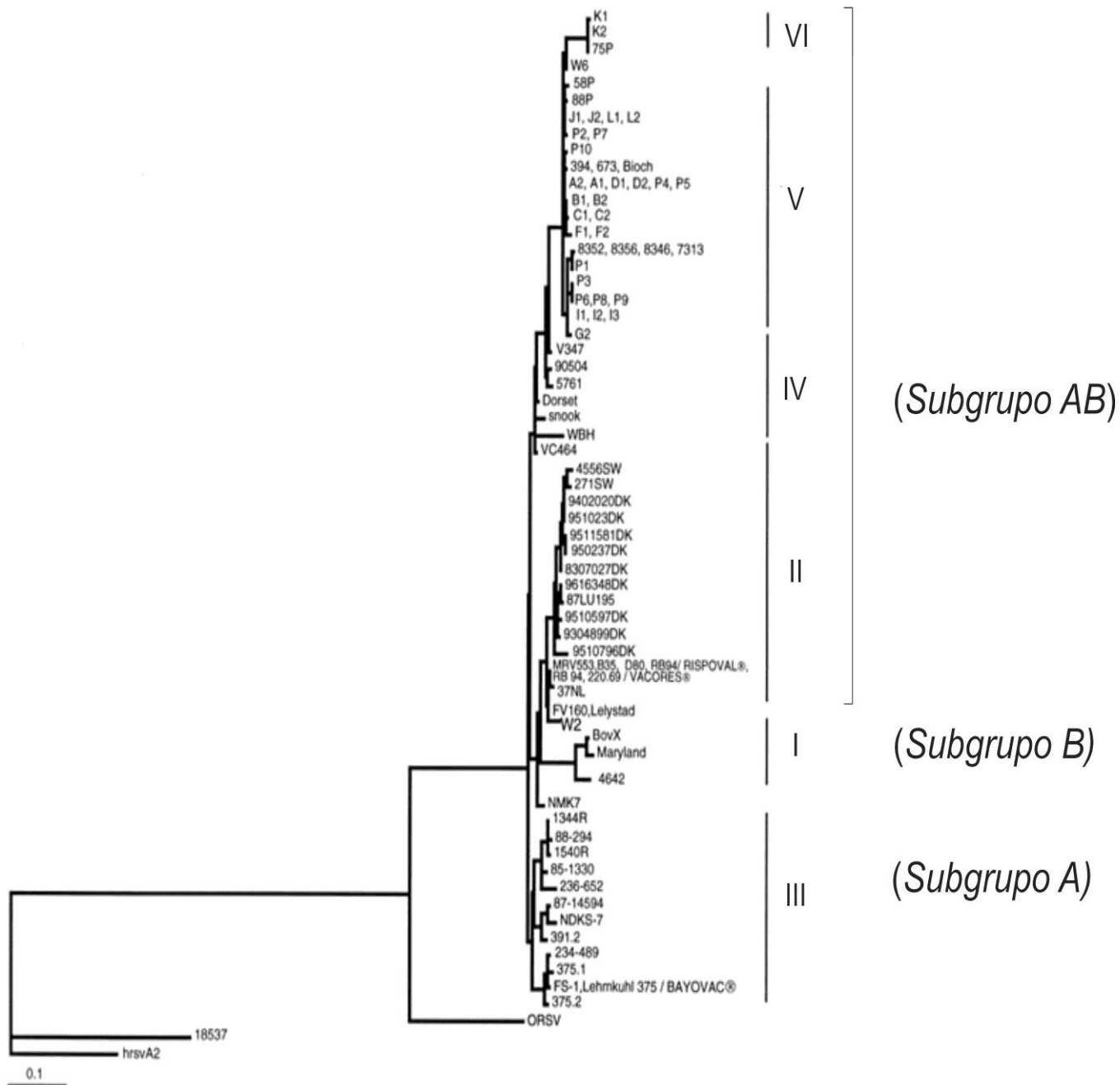
O subgrupo B foi isolado no Reino Unido, Suécia e nos EUA, mais especificamente em Maryland, na década de 1970 e, posteriormente, foi isolado no Brasil (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; ARNS et al., 2003). Os poucos isolados brasileiros já analisados foram classificados no subgrupo antigênico B, correlacionado com o genogrupo I (ARNS et al., 2003).

Alguns estudos analisaram o perfil antigênico da proteína G do BRSV, comparando isolados de diferentes regiões geográficas, e demonstraram que as cepas virais apresentam grande variabilidade genética intergrupos, podendo variar entre 85% a 100% (ELVANDER et al., 1998; VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

A partir de sequências de nucleotídeos depositadas em uma base pública de dados (GenBank) Valarcher; Schelcher; Bourhy (2000), analisaram a evolução e a epidemiologia molecular do BRSV. O estudo levou em consideração as sequências de nucleotídeos e aminoácidos para avaliar a variabilidade das proteínas N, F e G de 54 isolados da Europa e América do Norte. Os genes das proteínas N e F apresentaram menor taxa de

variabilidade genética (2%) em comparação com o gene da proteína G, que apresentou taxa de 8%. No entanto, a análise das sequências de acordo com a origem geográfica e época em que o isolamento foi realizado revelou que a variabilidade genética é ainda menor, observando maior similaridade entre as proteínas (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

Figura 4- Árvore filogenética realizada com sequências de nucleotídeo da proteína G para demonstrar os subgrupos antigênicos e os genogrupos do vírus respiratório sincicial bovino.



Fonte: Adaptada Valarcher; Schelcher; Bourhy, 2000.

A variabilidade genética entre cepas de BRSV isoladas de uma mesma região geográfica é baixa, em torno de 15%. Esse percentual é inferior ao observado no HRSV, no entanto, acredita-se que devido à pressão seletiva imposta pela vacinação dos rebanhos, que a evolução do BRSV seja contínua, promovendo o aumento da variabilidade genética em longo prazo (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

Após a análise das sequências de nucleotídeos de BRSV o genogrupo I agrupou as cepas europeias isoladas antes de 1976, uma cepa americana (Maryland) e também cepas brasileiras (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; SPILKI et al., 2006a). O genogrupo III apresentou cepas exclusivas dos EUA (SARMIENTO-SILVA; NAKAMURA-LOPEZ; VAUGHAN, 2012). No entanto, um estudo publicado em 2005 relatou a presença do genogrupo III circulando no território japonês (YAEGASHI et al., 2005). Os genogrupos II, IV, V e VI foram constituídos por cepas europeias isoladas na década de 70 a 90. Entretanto, as cepas virais da Suécia, Dinamarca e do norte da Europa foram agrupadas no genogrupo II; já as cepas da França, Bélgica e Holanda foram incluídas nos subgrupos II, IV, V e VI (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; VALENTOVA; ANTONIS; KOVARCIK, 2005; BIDOKHTI et al., 2012).

2.1.5 Epidemiologia

A infecção pelo BRSV está distribuída mundialmente, tendo sido descrita em rebanhos bovinos da Europa, África, Ásia e Américas, incluindo o Brasil (WOLDEMESKEL et al., 2000; ARNS et al., 2003; YAEGASHI et al., 2005; BIDOKHTI et al., 2012; KLEM; RIMSTAD; STOKSTAD, 2014). A prevalência pode variar entre 30 e 70% em regiões endêmicas ou em rebanhos com manejo sanitário adequado (VALARCHER; TAYLOR, 2007).

Estudos sorológicos realizados na Suécia identificaram que 40 a 100% dos animais são soropositivos para o vírus, no entanto, essas taxas variaram de acordo com a localização geográfica e o número de animais no rebanho (OHLSON et al., 2013; SACCO et al., 2014). Na Inglaterra e no País de Gales acredita-se que todos os bovinos já tenham sido expostos ao vírus (PATON et al., 1998; SACCO et al., 2014). Em 1990, um estudo realizado na África do Sul observou taxas de soroprevalência de 43% (VAN VUUREN, 1990). No Canadá e nos EUA a soroprevalência é alta e podem ser observados bezerros soropositivos ainda nos primeiros meses de vida (COLLINS et al., 1988; MARTIN et al., 1989; SACCO et al., 2014).

No Brasil, estudos sorológicos indicam a disseminação do vírus em grande parte do rebanho nacional, com taxas superiores a 90% de soroconversão (DOMINGUES et al., 2002; AFFONSO et al., 2014). Um estudo realizado em rebanhos do estado de São Paulo identificou taxas de soroprevalência que podem variar entre 40 a 85% (AFFONSO et al., 2011). Um estudo realizado com 864 amostras de soro provenientes de 65 rebanhos bovinos da região sul do país, utilizando as técnicas de vírus neutralização e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), detectou taxas de soropositividade de 68% e 75%, respectivamente (ARNS et al., 2003).

Os surtos da doença ocorrem geralmente durante o inverno, podendo também ser diagnosticados durante o outono, e esporadicamente, alguns casos podem ser observados no verão (BIDOKHTI et al., 2012; KLEM; RIMSTAD; STOKSTAD, 2014). A taxa de morbidade é elevada, podendo chegar a 80% em alguns relatos da doença, com taxas de mortalidade que chegam até 20% em alguns surtos (BIDOKHTI et al., 2012).

No Brasil, a primeira detecção do BRSV ocorreu em 1992, sendo descrito em 1993 (GONÇALVES et al., 1993). No entanto, a primeira caracterização molecular do vírus em nosso território ocorreu em 1995, a partir de amostras de secreção naso-traqueal de bezerros provenientes do Rio Grande do Sul, com sinais clínicos de afecção do sistema respiratório (ARNS et al., 2003). Nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste já foram relatados casos de infecção pelo BRSV, além de evidência sorológica da infecção através das técnicas de vírus neutralização e ELISA (DRIEMEIER et al., 1997; FLORES et al., 2000; PEIXOTO et al., 2000; AFFONSO et al., 2014).

2.1.6 Patogenia e sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados na infecção aguda pelo BRSV são anorexia, descargas nasais, tosse, apatia, taquipneia e dispneia (SACCO et al., 2014), podendo evoluir para infecções bacterianas secundárias ou para infecções sinérgicas com outros vírus envolvidos no CDRB (STOTT et al., 1980; ELVANDER, 1996; APLEY, 2006). Os vírus como agentes primários lesionam a estrutura do epitélio do sistema respiratório em diferentes níveis. A ação do vírus sobre a mucosa interfere na imunidade local, causando alteração na liberação de citocinas, indução de apoptose de linfócitos e interferência na função de macrófagos, o que leva à imunossupressão (SHARMA; WOLDEHIWET, 1990; VIUFF et al., 2002). As lesões epiteliais, juntamente com a imunossupressão, favorecem a proliferação de

agentes secundários no trato respiratório superior e inferior (SRIKUMARAN; KELLING; AMBAGALA, 2007; KLIMA et al., 2014).

O sistema imune inato presente no trato respiratório pode ser representado pela superfície do epitélio onde são encontrados vários mecanismos de defesa, como barreiras físicas, químicas e microbiológicas, na tentativa de proteger as vias respiratórias da ação dos patógenos. Quando infectada a superfície pulmonar aumenta a produção de muco com o intuito de impedir a aderência, proliferação e colonização das bactérias. Ao mesmo tempo, os cílios da traqueia realizam movimentos constantes com o objetivo de expelir o muco contaminado (GAGEA et al., 2006; SRIKUMARAN; KELLING; AMBAGALA, 2007). Após a infecção primária ocorre a perda de cílios, podendo também evoluir para necrose dos epitélios. Com isso, ocorre acúmulo de muco e debris celulares na superfície epitelial, nas vias respiratórias e nos alvéolos. Ocorrem também alterações no mecanismo de limpeza mucociliar, tornando o ambiente propício para a proliferação de micro-organismos (KLIMA et al., 2014).

O BRSV se multiplica em células ciliadas do sistema respiratório e em pneumócitos tipo II, gerando desequilíbrio no sistema imune do hospedeiro e intensa resposta imune com células auxiliaadoras do tipo (Th2) (GERSHWIN et al., 2005). A exacerbação da resposta imune aumenta a secreção de citocinas resultando em grave bronquiolite, que é um quadro clínico característico da infecção pelo BRSV (VERHOEFF; VAN DER BAN; VAN NIEUWSTADT, 1984; WOOLUMS et al., 1999; SACCO et al., 2014).

Macroscopicamente os principais achados que podem ser observados em infecções mistas ou singulares pelo BRSV são pneumonia intersticial multifocal, enfisema alveolar disseminado com focos de atelectasia, enfisema intersticial de grau moderado e o espessamento dos septos interlobulares (VIUFF et al., 2002). Na histopatologia pode ser observada a presença de sincícios, localizados principalmente nos bordos dos lóbulos pulmonares, alvéolos e bronquíolos. Também é possível observar alterações inflamatórias mononucleares com áreas focais de infiltrado eosinofílico, além de achados característicos como bronquite, peribronquite e bronquiolite (LARSEN; TJORNEHOJ; VIUFF, 2000; VIUFF et al., 2002; SACCO et al., 2014).

Os sinais clínicos são mais intensos em bezerros, o que pode ser explicado pelo grau de imunidade específica, geralmente maior em animais adultos. Devido à presença de anticorpos maternos adquiridos pela ingestão do colostro, os bezerros com idade inferior a um mês de vida geralmente apresentam a forma branda da doença. Apesar do colostro não

determinar proteção eficiente ao bezerro, os anticorpos passivos são importantes na redução da gravidade da doença (GERSHWIN, 2012; ELLIS et al., 2013).

2.1.7 Imunidade

Quando o BRSV entra em contato com o epitélio do trato respiratório, as proteínas F e G iniciam a resposta imune adaptativa, com indução de anticorpos do tipo neutralizantes, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (GERSHWIN, 2012). Os bezerros infectados com o BRSV e que apresentam quadros agudos e graves da infecção exibem grande exacerbação na expressão de interleucinas (GUZMAN; TAYLOR, 2015).

No início da resposta imune é possível observar aumento nos títulos de IgG e de IgA, principalmente nas secreções respiratórias. Entretanto, alguns bezerros apresentam anticorpos IgE contra as proteínas virais, fato observado em quadros graves da doença (GERSHWIN et al., 2011; GERSHWIN, 2012).

A imunidade adquirida pelo colostro é parcial e, sendo assim, bezerros lactentes que possuem anticorpos maternos contra o BRSV podem ser acometidos pela doença (GERSHWIN, 2012). Alguns fatores, como o tropismo do vírus por células do trato respiratório e o sistema imune imaturo dos animais jovens favorecem o estabelecimento da infecção (ELLIS et al., 2013; GUZMAN; TAYLOR, 2015). Devido às constantes exposições ao BRSV e à aquisição de imunidade específica as reinfecções podem ser frequentes, entretanto, nesses casos, a doença clínica é mais branda (VALARCHER; TAYLOR, 2007).

2.1.8 Diagnóstico

O diagnóstico precoce de infecção respiratória em rebanhos bovinos é extremamente importante para evitar a disseminação do agente e garantir boas taxas de sucesso no tratamento (APLEY, 2006).

As técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase são bastante utilizadas para a identificação do antígeno viral, principalmente em amostras biológicas constituídas por cortes histológicos de pulmão. Além disso, essas técnicas também são eficientes para diagnosticar a presença do vírus em amostras de lavado broncoalveolar (FLORES et al., 2000).

O diagnóstico a partir de provas sorológicas, como a vírus neutralização e o ELISA para a detecção de anticorpos tem sido amplamente empregado, principalmente para

identificar e estudar a soroprevalência do BRSV no rebanho e/ou região. A sorologia do rebanho também é uma boa alternativa para avaliar a resposta vacinal, todavia, essa prática apresenta limitação em casos de surtos, uma vez que exige mais de uma coleta (sorologia pareada), o que torna o diagnóstico laborioso, demorado e com maior custo (HAGGLUND et al., 2006; FULTON; CONFER, 2012).

O isolamento viral é considerado a prova de ouro, estabelecendo o agente etiológico envolvido no quadro respiratório e, até mesmo, como ele interage com hospedeiro, no entanto a fragilidade do BRSV torna o isolamento muito difícil (SANTANGELO et al., 2006; GORIS et al., 2009). O isolamento do BRSV tem sido pouco empregado como técnica de diagnóstico devido à sua dificuldade e tempo exigido, isso se deve principalmente porque as linhagens celulares apresentam poucos receptores para a adsorção viral. Dentre as linhagens celulares, já foi observado a multiplicação do vírus em células da linhagem finita de corneto bovino (BT), células rim bovino (MDBK), células renais de macaco verde africano (VERO), linhagem de células de rim de bovino resistente ao BVDV (CRIB), linhagem de célula de embrião de galinha (CER) e linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano (HEP) (DRIEMEIER et al., 1997; SPILKI et al., 2006b; RAVIOLO et al., 2009) Para o isolamento do vírus também é importante que as amostras biológicas contenham alta concentração viral e que sejam realizadas inúmeras passagens em cultivo celular até que o vírus apresente efeito citopático (ARNS et al., 2003; GORIS et al., 2009)

A utilização de técnicas para a detecção do RNA viral como a amplificação parcial do gene da proteína G possibilita o diagnóstico em poucas horas (KLEM; RIMSTAD; STOKSTAD, 2014). Técnicas moleculares de diagnóstico do BRSV demonstram alta sensibilidade e especificidade, sendo a *nested*-PCR dez vezes mais sensível que a RT-PCR, proporcionando alta confiabilidade ao diagnóstico (VILCEK et al., 1994). Apesar de permitir o diagnóstico rápido e precoce as metodologias moleculares são técnicas mais onerosas e exigem laboratórios com infraestrutura adequada, sendo mais utilizadas em estudos de análises filogenéticas do vírus (FULTON; CONFER, 2012).

2.1.9 Prevenção e controle

A prevenção de doenças respiratórias deve ser iniciada com a inserção de práticas adequadas de manejo sanitário e nutricional no rebanho. As fontes de infecção devem ser minimizadas e implementação de medidas de biossegurança. O controle da entrada de

novos animais no rebanho, principalmente animais provenientes de rebanhos distintos e de diferentes regiões geográficas, deve ser rigoroso (GORDEN; PLUMMER, 2010).

O desenvolvimento de vacinas para o controle da infecção pelo BRSV ainda é considerado um grande desafio. A imunidade conferida contra a infecção natural é de curta duração, o que coloca em dúvida a duração da proteção conferida pela vacina (LARSEN; TEGTMEIER; PEDERSEN, 2001). Outra questão é a proteção vacinal contra os diferentes subgrupos de BRSV circulantes (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000), uma vez que a eficácia da imunidade sorológica cruzada não é garantida (LARSEN, 2000). As vacinas são produzidas principalmente nos EUA, a partir de isolados de subgrupos A e AB, que são os mais comuns naquele país (SPILKI et al., 2006a).

As vacinas empregadas no controle do BRSV podem ser vivas atenuadas ou inativadas (VALARCHER; TAYLOR, 2007). As vacinas vivas atenuadas mostraram-se mais eficazes, entretanto, os estudos realizados demonstraram níveis de proteções vacinais diferentes (TAYLOR et al., 1984; GERSHWIN et al., 1998). O principal problema das vacinas inativadas é conseguir alcançar um equilíbrio entre a resposta imune ideal para conferir proteção ao animal contra os efeitos clínicos da infecção, além de conseguir um adjuvante ideal para garantir uma resposta imune tanto humoral como celular apropriada e equilibrada depois que linfócitos reconhecerem o antígeno específico, conferindo maior eficiência e segurança (ELLIS et al., 1992; ELLIS et al., 2001; ELLIS et al., 2005; SPILKI; ALMEIDA; ARNS, 2010). No Brasil, a vacinação para as doenças do complexo respiratório, ainda é uma prática pouco utilizada nos rebanhos, entretanto quando realizada, geralmente é com vírus inativado e combinado com outros vírus e bactérias envolvidas no complexo (SPILKI et al., 2006a; SPILKI; ALMEIDA; ARNS, 2010).

Os agentes infecciosos e os genótipos e sorótipos empregados na formulação de vacinas visam atender as necessidades dos problemas respiratórios do país de origem. Com isso, ressalta-se a importância da realização de estudos de caracterização do gene que codifica a proteína G do BRSV, sendo essa a região genômica mais importante para a classificação do vírus e avaliação do subgrupo mais frequente no rebanho bovino nacional (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; SPILKI et al., 2006a). Mutações em regiões imunodominantes da proteína G foram recentemente observadas em isolados virais provenientes de países onde a vacinação é amplamente utilizada, podendo acarretar em falha ou interferência no nível de proteção conferida (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; HAGGLUND et al., 2014).

Considerando a variabilidade genética do BRSV é notável a necessidade de estudos moleculares e epidemiológicos no Brasil para avaliar as implicações práticas dessa diversidade, tanto com relação à patogenicidade das cepas virais quanto nos aspectos imunoproliféricos da infecção. Alterações na proteína G do BRSV podem até conferir proteção imunológica cruzada em animais infectados com cepas heterólogas, entretanto não se pode confirmar o grau de proteção, amplitude e duração da imunidade conferida pelos diferentes subgrupos. Identificar e caracterizar os subgrupos antigênicos circulantes nos rebanhos bovinos leiteiros e de corte brasileiros é de fundamental importância para a adoção de estratégias eficazes no controle e profilaxia de doença respiratória, além de minimizar os prejuízos econômicos ao pecuarista. São necessários e urgentes estudos focados na diversidade antigênica do gene que codifica a proteína G e a sua correlação com as cepas virais presentes nas vacinas comercializadas no mercado nacional que, atualmente, são formuladas com cepas virais do sorogrupo A. Somente com o conhecimento da epidemiologia da infecção e das relações antigênicas e moleculares das cepas virais circulantes em uma região e/ou país é possível a implementação e, principalmente, a avaliação da eficiência de programas imunoproliféricos contra a infecção pelo BRSV em rebanhos bovinos brasileiros com aptidão tanto para produção de carne quanto de leite.

3. REFERÊNCIAS

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Exportações de Carne Bovina do Brasil - Brazilian Beef Exports. p. Comparativo com os dois últimos anos; Participação por categoria; Participação por país; Janeiro a Dezembro de 2015, 2015a. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br/download/relatorio-anual-2015.pdf> >. Acesso em: 20-01-2016.
- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Balanço da Pecuária no ano de 2014. 2015b. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8> >. Acesso em: 19-01-2016.
- 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. 215-228, 2010.
- AFFONSO, I.B.; SOUZA, A.; MARTINI, M.C.; DOS SANTOS, M.M.A.B.; SPILKI, F.R.; ARNS, C.W.; SAMARA, S.I. Detection of an untyped strain of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2539-2550, 2014.
- 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.; CAMPALANS, J.; COSTA, S.; DOMINGUES, H.; D'ARCE, R.; ALMEIDA, R.; COSWIG, L. Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 213-218, 2003.
- ARSLANAGIC, E.; MATSUMOTO, M.; SUZUKI, K.; NEROME, K.; TSUTSUMI, H.; HUNG, T. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm. **Acta Virologica**, v. 40, n. 4, p. 209-214, 1996.
- BIDOKHTI, M.R.; TRAVEN, M.; OHLSON, A.; ZARNEGAR, B.; BAULE, C.; BELAK, S.; ALENIUS, S.; LIU, L. Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds. **Archives of Virology**, v. 157, n. 4, p. 601-607, 2012.
- BORCHERS, A.T.; CHANG, C.; GERSHWIN, M.E.; GERSHWIN, L.J. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 45, n. 3, p. 331-379, 2013.
- BUCHHOLZ, U.J.; FINKE, S.; CONZELMANN, K.K. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 251-259, 1999.
- COLLINS, J.K.; TEEGARDEN, R.M.; MACVEAN, D.W.; SALMAN; SMITH, G.H.; FRANK, G.R. Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 8, p. 1316-1319, 1988.

DELAUNOIS, L. Anatomy and physiology of collateral respiratory pathways. **The European Respiratory Journal**, v. 2, n. 9, p. 893-904, 1989.

DOMINGUES, H.G.; CAMPALANS, J.; ALMEIDA, R.S.; COSWIG, L.T.; ARNS, C.W. Dot-enzyme linked immunosorbent assay as an alternative technique for the detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antibodies. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 397-404, 2002.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M.J.P.; MOOJEN, V.; ARNS, C.W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U.M.D. Clinic-pathological aspects in the natural infection of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRVS) in extensive management of cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 77-81, 1997.

EASTON, A.J.; DOMACHOWSKIE, J.B.; ROSENBERG, H.F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 390-412, 2004.

ELLIS, J.A.; GOW, S.P.; MAHAN, S.; LEYH, R. Duration of immunity to experimental infection with bovine respiratory syncytial virus following intranasal vaccination of young passively immune calves. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 243, n. 11, p. 1602-1608, 2013.

ELVANDER, M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. **The Veterinary Record**, v. 138, n. 5, p. 101-105, 1996.

ELVANDER, M.; VILCEK, S.; BAULE, C.; UTTENTHAL, A.; BALLAGI-PORDANY, A.; BELAK, S. Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. **The Journal of General Virology**, v. 79 (Pt 12), p. 2939-2946, 1998.

FELDMAN, S.A.; AUDET, S.; BEELER, J.A. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. **Journal of Virology**, v. 74, n. 14, p. 6442-6447, 2000.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; MEDEIROS, M.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; DRIEMEIER, D.; SCHUCH, L.F.; MORAES, M. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 139-143, 2000.

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. La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 53, n. 7, p. 754-761, 2012.

FURZE, J.; WERTZ, G.; LERCH, R.; TAYLOR, G. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology**, v. 75 (Pt 2), p. 363-370, 1994.

FURZE, J.; ROBERTS, S.; WERTZ, G.; TAYLOR, G. Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity. **Virology**, v. 231, n. 1, p. 48-58, 1997.

GAGEA, M.I.; BATEMAN, K.G.; VAN DREUMEL, T.; MCEWEN, B.J.; CARMAN, S.; ARCHAMBAULT, M.; SHANAHAN, R.A.; CASWELL, J.L. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 1, p. 18-28, 2006.

GERSHWIN, L.J.; SCHELEGLE, E.S.; GUNTHER, R.A.; ANDERSON, M.L.; WOOLUMS, A.R.; LAROCHELLE, D.R.; BOYLE, G.A.; FRIEBERTSHAUSER, K.E.; SINGER, R.S. A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. **Vaccine**, v. 16, n. 11-12, p. 1225-1236, 1998.

GERSHWIN, L.J.; BERGHAUS, L.J.; ARNOLD, K.; ANDERSON, M.L.; CORBEIL, L.B. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 1-2, p. 119-130, 2005.

GERSHWIN, L.J. Bovine respiratory syncytial virus infection: immunopathogenic mechanisms. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 02, p. 207-213, 2007.

GERSHWIN, L.J.; ANDERSON, M.L.; WANG, C.; BERGHAUS, L.J.; KENNY, T.P.; GUNTHER, R.A. Assessment of IgE response and cytokine gene expression in pulmonary efferent lymph collected after ovalbumin inhalation during experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 1, p. 134-145, 2011.

GERSHWIN, L.J. Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 253-257, 2012.

GERSHWIN, L.J.; VAN EENENNAAM, A.L.; ANDERSON, M.L.; MCELIGOT, H.A.; SHAO, M.X.; TOAFF-ROSENSTEIN, R.; TAYLOR, J.F.; NEIBERGS, H.L.; WOMACK, J. Single Pathogen Challenge with Agents of the Bovine Respiratory Disease Complex. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142479, 2015.

GONÇALVES, I.P.D.; SIMANKE, A.T.; JOST, H.C.; HÔTZEL, I.; SOGLIO, A.D.; MOOJEN, V. DETECTION OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN CALVES OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL. **Ciência Rural**, v. 23, p. 389-390, 1993.

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. 243-259, 2010.

GORIS, K.; UHLENBRUCK, S.; SCHWEGMANN-WESSELS, C.; KOHL, W.; NIEDORF, F.; STERN, M.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; BALS, R.; TAYLOR, G.; BRAUN, A.; BICKER, G.; KIETZMANN, M.; HERRLER, G. Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. **Journal of Virology**, v. 83, n. 4, p. 1962-1968, 2009.

GRISSETT, G.P.; WHITE, B.J.; LARSON, R.L. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 770-780, 2015.

GUZMAN, E.; TAYLOR, G. Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves. **Molecular Immunology**, v. 66, n. 1, p. 48-56, 2015.

HAGGLUND, S.; SVENSSON, C.; EMANUELSON, U.; VALARCHER, J.F.; ALENIUS, S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 2, p. 320-328, 2006.

HAGGLUND, S.; HU, K.; BLODORN, K.; MAKABI-PANZU, B.; GAILLARD, A.L.; ELLENCRONA, K.; CHEVRET, D.; HELLMAN, L.; BENGTSSON, K.L.; RIFFAULT, S.; TAYLOR, G.; VALARCHER, J.F.; ELEOUE, J.F. Characterization of an experimental vaccine for bovine respiratory syncytial virus. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 21, n. 7, p. 997-1004, 2014.

HENGST, U.; KIEFER, P. Domains of human respiratory syncytial virus P protein essential for homodimerization and for binding to N and NS1 protein. **Virus Genes**, v. 20, n. 3, p. 221-225, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. 2014. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf >. Acesso em: 11-11-2015.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses - Virus Taxonomy: 2014 Release. 2016. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> >. Acesso em: 15-01-2016.

KARGER, A.; SCHMIDT, U.; BUCHHOLZ, U.J. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. **The Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 3, p. 631-640, 2001.

KHATTAR, S.K.; YUNUS, A.S.; COLLINS, P.L.; SAMAL, S.K. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein. **Virology**, v. 285, n. 2, p. 253-269, 2001.

KIRSCHVINK, N. Respiratory function in cattle: impact of breed, heritability and external factors. **DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 115, n. 7, p. 265-270, 2008.

KLEM, T.B.; RIMSTAD, E.; STOKSTAD, M. Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 15, 2014.

KLIMA, C.L.; ZAHEER, R.; COOK, S.R.; BOOKER, C.W.; HENDRICK, S.; ALEXANDER, T.W.; MCALLISTER, T.A. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 438-448, 2014.

KONIG, P.; GIESOW, K.; SCHULDT, K.; BUCHHOLZ, U.J.; KEIL, G.M. A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV): modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. **The Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 7, p. 1815-1824, 2004.

- KUO, L.; FEARNES, R.; COLLINS, P.L. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 4944-4953, 1997.
- LANGEDIJK, J.P.; MELOEN, R.H.; TAYLOR, G.; FURZE, J.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 5, p. 4055-4061, 1997.
- LANGEDIJK, J.P.; DE GROOT, B.L.; BERENDSEN, H.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor. **Virology**, v. 243, n. 2, p. 293-302, 1998.
- LARSEN, L.E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 41, n. 1, p. 1-24, 2000.
- LARSEN, L.E.; TJORNEHOJ, K.; VIUFF, B. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4222-4227, 2000.
- LARSEN, L.E.; TEGTMEIER, C.; PEDERSEN, E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 1, p. 113-121, 2001.
- LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P.R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology**, v. 68 (Pt 9), p. 2521-2524, 1987.
- MALLIPEDDI, S.K.; SAMAL, S.K. Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology**, v. 74 (Pt 9), p. 2001-2004, 1993.
- MALLIPEDDI, S.K.; LUPIANI, B.; SAMAL, S.K. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system. **The Journal of General Virology**, v. 77 (Pt 5), p. 1019-1023, 1996.
- MARTIN, S.W.; BATEMAN, K.G.; SHEWEN, P.E.; ROSENDAL, S.; BOHAC, J.E. The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire**, v. 53, n. 3, p. 355-362, 1989.
- MOUSSA, A. Assembly of enveloped respiratory syncytial virus particles within the cytoplasm of infected Vero cells. **Archives of Virology**, v. 134, n. 1-2, p. 205-211, 1994.
- OHLSON, A.; ALENIUS, S.; TRAVEN, M.; EMANUELSON, U. A longitudinal study of the dynamics of bovine corona virus and respiratory syncytial virus infections in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 395-400, 2013.
- OUMOUNA, M.; MAPLETOFT, J.W.; KARVONEN, B.C.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Formulation with CpG oligodeoxynucleotides prevents induction of pulmonary immunopathology following priming with formalin-inactivated or commercial killed bovine respiratory syncytial virus vaccine. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2024-2032, 2005.

- PACCAUD, M.F.; JACQUIER, C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung**, v. 30, n. 4, p. 327-342, 1970.
- PANCIERA, R.J.; CONFER, A.W. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 191-214, 2010.
- PASTEY, M.K.; SAMAL, S.K. Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein. **Virus Research**, v. 29, n. 2, p. 195-202, 1993.
- PATON, D.J.; CHRISTIANSEN, K.H.; ALENIUS, S.; CRANWELL, M.P.; PRITCHARD, G.C.; DREW, T.W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **The Veterinary Record**, v. 142, n. 15, p. 385-391, 1998.
- PEIXOTO, P.V.; MOTA, R.A.; BRITO, M.F.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; DE SOUZA, M.I. Infecção natural pelo Vírus Sincicial R Infecção natural pelo Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) espiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 171-175, 2000.
- RIFFAULT, S.; DUBUQUOY, C.; CASTAGNE, N.; BARANOWSKI, E.; CHARLEY, B.; ELEOUE, J.F. Replication of bovine respiratory syncytial virus in murine cells depends on type I interferon-receptor functionality. **The Journal of General Virology**, v. 87, n. Pt 8, p. 2145-2148, 2006.
- 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. 427-436, 2014.
- SAMAL, S.K.; ZAMORA, M. Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology**, v. 72 (Pt 7), p. 1715-1720, 1991.
- SANTANGELO, P.; NITIN, N.; LACONTE, L.; WOOLUMS, A.; BAO, G. Live-cell characterization and analysis of a clinical isolate of bovine respiratory syncytial virus, using molecular beacons. **Journal of Virology**, v. 80, n. 2, p. 682-688, 2006.
- SARMIENTO-SILVA, R.E.; NAKAMURA-LOPEZ, Y.; VAUGHAN, G. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3452-3467, 2012.
- SCHLENDER, J.; BOSSERT, B.; BUCHHOLZ, U.; CONZELMANN, K.K. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8234-8242, 2000.
- SCHLENDER, J.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; CONZELMANN, K.K. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4609-4616, 2003.
- SCHRIJVER, R.S.; DAUS, F.; KRAMPS, J.A.; LANGEDIJK, J.P.; BUIJS, R.; MIDDEL, W.G.; TAYLOR, G.; FURZE, J.; HUYBEN, M.W.; VAN OIRSCHOT, J.T. Subgrouping of

bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 3-4, p. 253-260, 1996.

SHARMA, R.; WOLDEHIWET, Z. Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. **Veterinary Microbiology**, v. 23, n. 1-4, p. 267-272, 1990.

SISCHO, W.M.; HIRD, D.W.; GARDNER, I.A.; UTTERBACK, W.W.; CHRISTIANSEN, K.H.; CARPENTER, T.E.; DANAYE-ELMI, C.; HERON, B.R. Economics of disease occurrence and prevention on California dairy farms: a report and evaluation of data collected for the national animal health monitoring system, 1986-87. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, n. 2, p. 141-156, 1990.

SNOWDER, G.D.; VAN VLECK, L.D.; CUNDIFF, L.V.; BENNETT, G.L. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 1999-2008, 2006.

SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; DOMINGUES, H.G.; D'ARCE, R.C.; FERREIRA, H.L.; CAMPALANS, J.; COSTA, S.C.; 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. 30-37, 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. 215-229, 2007.

STOTT, E.J.; THOMAS, L.H.; COLLINS, A.P.; CROUCH, S.; JEBBETT, J.; SMITH, G.S.; LUTHER, P.D.; CASWELL, R. A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. **The Journal of Hygiene**, v. 85, n. 2, p. 257-270, 1980.

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.

TAYLOR, G.; STOTT, E.J.; FURZE, J.; FORD, J.; SOPP, P. Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. **The Journal of General Virology**, v. 73 (Pt 9), p. 2217-2223, 1992.

TAYLOR, G.; THOMAS, L.H.; FURZE, J.M.; COOK, R.S.; WYLD, S.G.; LERCH, R.; HARDY, R.; WERTZ, G.W. Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. **The Journal of General Virology**, v. 78 (Pt 12), p. 3195-3206, 1997.

TENG, M.N.; COLLINS, P.L. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. **Journal of Virology**, v. 72, n. 7, p. 5707-5716, 1998.

TRUDEL, M.; NADON, F.; SIMARD, C.; BELANGER, F.; ALAIN, R.; SEGUIN, C.; LUSSIER, G. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. **Archives of Virology**, v. 107, n. 1-2, p. 141-149, 1989.

VALARCHER, J.F.; SCHELCHER, F.; BOURHY, H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 22, p. 10714-10728, 2000.

VALARCHER, J.F.; FURZE, J.; WYLD, S.; COOK, R.; CONZELMANN, K.K.; TAYLOR, G. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8426-8439, 2003.

VALARCHER, J.F.; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 153-180, 2007.

VALENTOVA, V.; ANTONIS, A.F.; KOVARCIK, K. Restriction enzyme analysis of RT-PCR amplicons as a rapid method for detection of genetic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 1-2, p. 1-12, 2005.

VAN DER POEL, W.H.; BRAND, A.; KRAMP, J.A.; VAN OIRSCHOT, J.T. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. **The Journal of Infection**, v. 29, n. 2, p. 215-228, 1994.

VAN VUUREN, M. Serological studies of bovine respiratory syncytial virus in feedlot cattle in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 61, n. 4, p. 168-169, 1990.

VERHOEFF, J.; VAN DER BAN, M.; VAN NIEUWSTADT, A.P. Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings. **The Veterinary Record**, v. 114, n. 1, p. 9-12, 1984.

VILCEK, S.; ELVANDER, M.; BALLAGI-PORDANY, A.; BELAK, S. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2225-2231, 1994.

VIUFF, B.; TJORNEHOJ, K.; LARSEN, L.E.; RONTVED, C.M.; UTTENTHAL, A.; RONSHOLT, L.; ALEXANDERSEN, S. Replication and clearance of respiratory syncytial virus: apoptosis is an important pathway of virus clearance after experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 2195-2207, 2002.

WESTOVER, K.M.; HUGHES, A.L. Molecular evolution of viral fusion and matrix protein genes and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 128-134, 2001.

WOLDEMESKEL, M.; KEBEDE, E.; YIGEZU, L.; POTGIETER, L.N. Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from Ethiopia. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift** v. 107, n. 11, p. 464-466, 2000.

WOOLUMS, A.R.; ANDERSON, M.L.; GUNTHER, R.A.; SCHELEGLE, E.S.; LAROCHELLE, D.R.; SINGER, R.S.; BOYLE, G.A.; FRIEBERTSHAUSER, K.E.; GERSHWIN, L.J. Evaluation of severe disease induced by aerosol inoculation of calves with bovine respiratory syncytial virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 473-480, 1999.

YAEGASHI, G.; SEIMIYA, Y.M.; SEKI, Y.; TSUNEMITSU, H. Genetic and antigenic analyses of bovine respiratory syncytial virus detected in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 67, n. 2, p. 145-150, 2005.

YUNUS, A.S.; COLLINS, P.L.; SAMAL, S.K. Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication. **The Journal of General Virology**, v. 79 (Pt 9), p. 2231-2238, 1998.

YUNUS, A.S.; KHATTAR, S.K.; COLLINS, P.L.; SAMAL, S.K. Rescue of bovine respiratory syncytial virus from cloned cDNA: entire genome sequence of BRSV strain A51908. **Virus Genes**, v. 23, n. 2, p. 157-164, 2001.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a caracterização molecular parcial de cepas brasileiras do BRSV identificadas em rebanhos bovinos de corte e leite apresentando infecção respiratória aguda, provenientes do estado do Paraná.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar por meio da técnica de *nested*-PCR, um fragmento com 371 pb do gene da proteína G de sete cepas de BRSV e sequenciar os *amplicons* do gene da proteína G de cepas de BRSV amplificadas pela *nested*-PCR;
- Realizar análises filogenéticas comparativas entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene da proteína G presente em sete cepas brasileiras de BRSV e de cepas disponíveis em bases públicas de dados (GenBank), incluindo as cepas de referência utilizadas em vacinas contra o BRSV;
- Determinar os genogrupos das cepas de BRSV identificadas em quadro clínico respiratório agudo em bezerros e animais adultos provenientes de rebanhos de corte e leite.

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA PROTEÍNA G DE CEPAS BRASILEIRAS DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO

MOLECULAR ANALYSIS OF G PROTEIN GENE OF BRAZILIAN WILD-TYPE STRAINS OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

RESUMO

O vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) é um dos principais agentes etiológicos envolvidos em doenças respiratórias de bovinos ocasionando grandes perdas econômicas para a pecuária, devido às altas taxas de morbidade em bezerros de rebanhos leiteiros e em bovinos confinados. A proteína G do BRSV é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e induz anticorpos neutralizantes, por isso, o gene da proteína G é amplamente utilizado em análises epidemiológicas e filogenéticas de cepas de BRSV. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de cepas de BRSV identificadas em infecções respiratórias em bezerras leiteiras e em bovinos de corte em confinamento. O estudo foi realizado com sete cepas de BRSV, selecionadas aleatoriamente a partir de uma coleção de amostras biológicas (swabs nasais), provenientes de rebanhos do estado do Paraná, previamente avaliadas quanto à presença do genoma do BRSV e de outros agentes patogênicos (bactérias e vírus) do trato respiratório superior de bovinos. As sete cepas incluídas neste estudo foram identificadas em infecções singulares por BRSV, sendo três cepas provenientes de um surto de doença respiratória aguda em animais de uma unidade de criação de bezerras leiteiras e quatro cepas provenientes de surtos de doença respiratória em bovinos de três confinamentos. As análises filogenéticas realizadas por meio do sequenciamento de nucleotídeos de produtos com 371 pb do gene da proteína G amplificado pela técnica de nested-PCR, revelaram que as sete cepas de BRSV incluídas neste estudo pertenciam ao genogrupo III, sendo esta a primeira descrição desse genogrupo em bovinos no Brasil. Adicionalmente, cinco cepas analisadas demonstraram mutações na região imunodominante da proteína G. Este estudo acrescenta novas informações sobre as características moleculares de cepas BRSV que circulam em rebanhos bovinos brasileiros bem como pode contribuir para a adoção de medidas imunoproláticas mais eficazes para o controle das infecções pelo BRSV no Brasil.

Palavras-chave: Bovino. Doença respiratória bovina. BRSV. Proteína G. Genogrupos.

ABSTRACT

The bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is considered a major etiologic agent involved in bovine respiratory diseases, which causes great economic losses to livestock, due to high rates of morbidity in dairy calves and feedlot animals. The BRSV G protein is responsible for binding the virus to the host cells and induces neutralizing antibodies. Hence, the G protein gene is the most widely used in the phylogenetic analysis of BRSV strains. The aim of this study was to perform molecular characterization of the BRSV strains identified in bovine respiratory infection in dairy calves and beef feedlot. The study was performed in seven BRSV strains, randomly selected from a collection of biological samples (nasal swabs), from herds located in Paraná state, Brazil, previously evaluated for the presence of the genome of BRSV and other pathogens (bacteria and virus) of upper respiratory tract of cattle. The seven strains included in this study were identified in single infections for BRSV, of which three strains were from an outbreak of acute respiratory distress in dairy calves of a calf unit and the other four strains were from bovine respiratory disease outbreaks in steers of three feedlots. Phylogenetic analyzes performed by nucleotide sequencing of products with 371 bp of the G protein gene amplified by nested-PCR, have revealed that the seven BRSV strains included in this study belong to the genogroup III, this being the first description of this genogroup in cattle in Brazil. Additionally, five BRSV strains analyzed demonstrated mutations located in the immunodominant region of G protein. This study adds new information about the molecular characteristics of BRSV strains circulating in Brazilian cattle and can contribute to the adoption of more effective immunoprophylactic measures for the control of BRSV infections in Brazil.

Key words: Cattle. Bovine respiratory disease. BRSV. Protein G. Genogroups.

5.1 Introduction

The beef and dairy cattle production is highly important for the agribusiness and the Brazilian economy. Among the different factors involved in cattle production, Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) has major health and economic importance in calf production systems and in fattening cattle in feedlots due to additional costs with morbidity, prevention, treatment, and replacement of animals (SNOWDER et al., 2006; PANCIERA; CONFER, 2010). The *Bovine respiratory syncytial virus* (BRSV) is considered one of the main pathogens responsible for severe disease of the lower respiratory tract in cattle (VAN DER POEL et al., 1994). The infection is frequently characterized by interstitial pneumonia and bronchiolitis, mainly in cattle up to three years old, in which clinical signs were generally acute (FURZE et al., 1997; GERSHWIN, 2007; SACCO et al., 2014).

The BRSV is a member of *Paramyxoviridae* family, *Pneumovirinae* subfamily, *Pneumovirus* genus. The genome consists of single-stranded, negative-sense, linear RNA, that encodes 11 virus proteins (COLLINS; CHANOCK; MURPHY, 2001). The attachment (G) and fusion (F) envelope proteins play an important role in the induction of neutralizing antibodies against BRSV infection (LEVINE; KLAIBER-FRANCO; PARADISO, 1987; TAYLOR et al., 1992).

The protein G composes the most external viral layer and their immunodominant region is responsible for activating the immune response against both, BRSV and *Human respiratory syncytial virus* (HRSV). This region is a highly conserved hydrophobic central region, composed of 32 amino acid (aa) residues, constituted of four cysteines forming two disulfides bridges between them (DORELEIJERS et al., 1996). According to the BRSV strain, the G protein can present replacement of one or more cysteine or alanine for asparagine, which may compromise the reactivity of the antigenic determinant (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; SPILKI et al., 2006a). Due its higher genetic variation, this protein is often used for the analyses of evolutionary relationship of the BRSV sequences available in public databases (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

According to antigenic differences in the protein G, through monoclonal antibodies, the BRSV strains have been divided into four subgroups designated as A, B, AB, and atypical (FURZE et al., 1994; SCHRIJVER et al., 1996; FURZE et al., 1997). In 2000, a phylogenetic study, which analyzed 54 sequences based on maximum-likelihood method, proposed the division of BRSV in six distinct genogroups (I – VI) for the G gene and in five different genogroups (I – V) for the F and N gene (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). Additionally, they observed geographical and temporal correlation between the isolates and the antigenic subgroups (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

In Brazil, the first detection and molecular characterization of BRSV strains was performed in 1993 and 2003, respectively (GONÇALVES et al., 1993; ARNS et al., 2003). This Brazilian BRSV strain was classified as subgroup B, genogroup I, that was described in the UK in the 70s (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; ARNS et al., 2003; SARMIENTO-SILVA; NAKAMURA-LOPEZ; VAUGHAN, 2012).

In Brazil there are only a few studies evaluating the BRSV as etiologic agent responsible for developing acute respiratory diseases in cattle (ARNS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011). In recent years researches using molecular biology techniques to characterize the BRSV strains showed different

characteristics from those observed in other countries, such as aa substitution in the cysteine node of the protein G (ALMEIDA et al., 2006; SPILKI et al., 2006a). The main BRSV reports in Brazil have been made with beef cattle through nasal secretion samples, especially in cases involving young cattle or lung fragments and nasal swabs collected in slaughterhouses (ARNS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011).

In Brazil, few studies have been carried out and in particular, in the State of Paraná's exist a deficient epidemiological surveillance and a scarcity of reports of respiratory disease outbreaks in beef cattle and milk, so it is not possible affirms which the current genogroups and implement effective programs immunoprophylactic against BRSV infections in the Paraná State (ALMEIDA et al., 2006; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011).

The aim of this study was to perform molecular characterization of the Brazilian wild-type BRSV strains identified in bovine respiratory infection by the G protein gene analysis in beef and dairy cattle.

5.2 Material and methods

5.2.1 Sampling and data collection

The nasal swab samples were selected from a biological samples collection of nasal swabs previously evaluated for the presence of BRSV and other pathogens of the bovine respiratory tract, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), bovine coronavirus (BCoV), and bovine parainfluenza 3 virus (PI3). Staying in the study only the swabs that showed singular infection for BRSV. The study included samples collected between May 2011 and November 2015. The nasal swabs were incubated in 0.01M PBS buffer (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 14 mM KH₂PO₄), pH 7.2 and storage at -80°C. Only samples in which the BRSV was identified in single infection were included in the study.

The molecular study was performed in seven BRSV strains identified in the western, northern, and central geographical regions of Paraná State, with a predominance of subtropical climate. Three strains (UEL1, 4, and 5 collected in 2011) were from an outbreak of acute respiratory distress in suckling dairy calves of a calf creation unit. The other four strains (UEL2 and 3 collected in 2014; and UEL6, and UEL7 collected in 2015) were from

BRDC outbreaks in fattening steers of three feedlots. All the cattle herds had no BRSV vaccination historical.

5.2.2 Virological analysis

Aliquots of 500 μ L of containing swabs PBS were pretreated with sodium dodecyl sulphate (SDS) and Proteinase K (Ambion[®] Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA) at a final concentration of 1% and 0.2 mg/mL, respectively, and incubated at 56°C for 30 min. The samples were then processed following a silica/guanidine isothiocyanate nucleic acid extraction methods (BOOM et al., 1990). The extracted nucleic acid was eluted in 50 μ L of ultra-pure RNase-free, diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water (Invitrogen[™] Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA) and stored at -80 °C until use for molecular analysis. Sterile water was included as negative control during the nucleic acid extraction procedures.

RT-PCR and nested-PCR amplicons with 603 and 371 bp length, respectively, of the BRSV G gene were amplified according to Vilcek et al. (1994). The BRSV vaccine strain, Bayovac was included as positive control during the RT-PCR and nested-PCR assays. The amplified products were analyzed by electrophoresis in a 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.

5.2.3 Phylogenetic analysis

The BRSV RNA presence in the nasal swab samples was confirmed by nucleotide sequencing of the amplicons. The seven nested-PCR products were purified using a PureLink[®] quick gel extraction and PCR purification combo kit and quantified using commercial Kits. The BRSV G gene amplicons were sequenced in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer using a Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with the forward and reverse primers used in the nested-RT-PCR assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence quality analyzes were obtained using Phred software and the contig assemblies were performed using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Sequence similarity searches were performed using the basic local alignment search tool (BLAST) software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The phylogenetic tree of nucleotide (nt) sequences was constructed using the maximum-likelihood method and the pairwise nucleotide distances were valued using the Tamura-Nei model in MEGA version 5.10 (TAMURA; NEI, 1993). Bootstrapping was statistically

supported with 1,000 replicates. The aa sequences were aligned in BioEdit version 7.1.3.0. and the immunodominant region was compared with other aa sequences available in a public databases, NCBI protein, to investigate the presence of mutations in this specific residues. The nt and aa sequence identity matrix was performed in BioEdit version 7.1.3.0. Three strains from calf creation unit described in this study are available in GenBank with the accession numbers KM982441, KR361581, and RK361582.

5.3 Results

The seven BRSV strains evaluated in this study generated amplicons with the expected size (371 bp) and in the phylogenetic tree of the G protein gene they clustered with the strains belonging to the BRSV genogroup III, but in two distinct subclusters (Figure 1). The UEL2 (beef feedlot) and UEL4 (dairy calf) strains clustered together with the Bayovac vaccine strain. However, the UEL1, UEL5, UEL3, UEL6, and UEL7 strains clustered together in another subcluster. The BRSV UEL6 strain that originated from a 10 months-old steer in feedlot, and the UEL1 and UEL5 strains, that were detected in dairy calves, grouped in a distinct branch of the other strains (UEL3 and UEL7) from beef feedlot.

The sequences described in this study showed 85.5 to 100% of nt identity with each other and 85.2% to 98.9% with other strains of genogroup III. The seven sequences exhibited 61.1 to 98.9% of nt identity with other BRSV sequences deposited in GenBank.

The UEL1 and UEL5 strains from the same dairy calf creation unit exhibited 99.6% of nt identity with each other, however the UEL4 strain, when compared with other strains (UEL1 and UEL5) from the same dairy cattle herd showed only 86.5% of nt identity.

The UEL2 and UEL3 strains, that were from the same beef feedlot showed 86.2% of nt identity between them. The UEL 6 and UEL 7 strains from two beef feedlot distinct exhibited 86.5 to 98.6% and 85.5 to 97.9% of nt identity, respectively, with other BRSV sequences described in this study.

The BRSV strains UEL4, from a dairy calf, and UEL2, from a beef feedlot exhibited 100% of nt identity with each other and 85.5% to 86.5% with the other sequences described in this study.

The BRSV strains UEL1, UEL3, UEL5, UEL6, and UEL 7 showed 93.1 to 99.6% nt identity with them. The UEL1 and UEL5 (dairy calves) strains exhibited 99.6% nt identity each other. The UEL3, UEL6, and UEL7 (beef feedlot) strains presented 93.8 to 94%

nt identity each other. The feedlot strains showed 93.1 to 98.6% nt identity with the dairy calves strains grouped in this cluster.

The nt sequences analyzed in this study have also demonstrated 82.4% to 84.8% of nt identity with other BRSV Brazilian strains (BRSV-25-BR and BRSV-108-BR) detected in calves with respiratory disease in the Southern region in 2003 and 2005, respectively, that were classified as BRSV genogroup I.

In the aa deduced sequence analysis of the conserved central hydrophobic region of the G protein were observed differences in the aa located in positions 158-189, in the immunodominant portion of our Brazilian wild-type BRSV strains.

Five strains showed replacement in one or more cysteines, when compared with older Brazilian strain BRSV-25-BR, strain 391.2 (prototype strain of subgroup A - genogroup III), and the Lehmkuhl (Bayovac – genogroup III), 220-69 (Vacoires – genogroup II), and RB94 (Rispoval – genogroup II) strains that are the major strains used in vaccine production (Figure 2).

The aa sequence of UEL1 and UEL5 strains, from the same herd, showed replacement in three cysteines in position 173 Cys → Leu, 176 Cys → Tyr, and 186 Cys → Arg. In UEL3 and UEL7 strains the Cys residues have been replaced by Leu in position 173 and by Arg in the positions 182 and 186. The replacement was also observed in UEL6 strain by Leu in position 173 and by Try in 176.

5.4 Discussion

The seven Brazilian wild-type BRSV strains identified in outbreaks of bovine acute respiratory distress included in this molecular study based on phylogenetic analysis of G protein gene were classified in two distinct clusters of the genogroup III. The genogroup III was constituted exclusively by BRSV strains isolated in the decades 70-90 in the USA (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). However, in 2005 some BRSV Japanese strains were included in the same cluster of North American strains (YAEGASHI et al., 2005). In the best of our knowledge this is the first description of BRSV Brazilian strains classified in the genogroup III.

All isolates characterized in Brazil, to date, belong to genogroup I (ARNS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011). Nevertheless, the strains characterized in this study showed more similarity with the strains detected in the USA, this fact may have been observed due the few virus isolates characterized to date and

can not rule out the possibility of other BRSV genogroups circulating in Brazilian herds. On the other hand, the introduction of animals from other countries could be the reason of the emergence of new BRSV genogroups in Brazil.

The strains UEL2 and UEL4 clustered with the genogroup III and showed the higher identity (98.9%) with the Bayovac vaccine strain. However, the other BRSV strains analyzed in this study (UEL1, 3, 5, 6, and 7) showed lower identity (85.2 to 86.5%) related to the vaccine strain. Furthermore the strains that showed less identity with vaccine strain exhibited substitution of cysteine position in the immunodominant region of the G protein, a fact that probably influenced the decrease in identity with the vaccine strain belonging to the same genogroup.

The G protein, when compared with the other BRSV proteins, such as F and N, has a high rate of genetic variability, more than 8% (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). Usually it is possible to observe a complete similarity between the BRSV strains found in animals of the same herd (LARSEN, 2000; LARSEN; TJORNEHOJ; VIUFF, 2000). However, the UEL2 and UEL3 strains, that belong to the same herd and were collected at the same time from BRDC outbreak in a feedlot with steers of 20 months of age showed 86.2% of nt identity and grouped in different clusters. The UEL1 and UEL5 strains, also collected at the same time in the same farm, showed high nt identity (99.6%) between them, however when compared with the strain UEL4, they demonstrate a lower (86.5%) nt identity. The low similarity observed between the BRSV strains found in animals of the same herd may be due to the fact that the animals are acquired from different sources herds.

The G protein has a central region domain, comprising 32 aa residues, called the cysteine noose (LANGEDIJK et al., 1997). This region is considered immunodominant in BRSV G protein, possess four higher conserved Cys residues connected by two disulfide bridges, one located innermost in position Cys176-Cys182 and other located outermost in position Cys173-Cys186 (LANGEDIJK et al., 1997). In five out of the seven BRSV strains analyzed in this study was possible to observe one or more mutations in the cysteine-noose region. Replacement located in Cys residues has already been observed in French isolates of BRSV belonging to the genogroup VI and in Brazilian isolates belonging to the genogroup I (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; SPILKI et al., 2006a). Valarcher; Schelcher; Bourhy (2000) suggested that these mutations can occur due the intensive vaccination (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). Nevertheless, the Brazilian strain BRSV-25-BR (SPILKI et al., 2006a) and the strains included in this study were from cattle herds without historical vaccination against BRSV. Even with the constant exposure to

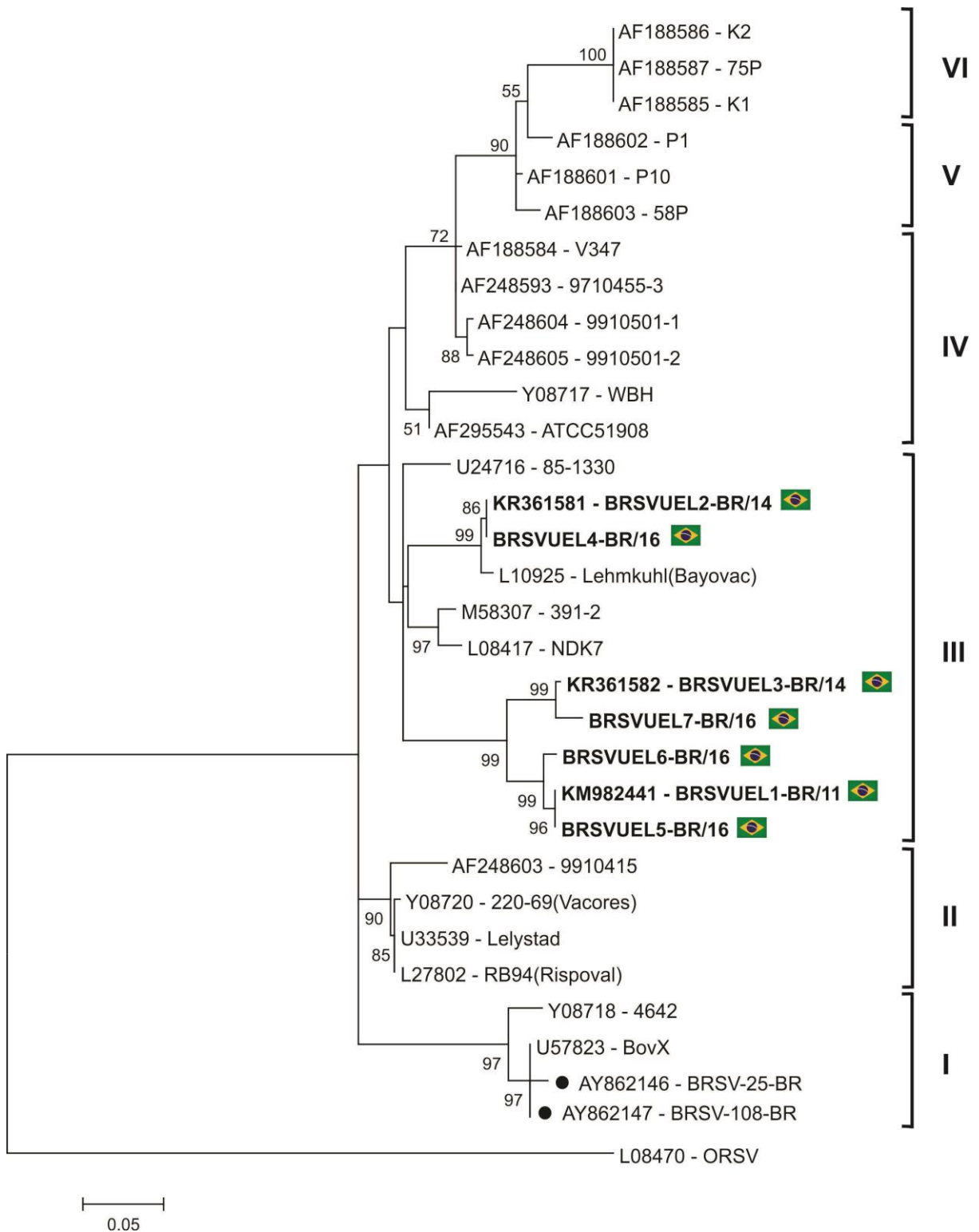
BRSV and the acquisition of specific immunity to reinfection can be frequent, however, in these cases, the clinical disease is milder (ELLIS et al., 2013; GUZMAN; TAYLOR, 2015). In general the use of vaccination against BRSV do not produce a high protection, this fact may suggest that the G protein would no longer be just as important a protein to induce neutralizing the virus.

For the respiratory syncytial virus, the G protein is a major target of the host immune response, although, the immunodominant region of the G protein may be under immunologic pressures (PROZZI et al., 1997; SACCO et al., 2014). This immunologic pressure can occur due massive vaccination of herds or constant reinfection of animals that already have antibodies against BRSV, as reported in infections by HRSV (MARTINEZ; DOPAZO; MELERO, 1997; PROZZI et al., 1997; VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). It was suggested that mutations in the immunodominant region of the G protein may influence the virus antigenicity, since this region plays an important role in the induction of immune response against the BRSV, facilitating vaccine escape (SIMARD et al., 1995; MARTINEZ; DOPAZO; MELERO, 1997).

Considering the genetic variability of BRSV, is remarkable the need for molecular and epidemiological studies in Brazil to assess the practical implications of this diversity, regarding both the pathogenicity of virus strains and the immunoprophylactic aspects of infection. Changes in the BRSV G protein may even confer cross-protective immunity in animals infected with heterologous strains; however some aspects such as the degree of protection, scope, and duration of immunity conferred by different genetic genogroups are not yet fully known. To identify and to characterize antigenic BRSV subgroups circulating in beef and dairy cattle herds are critical to the adoption of effective strategies for the control and prophylaxis of respiratory disease and minimize economic losses to the farmer. Urgent studies focused on antigenic diversity of the G protein and its correlation with viral strains present in the commercial vaccines that are formulated with viral strains of subgroup A (genogroup III) are necessary. Only with the knowledge of classical and molecular epidemiology of the BRSV in a region and/or in a country and the temporal distribution is possible to implement and evaluate the efficiency of immunoprophylactic programs against the BRSV infection.

This study adds new information about molecular characteristics of BRSV strains circulating in Brazilian cattle herds. These results contribute for the effective monitoring immunoprophylactic of measures adopted for the control and prophylaxis of the BRSV infections.

Figure 1. Phylogenetic analysis of the BRSV strains based on the partial fragment (371bp) of G protein gene. The sequences of this study are indicating with Brazil's flag and other Brazilian strains are indicated with a filled circle. The phylogenetic tree was constructed using the maximum-likelihood method and the pairwise nucleotide distances were valued using the Tamura-Nei model. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. The bootstrap values are shown next to the branches, with values less than 50 removed.



5.5 References

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Exportações de Carne Bovina do Brasil - Brazilian Beef Exports. p. Comparativo com os dois últimos anos; Participação por categoria; Participação por país; Janeiro a Dezembro de 2015, 2015a. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br/download/relatorio-anual-2015.pdf> >. Acesso em: 20-01-2016.
- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Balanço da Pecuária no ano de 2014. 2015b. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8> >. Acesso em: 19-01-2016.
- ACKERMANN, M.R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J.A. Innate immunology of bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 215-228, 2010.
- AFFONSO, I.B.; GATTI, S.P.; ALEXANDRINO, B.; OLIVEIRA, M.C.; DE MEDEIROS, A.S.R.; DA GLÓRIA BUZINARO, M.; SAMARA, S.I. Detection of antibodies against bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in dairy cattle with different prevalences of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 295-300, 2011.
- AFFONSO, I.B.; SOUZA, A.; MARTINI, M.C.; DOS SANTOS, M.M.A.B.; SPILKI, F.R.; ARNS, C.W.; SAMARA, S.I. Detection of an untyped strain of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2539-2550, 2014.
- ALMEIDA, R.; DOMINGUES, H.; SPILKI, F.; LARSEN, L.E.; HAGGLUND, S.; BELAK, S.; ARNS, C. Circulation of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Veterinary Record**, v. 158, n. 18, p. 632, 2006.
- APLEY, M. Bovine respiratory disease: pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 399-411, 2006.
- ARNS, C.; CAMPALANS, J.; COSTA, S.; DOMINGUES, H.; D'ARCE, R.; ALMEIDA, R.; COSWIG, L. Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 213-218, 2003.
- ARSLANAGIC, E.; MATSUMOTO, M.; SUZUKI, K.; NEROME, K.; TSUTSUMI, H.; HUNG, T. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm. **Acta Virologica**, v. 40, n. 4, p. 209-214, 1996.
- BERMINGHAM, A.; COLLINS, P.L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11259-11264, 1999.
- BIDOKHTI, M.R.; TRAVEN, M.; OHLSON, A.; ZARNEGAR, B.; BAULE, C.; BELAK, S.; ALENIUS, S.; LIU, L. Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds. **Archives of Virology**, v. 157, n. 4, p. 601-607, 2012.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BORCHERS, A.T.; CHANG, C.; GERSHWIN, M.E.; GERSHWIN, L.J. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 45, n. 3, p. 331-379, 2013.

BUCHHOLZ, U.J.; FINKE, S.; CONZELMANN, K.K. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 251-259, 1999.

COLLINS, J.K.; TEEGARDEN, R.M.; MACVEAN, D.W.; SALMAN; SMITH, G.H.; FRANK, G.R. Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 8, p. 1316-1319, 1988.

DELAUNOIS, L. Anatomy and physiology of collateral respiratory pathways. **European Respiratory Journal**, v. 2, n. 9, p. 893-904, 1989.

DOMINGUES, H.G.; CAMPALANS, J.; ALMEIDA, R.S.; COSWIG, L.T.; ARNS, C.W. Dot-enzyme linked immunosorbent assay as an alternative technique for the detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antibodies. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 397-404, 2002.

DOMINGUES, H.G.; SPILKI, F.R.; ARNS, C.W. Detecção molecular e análise filogenética de vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em swabs e tecido pulmonar de bovinos adultos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 961-966, 2011.

DORELEIJERS, J.F.; LANGEDIJK, J.P.; HARD, K.; BOELEN, R.; RULLMANN, J.A.; SCHAAPER, W.M.; VAN OIRSCHOT, J.T.; KAPTEIN, R. Solution structure of the immunodominant region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. **Biochemistry**, v. 35, n. 47, p. 14684-14688, 1996.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M.J.P.; MOOJEN, V.; ARNS, C.W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U.M.D. Clinic-pathological aspects in the natural infection of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRVS) in extensive management of cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 77-81, 1997.

EASTON, A.J.; DOMACHOWSKIE, J.B.; ROSENBERG, H.F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 390-412, 2004.

ELLIS, J.; BELDEN, E.; HAVEN, T.; CAVENDER, J. Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of proliferation and secretion of lymphokines by leukocytes in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 34, n. 1-2, p. 21-34, 1992.

ELLIS, J.; WEST, K.; KONOBY, C.; LEARD, T.; GALLO, G.; CONLON, J.; FITZGERALD, N. Efficacy of an inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 12, p. 1973-1980, 2001.

ELLIS, J.A.; WEST, K.H.; WALDNER, C.; RHODES, C. Efficacy of a saponin-adjuvanted inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. **Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 46, n. 2, p. 155-162, 2005.

ELLIS, J.A.; GOW, S.P.; MAHAN, S.; LEYH, R. Duration of immunity to experimental infection with bovine respiratory syncytial virus following intranasal vaccination of young passively immune calves. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 243, n. 11, p. 1602-1608, 2013.

ELVANDER, M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Record**, v. 138, n. 5, p. 101-105, 1996.

ELVANDER, M.; VILCEK, S.; BAULE, C.; UTTENTHAL, A.; BALLAGI-PORDANY, A.; BELAK, S. Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. **Journal of General Virology**, v. 79 (Pt 12), p. 2939-2946, 1998.

FELDMAN, S.A.; AUDET, S.; BEELER, J.A. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. **Journal of Virology**, v. 74, n. 14, p. 6442-6447, 2000.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; MEDEIROS, M.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; DRIEMEIER, D.; SCHUCH, L.F.; MORAES, M. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 139-143, 2000.

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? **Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 53, n. 7, p. 754-761, 2012.

FURZE, J.; WERTZ, G.; LERCH, R.; TAYLOR, G. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 75 (Pt 2), p. 363-370, 1994.

FURZE, J.; ROBERTS, S.; WERTZ, G.; TAYLOR, G. Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity. **Virology**, v. 231, n. 1, p. 48-58, 1997.

GAGEA, M.I.; BATEMAN, K.G.; VAN DREUMEL, T.; MCEWEN, B.J.; CARMAN, S.; ARCHAMBAULT, M.; SHANAHAN, R.A.; CASWELL, J.L. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 1, p. 18-28, 2006.

GERSHWIN, L.J.; SCHELEGLE, E.S.; GUNTHER, R.A.; ANDERSON, M.L.; WOOLUMS, A.R.; LAROCHELLE, D.R.; BOYLE, G.A.; FRIEBERTSHAUSER, K.E.; SINGER, R.S. A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. **Vaccine**, v. 16, n. 11-12, p. 1225-1236, 1998.

GERSHWIN, L.J.; BERGHAUS, L.J.; ARNOLD, K.; ANDERSON, M.L.; CORBEIL, L.B. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 1-2, p. 119-130, 2005.

GERSHWIN, L.J. Bovine respiratory syncytial virus infection: immunopathogenic mechanisms. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 02, p. 207-213, 2007.

GERSHWIN, L.J.; ANDERSON, M.L.; WANG, C.; BERGHAUS, L.J.; KENNY, T.P.; GUNTHER, R.A. Assessment of IgE response and cytokine gene expression in pulmonary efferent lymph collected after ovalbumin inhalation during experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 1, p. 134-145, 2011.

GERSHWIN, L.J. Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 253-257, 2012.

GERSHWIN, L.J.; VAN EENENNAAM, A.L.; ANDERSON, M.L.; MCELIGOT, H.A.; SHAO, M.X.; TOAFF-ROSENSTEIN, R.; TAYLOR, J.F.; NEIBERGS, H.L.; WOMACK, J. Single Pathogen Challenge with Agents of the Bovine Respiratory Disease Complex. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142479, 2015.

GONÇALVES, I.P.D.; SIMANKE, A.T.; JOST, H.C.; HÖTZEL, I.; SOGLIO, A.D.; MOOJEN, V. DETECTION OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN CALVES OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL. **Ciência Rural**, v. 23, p. 389-390, 1993.

GORDEN, P.J.; PLUMMER, P. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. **Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 243-259, 2010.

GORIS, K.; UHLENBRUCK, S.; SCHWEGMANN-WESSELS, C.; KOHL, W.; NIEDORF, F.; STERN, M.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; BALS, R.; TAYLOR, G.; BRAUN, A.; BICKER, G.; KIETZMANN, M.; HERRLER, G. Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. **Journal of Virology**, v. 83, n. 4, p. 1962-1968, 2009.

GRISSETT, G.P.; WHITE, B.J.; LARSON, R.L. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 770-780, 2015.

GUZMAN, E.; TAYLOR, G. Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves. **Molecular Immunology**, v. 66, n. 1, p. 48-56, 2015.

HAGGLUND, S.; SVENSSON, C.; EMANUELSON, U.; VALARCHER, J.F.; ALENIUS, S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 2, p. 320-328, 2006.

HAGGLUND, S.; HU, K.; BLODORN, K.; MAKABI-PANZU, B.; GAILLARD, A.L.; ELLENCRONA, K.; CHEVRET, D.; HELLMAN, L.; BENGTSSON, K.L.; RIFFAULT, S.; TAYLOR, G.; VALARCHER, J.F.; ELEOUE, J.F. Characterization of an experimental vaccine for bovine respiratory syncytial virus. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 21, n. 7, p. 997-1004, 2014.

HENGST, U.; KIEFER, P. Domains of human respiratory syncytial virus P protein essential for homodimerization and for binding to N and NS1 protein. **Virus Genes**, v. 20, n. 3, p. 221-225, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. 2014. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publicacao_completa.pdf >. Acesso em: 11-11-2015.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses - Virus Taxonomy: 2014 Release. 2016. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> >. Acesso em: 15-01-2016.

KARGER, A.; SCHMIDT, U.; BUCHHOLZ, U.J. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. **Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 3, p. 631-640, 2001.

KHATTAR, S.K.; YUNUS, A.S.; COLLINS, P.L.; SAMAL, S.K. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein. **Virology**, v. 285, n. 2, p. 253-269, 2001.

KIRSCHVINK, N. Respiratory function in cattle: impact of breed, heritability and external factors. **DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 115, n. 7, p. 265-270, 2008.

KLEM, T.B.; RIMSTAD, E.; STOKSTAD, M. Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 15, 2014.

KLIMA, C.L.; ZAHEER, R.; COOK, S.R.; BOOKER, C.W.; HENDRICK, S.; ALEXANDER, T.W.; MCALLISTER, T.A. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 438-448, 2014.

KONIG, P.; GIESOW, K.; SCHULDT, K.; BUCHHOLZ, U.J.; KEIL, G.M. A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV): modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. **Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 7, p. 1815-1824, 2004.

KUO, L.; FEARNES, R.; COLLINS, P.L. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 4944-4953, 1997.

LANGEDIJK, J.P.; MELOEN, R.H.; TAYLOR, G.; FURZE, J.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 5, p. 4055-4061, 1997.

LANGEDIJK, J.P.; DE GROOT, B.L.; BERENDSEN, H.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor. **Virology**, v. 243, n. 2, p. 293-302, 1998.

LARSEN, L.E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 41, n. 1, p. 1-24, 2000.

- LARSEN, L.E.; TJORNEHOJ, K.; VIUFF, B. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4222-4227, 2000.
- LARSEN, L.E.; TEGTMEIER, C.; PEDERSEN, E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 1, p. 113-121, 2001.
- LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P.R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 68 (Pt 9), p. 2521-2524, 1987.
- MALLIPEDDI, S.K.; SAMAL, S.K. Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 74 (Pt 9), p. 2001-2004, 1993.
- MALLIPEDDI, S.K.; LUPIANI, B.; SAMAL, S.K. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system. **Journal of General Virology**, v. 77 (Pt 5), p. 1019-1023, 1996.
- MARTIN, S.W.; BATEMAN, K.G.; SHEWEN, P.E.; ROSENDAL, S.; BOHAC, J.E. The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 3, p. 355-362, 1989.
- MARTINEZ, I.; DOPAZO, J.; MELERO, J.A. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v. 78 (Pt 10), p. 2419-2429, 1997.
- MOUSSA, A. Assembly of enveloped respiratory syncytial virus particles within the cytoplasm of infected Vero cells. **Archives of Virology**, v. 134, n. 1-2, p. 205-211, 1994.
- OHLSON, A.; ALENIUS, S.; TRAVEN, M.; EMANUELSON, U. A longitudinal study of the dynamics of bovine corona virus and respiratory syncytial virus infections in dairy herds. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 395-400, 2013.
- OUMOUNA, M.; MAPLETOFT, J.W.; KARVONEN, B.C.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Formulation with CpG oligodeoxynucleotides prevents induction of pulmonary immunopathology following priming with formalin-inactivated or commercial killed bovine respiratory syncytial virus vaccine. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2024-2032, 2005.
- PACCAUD, M.F.; JACQUIER, C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung**, v. 30, n. 4, p. 327-342, 1970.
- PANCIERA, R.J.; CONFER, A.W. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 191-214, 2010.
- PASTEY, M.K.; SAMAL, S.K. Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein. **Virus Research**, v. 29, n. 2, p. 195-202, 1993.
- PATON, D.J.; CHRISTIANSEN, K.H.; ALENIUS, S.; CRANWELL, M.P.; PRITCHARD, G.C.; DREW, T.W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 142, n. 15, p. 385-391, 1998.

PEIXOTO, P.V.; MOTA, R.A.; BRITO, M.F.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; DE SOUZA, M.I. Infecção natural pelo Vírus Sincicial R Infecção natural pelo Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) espiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 171-175, 2000.

PROZZI, D.; WALRAVENS, K.; LANGEDIJK, J.; DAUS, F.; KRAMPS, J.A.; LETESSON, J.-J. Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 2, p. 359-366, 1997.

RAVIOLO, J.; BAGNIS, G.; AGUILAR, J.; GIRAUDO, J.; ZIELINSKI, G.; RAVIOLO, J.; ARNS, C.; SPILKI, F. Immunocytochemical characterization of the cytopathic effect induced by bovine respiratory syncytial virus strain RC 98 on Hep-2 cells. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 980-985, 2009.

RIFFAULT, S.; DUBUQUOY, C.; CASTAGNE, N.; BARANOWSKI, E.; CHARLEY, B.; ELEOUET, J.F. Replication of bovine respiratory syncytial virus in murine cells depends on type I interferon-receptor functionality. **Journal of General Virology**, v. 87, n. Pt 8, p. 2145-2148, 2006.

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. 427-436, 2014.

SAMAL, S.K.; ZAMORA, M. Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 72 (Pt 7), p. 1715-1720, 1991.

SANTANGELO, P.; NITIN, N.; LACONTE, L.; WOOLUMS, A.; BAO, G. Live-cell characterization and analysis of a clinical isolate of bovine respiratory syncytial virus, using molecular beacons. **Journal of Virology**, v. 80, n. 2, p. 682-688, 2006.

SARMIENTO-SILVA, R.E.; NAKAMURA-LOPEZ, Y.; VAUGHAN, G. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3452-3467, 2012.

SCHLENDER, J.; BOSSERT, B.; BUCHHOLZ, U.; CONZELMANN, K.K. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8234-8242, 2000.

SCHLENDER, J.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; CONZELMANN, K.K. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4609-4616, 2003.

SCHRIJVER, R.S.; DAUS, F.; KRAMPS, J.A.; LANGEDIJK, J.P.; BUIJS, R.; MIDDEL, W.G.; TAYLOR, G.; FURZE, J.; HUYBEN, M.W.; VAN OIRSCHOT, J.T. Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 3-4, p. 253-260, 1996.

SHARMA, R.; WOLDEHIWET, Z. Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. **Veterinary Microbiology**, v. 23, n. 1-4, p. 267-272, 1990.

SIMARD, C.; NADON, F.; SEGUIN, C.; TRUDEL, M. Evidence that the amino acid region 124-203 of glycoprotein G from the respiratory syncytial virus (RSV) constitutes a major part of the polypeptide domain that is involved in the protection against RSV infection. **Antiviral Research** v. 28, n. 4, p. 303-315, 1995.

SISCHO, W.M.; HIRD, D.W.; GARDNER, I.A.; UTTERBACK, W.W.; CHRISTIANSEN, K.H.; CARPENTER, T.E.; DANAYE-ELMI, C.; HERON, B.R. Economics of disease occurrence and prevention on California dairy farms: a report and evaluation of data collected for the national animal health monitoring system, 1986–87. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, n. 2, p. 141-156, 1990.

SNOWDER, G.D.; VAN VLECK, L.D.; CUNDIFF, L.V.; BENNETT, G.L. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 1999-2008, 2006.

SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; DOMINGUES, H.G.; D'ARCE, R.C.; FERREIRA, H.L.; CAMPALANS, J.; COSTA, S.C.; 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. 30-37, 2006a.

SPIPKI, F.R.; DE ALMEIDA, R.S.; CAMPALANS, J.; ARNS, C.W. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 2, p. 130-133, 2006b.

SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.D.; ARNS, C.W. Antibody responses in mice after immunization with inactivated bovine respiratory syncytial virus using different adjuvants. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2332-2337, 2010.

SRIKUMARAN, S.; KELLING, C.L.; AMBAGALA, A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 215-229, 2007.

STOTT, E.J.; THOMAS, L.H.; COLLINS, A.P.; CROUCH, S.; JEBBETT, J.; SMITH, G.S.; LUTHER, P.D.; CASWELL, R. A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. **Journal of Hygiene**, v. 85, n. 2, p. 257-270, 1980.

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.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

TAYLOR, G.; STOTT, E.; HUGHES, M.; COLLINS, A. Respiratory syncytial virus infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 43, n. 2, p. 649-655, 1984.

TAYLOR, G.; STOTT, E.J.; FURZE, J.; FORD, J.; SOPP, P. Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. **Journal of General Virology**, v. 73 (Pt 9), p. 2217-2223, 1992.

TAYLOR, G.; THOMAS, L.H.; FURZE, J.M.; COOK, R.S.; WYLD, S.G.; LERCH, R.; HARDY, R.; WERTZ, G.W. Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV

challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. **Journal of General Virology**, v. 78 (Pt 12), p. 3195-3206, 1997.

TENG, M.N.; COLLINS, P.L. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. **Journal of Virology**, v. 72, n. 7, p. 5707-5716, 1998.

TRUDEL, M.; NADON, F.; SIMARD, C.; BELANGER, F.; ALAIN, R.; SEGUIN, C.; LUSSIER, G. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. **Archives of Virology**, v. 107, n. 1-2, p. 141-149, 1989.

VALARCHER, J.F.; SCHELCHER, F.; BOURHY, H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 22, p. 10714-10728, 2000.

VALARCHER, J.F.; FURZE, J.; WYLD, S.; COOK, R.; CONZELMANN, K.K.; TAYLOR, G. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8426-8439, 2003.

VALARCHER, J.F.; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 153-180, 2007.

VALENTOVA, V.; ANTONIS, A.F.; KOVARCIK, K. Restriction enzyme analysis of RT-PCR amplicons as a rapid method for detection of genetic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 1-2, p. 1-12, 2005.

VAN DER POEL, W.H.; BRAND, A.; KRAMPS, J.A.; VAN OIRSCHOT, J.T. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. **Journal of Infection**, v. 29, n. 2, p. 215-228, 1994.

VAN VUUREN, M. Serological studies of bovine respiratory syncytial virus in feedlot cattle in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 61, n. 4, p. 168-169, 1990.

VERHOEFF, J.; VAN DER BAN, M.; VAN NIEUWSTADT, A.P. Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings. **Vet Rec**, v. 114, n. 1, p. 9-12, 1984.

VILCEK, S.; ELVANDER, M.; BALLAGI-PORDANY, A.; BELAK, S. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2225-2231, 1994.

VIUFF, B.; TJORNEHOJ, K.; LARSEN, L.E.; RONTVED, C.M.; UTTENTHAL, A.; RONSHOLT, L.; ALEXANDERSEN, S. Replication and clearance of respiratory syncytial virus: apoptosis is an important pathway of virus clearance after experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 2195-2207, 2002.

WESTOVER, K.M.; HUGHES, A.L. Molecular evolution of viral fusion and matrix protein genes and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 128-134, 2001.

WOLDEMESKEL, M.; KEBEDE, E.; YIGEZU, L.; POTGIETER, L.N. Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from Ethiopia. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift** v. 107, n. 11, p. 464-466, 2000.

WOOLUMS, A.R.; ANDERSON, M.L.; GUNTHER, R.A.; SCHELEGLE, E.S.; LAROCHELLE, D.R.; SINGER, R.S.; BOYLE, G.A.; FRIEBERTSHAUSER, K.E.; GERSHWIN, L.J. Evaluation of severe disease induced by aerosol inoculation of calves with bovine respiratory syncytial virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 473-480, 1999.

YAEGASHI, G.; SEIMIYA, Y.M.; SEKI, Y.; TSUNEMITSU, H. Genetic and antigenic analyses of bovine respiratory syncytial virus detected in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 2, p. 145-150, 2005.

YUNUS, A.S.; COLLINS, P.L.; SAMAL, S.K. Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication. **Journal of General Virology**, v. 79 (Pt 9), p. 2231-2238, 1998.

YUNUS, A.S.; KHATTAR, S.K.; COLLINS, P.L.; SAMAL, S.K. Rescue of bovine respiratory syncytial virus from cloned cDNA: entire genome sequence of BRSV strain A51908. **Virus Genes**, v. 23, n. 2, p. 157-164, 2001.

6. CONCLUSÕES

- A técnica de *nested*-PCR utilizada neste estudo possibilitou a amplificação de um produto com 371 pb do gene da proteína G das sete cepas brasileiras de BRSV incluídas na análise;
- As análises filogenéticas realizadas a partir do sequenciamento dos produtos do gene G possibilitaram classificar todas as sete cepas do BRSV incluídas nesse estudo como pertencentes ao genogrupo III, sendo esta a primeira descrição desse genogrupo em bovinos no Brasil;
- Cepas de BRSV circulantes em rebanhos bovinos de corte e leite do estado do Paraná apresentaram mutações na região imunodominante da proteína G representadas pela substituição de uma ou mais cisteínas na porção central conservada da proteína.

ANEXOS

- A. Lista de reagentes**
- B. Lista de soluções e tampões**
- C. Protocolo de técnicas**
- D. Lista de Kits**
- E. Lista de Softwares**

ANEXO A

Lista de reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 μ L; 25 μ mol cada (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (InvitrogenTM Life TechnologiesTM, EUA)
2. 5x *first-strand* PCR-*Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (InvitrogenTM Life TechnologiesTM, EUA)
3. 10x PCR-*Buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (InvitrogenTM Life TechnologiesTM, EUA)
4. 123 bp DNA *Ladder* (InvitrogenTM Life TechnologiesTM, 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 (InvitrogenTM Life TechnologiesTM, EUA)
10. Água DEPC (Dietil pirocarbonato) (InvitrogenTM Life TechnologiesTM, 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 (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
20. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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)
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-CAAAGCACCACACTGTC-3') VILČEK et al. (1994) – 200 pmol (Invitrogen[™] Life Technologies[™], EUA)
30. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B8a *reverse* (gene G/BRSV) (5'-GCTAGTTCTGTGGTGGATTGTTGTC-3') VILČEK et al. (1994) – 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. ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 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™, USA)
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 CLista 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/>)
3. *MEGA package software version 5.10:*
(<http://www.megasoftware.net>)
4. Bioedit software version 7.1.3.0.

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 sódio monobásico ($\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$)
- 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 ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (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 ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)
- 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 μ L de cada dNTP
- Solução uso - concentração 10 mM - 10 μ L da solução estoque + 90 μ L de água ultrapura

• **Diluição dos oligonucleotídeos**

- Solução estoque: eluição do *primer* liofilizado para uma concentração final de 200 pmol (primer mãe) através da seguinte fórmula: concentração em nmol x 1.000 \div 200 pmol = volume em μ 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 B5a - PCR**

Concentração: 23,57 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$$23,57 \times 1000 = 23570 \text{ pmol}$$

$$23570 / 200 = 117,85 \text{ } \mu\text{L de água ultrapura adicionada}$$

- **Primer B6a - PCR**

Concentração: 27,33 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$$27,33 \times 1000 = 27330 \text{ pmol}$$

$$27330 / 200 = 136,65 \text{ } \mu\text{L de água ultrapura adicionada}$$

- **Primer B7a – Nested- PCR**

Concentração: 23,69 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$$23,69 \times 1000 = 23690 \text{ pmol}$$

$$23690 / 200 = 118,45 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras adicionadas}$$

- Primer B8a – *Nested-PCR*

Concentração: 25,19 nmol

Data de fabricação: Jan. 2012

$$25,19 \times 1000 = 25190 \text{ pmol}$$

$$25190 / 200 = 125,95 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras adicionadas}$$

ANEXO E
Protocolos de técnicas

• **Extração do ácido nucléico pela técnica de Boom et al. (1990)**

- Adicionar 500 µL de lavado broncoalveolar 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 1mL de etanol 70% gelado

- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1mL 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 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar em termobloco à 56°C / 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x g / 4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização.

• **Reações das técnicas moleculares:**

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

Mix das reações:	Variações de tempo e temperatura das reações:
<p>Mix Desnaturação:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Água DEPC – 6 µL - <i>Primer</i> B6a (20 pmol) – 1 µL - RNA extraído – 5 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"> - Água DEPC – 0,5 µL - DTT 0,1 M – 2 µL - dNTP 2,5 mM – 1 µL - 5x <i>first-strand buffer</i> pH 8,3 – 4 µL - <i>SuperScript</i> II RT 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 – 35,5 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl₂ 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 	<p>PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 94°C / 3 min - 94°C / 45 s - 55°C / 45 s - 72°C / 1 min - 72°C / 7 min <p style="text-align: right;">} 30 ciclos</p>
<p>Mix <i>nested</i>-PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Água DEPC – 35,5 µL - 10x PCR <i>Buffer</i> pH 8,4 – 5 µL - dNTP 2,5 mM – 4 µL - MgCl₂ 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 	<p><i>Nested</i>-PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 94°C / 3 min - 94°C / 45 s - 62°C / 45 s - 72°C / 1min - 72°C / 7 min <p style="text-align: right;">} 30 ciclos</p>

• **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 um 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 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 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-iT[™] Working Solution* a 2 µL do DNA purificado
- No microtubo do padrão 0 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT[™] Working Solution* a 10 µL do padrão 0
- No microtubo do padrão 100 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT[™] 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 (4 ng / μL para produtos de PCR acima de 300 pb) em um microtubo de 0,2 mL.
- Adicionar 1 μL do primer na concentração de 5 pmol