UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Ingrid Bortolin Affonso
Médica Veterinária

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Ingrid Bortolin Affonso

Orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

Coorientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2013

Affonso, Ingrid Bortolin

A257c Caracterização epidemiológica da infecção pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo / Ingrid Bortolin Affonso. – – Jaboticabal, 2013

xx, 72 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Samir Issa Samara

Banca examinadora: Fernando Rosado Spilki, Fumio Honma Ito, Luis Guilherme de Oliveira, Sandra Possebon Gatti

Bibliografia

1. Doença respiratória bovina. 2. Fatores de risco. 3. RT-nested PCR. 4. Prevalência. 5. Virusneutralização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.9:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DE SÃO PAULO

AUTORA: INGRID BORTOLIN AFFONSO

ORIENTADOR: Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. SANDRA POSSEBON GATTI
CTA / / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. FUMIO HONMA ITO
Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

Prof. Dr. FERNANDO ROSADO SPILKI
Universidade Feevale / Novo Hamburgo/RS

Prof. Dr. LUÍS GUILHERME DE OLIVEIRA
Coordenadoria de Defesa Agropecuária / Jaboticabal/SP

Data da realização: 11 de outubro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

INGRID BORTOLIN AFFONSO – nascida em 8 de dezembro de 1984, no Município de Ribeirão Preto – SP, filha de Carlos Eduardo Affonso e Irene Bortolin Affonso. Ingressou em fevereiro de 2003 no Curso de Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-Unesp – Jaboticabal), concluindo-o em dezembro de 2007. Durante o curso, foi bolsista FAPESP de iniciação científica na área de viroses de bovinos no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, e também membro do Programa de Educação Tutorial (PET). Em março de 2008 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV-Unesp-Jaboticabal, concluindo-o em fevereiro de 2010. Durante o mestrado, foi bolsista do CNPq. Ainda em março de 2010, ingressou no Curso de Doutorado, na mesma instituição e área de concentração, com bolsa da FAPESP, concluindo-o em outubro de 2013.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

DEDICO

À minha filha Ana Luísa

Minha companheira, minha maior riqueza. Veio para fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu marido Estevam

Por estar ao meu lado em todos os momentos. Pela paciência, compreensão e carinho. Amo você!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para enfrentar todos os obstáculos e atingir meus objetivos.

A toda minha família, em especial minha mãe Irene, que sempre me apoiou e incentivou meus estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/Unesp, local onde passei os melhores anos da minha vida, por propiciar minha formação profissional, na graduação, mestrado e doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Samir Issa Samara, pela confiança, pela convivência, desde a iniciação científica em 2005, e por contribuir para minha formação profissional.

À minha coorientadora Profa. Dra. Clarice Weis Arns, por viabilizar parte da minha pesquisa, pela confiança e acolhimento em seu laboratório na UNICAMP.

Aos diretores da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral de Jaboticabal, Catanduva e São José do Rio Preto, respectivamente, Vera Lúcia Palla, Carlos Pagani Neto e Pedro Cavallini Neto, por permitirem as visitas para colheita de material nas propriedades junto com os técnicos Ana Beatriz Vieira Sacchi, Jader Rogério Cappi Moraes e Ricardo dos Santos Silva. Agradeço também aos técnicos por toda ajuda e pela agradável convivência durante o período das colheitas.

Ao doutorando Matheus Cavalheiro Martini e à Profa. Dra. Márcia Mercês Ap. Bianchi dos Santos, por toda paciência e ajuda para me ensinar a técnica de RT-nested PCR durante o período de treinamento na UNICAMP.

À assistente de suporte acadêmico Andressa de Souza, por toda paciência e disponibilidade na execução da RT-nested PCR e também no sequenciamento genômico.

Ao Prof. Dr. Antônio Nader Filho e Profa. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos, por permitirem a realização de parte do trabalho em seus laboratórios.

À assistente de suporte acadêmico Andréa Souza Ramos de Medeiros, pela amizade e convivência desde 2005, pela ajuda na virusneutralização e por sempre ter tido paciência para me ouvir.

Ao doutorando Rafael Massa, pela amizade e paciência para me ensinar estatística.

À Profa. Dra. Adolorata Ap. Bianco Carvalho e Profa. Dra. Karina Paes Bürger pela amizade, convivência e pelas contribuições na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Mathias, pela atenção, disponibilidade e ajuda em grande parte do trabalho, e também pelas considerações feitas durante a banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela acolhida em seu laboratório para aprimoramento da RT-nested PCR e pela contribuição na banca de qualificação. Agradeço também à Dra. Maria de Fátima Silva Montassier pela paciência e pelo acompanhamento nas análises.

Ao Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki, pela disponibilidade e auxílio ao meu trabalho, pela participação e contribuição na banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Fumio Honma Ito, Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira e Profa. Dra. Sandra Possebon Gatti pela participação e contribuição na banca de defesa.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela amizade e convivência em todos esses anos de estudo.

A todos os pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial à Kelly Caselani, Mirelle Andréa de Carvalho Picinato e Lucimara Antonio Borges, pela amizade, ajuda e convivência.

A todos os proprietários que abriram as portas de suas propriedades para a execução deste trabalho.

A todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

“Nossa vida é um caminho. Quando paramos, não vamos para frente.”

Papa Francisco

Projeto financiado pela FAPESP
Bolsa de Doutorado – processo 10/06950-2
Auxílio à Pesquisa – processo 10/15912-7

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....xiv
ABSTRACT xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....xvi
LISTA DE TABELAS xvii
LISTA DE FIGURAS xix
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1. Histórico do BRSV.....2
2.2. Agente etiológico.....3
2.3. Características da infecção, controle e diagnóstico do BRSV.....7
2.4. Ocorrência do BRSV e fatores de risco.....10
3. OBJETIVOS 13
3.1. Geral.....13
3.2. Específicos 13
4. MATERIAL E MÉTODOS 13
4.1. Propriedades 13
4.2. Amostragem e colheita de material 14
4.3. Processamento das amostras de soro sanguíneo: Técnica de virusneutralização (VN) 16
4.3.1. Manutenção das culturas celulares 17
4.3.2. Amplificação viral.....17
4.3.3. Determinação do título infectante viral 18
4.3.4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes.....19
4.3.5. Controle das $TCID_{50}$ 20
4.4. Análise estatística dos resultados da VN 20
4.5. Determinação de fatores de risco.....21
4.5.1. Análise dos fatores de risco 22

Página

4.6. Processamento das amostras de secreções nasais: Técnica de RT-nested PCR 22
4.6.1. Extração do RNA 23
4.6.2. Síntese de cDNA 24
4.6.3. Nested PCR 24
4.6.4. Análise dos produtos da RT-nested PCR 25
4.7. Sequenciamento de genes 26
5. RESULTADOS 27
5.1. Prevalência da infecção pelo BRSV 27
5.2. Análise dos fatores de risco 31
5.3. Técnica de RT-nested PCR 36
5.4. Sequenciamento de genes 39
6. DISCUSSÃO 44
6.1. Prevalência sorológica e fatores de risco de infecção pelo BRSV 44
6.2. Técnica de RT-nested PCR 48
6.3. Sequenciamento de genes 50
7. CONCLUSÕES 52
8. REFERÊNCIAS 53
9. APÊNDICE 70

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 027713/10 do trabalho de pesquisa intitulado **"Caracterização epidemiológica e riscos associados ao vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em rebanhos bovinos do Estado de São Paulo"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Samir Issa Samara está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 17 de dezembro de 2010.

Jaboticabal, 20 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUEA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 - www.fcav.unesp.br

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO – O vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), agente etiológico relacionado à doença respiratória bovina, causa grandes prejuízos econômicos principalmente na criação de bezerros. O BRSV já foi relatado no Brasil com prevalências sorológicas elevadas, no entanto, ainda não foram determinados os fatores de risco envolvidos na disseminação do vírus nos rebanhos brasileiros e poucas amostras do vírus foram caracterizadas. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a epidemiologia da infecção pelo BRSV em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo (SP), por meio da análise sorológica e de fatores de risco, e também pelo vírus circulante nesses rebanhos. Foram colhidas 1.243 amostras de sangue e 352 amostras de secreções nasais de bovinos em 26 propriedades rurais, divididas nas regionais de Jaboticabal, São José do Rio Preto e Catanduva, localizadas na região norte do Estado SP. Durante a colheita das amostras, foi aplicado um questionário ao proprietário sobre informações relacionadas como prováveis fatores de risco para a infecção pelo BRSV em cada propriedade. Os soros foram analisados pela técnica de virusneutralização (VN) e as amostras de secreções nasais foram examinadas para detecção do gene das proteínas F e G do BRSV pela RT-nested PCR. Os resultados da VN mostraram elevada prevalência de BRSV nos rebanhos leiteiros, com total de 79,49% de reagentes. Os resultados separados por regionais revelaram prevalências de 76,19%, 83,68% e 69,14% de soropositivos, para Jaboticabal, São José do Rio Preto e Catanduva, respectivamente. Os rebanhos da regional de São José do Rio Preto apresentaram maiores prevalências de BRSV quando comparados aos rebanhos das outras duas regionais. A análise dos fatores de risco permitiu inferir que a idade dos animais e a ocorrência de infecção concomitante pelo herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina estão associadas à alta prevalência de BRSV, enquanto o aleitamento natural de bezerros foi identificado como fator protetivo. A RT-nested PCR detectou uma amostra positiva para o gene da proteína F, e após o seu sequenciamento, a relação genética da amostra com as demais sequências classificou-a como não tipável. Conclui-se que, apesar da alta prevalência sorológica do BRSV encontrada nos rebanhos leiteiros do estudo, existe dificuldade em estabelecer os fatores de risco envolvidos na disseminação do agente. No entanto, a caracterização de uma amostra de vírus diferente das relatadas mostra a capacidade evolutiva do BRSV nos rebanhos e a necessidade de se conhecer mais profundamente os tipos circulantes em uma determinada área para recomendar medidas de profilaxia adequadas.

Palavras-chave: doença respiratória bovina, fatores de risco, RT-nested PCR, prevalência, subgrupo, virusneutralização

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV) INFECTION IN DAIRY HERDS OF SÃO PAULO STATE

ABSTRACT – Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), agent related to bovine respiratory disease, causes large economic losses mainly in calf rearing. BRSV has already been reported in Brazil with high serological prevalence, however, the risk factors related to its dissemination were not yet determined and a few number of virus strains was characterized in Brazilian herds. Thus, the study aimed to characterize the epidemiology of BRSV infection in dairy herds of São Paulo State, using serological and risk factors analysis, and also by virus circulating in these herds. For that, 1.243 blood samples and 352 nasal secretion samples were collected of animals from 26 farms divided into Jaboticabal, São José do Rio Preto and Catanduva regional, located in the northern region of São Paulo State. During the sample collection, a questionnaire was performed to the owner for each property regarding information about possible risk factors for BRSV. Sera were analyzed using virus neutralization test (VNT), and nasal secretions were examined to detect the F and G protein gene of BRSV by RT-nested PCR. VNT results showed high BRSV prevalence in dairy herds, reaching 79.49% of reagents. The separated results by regional revealed prevalence of 76.19%, 83.68% and 69.14% for Jaboticabal, São José do Rio Preto and Catanduva, respectively. The herds in the regional of São José do Rio Preto showed the highest prevalence of BRSV when compared to the other two regional herds. The analysis of risk factors allowed deducing that the age of the animals and the occurrence of concomitant infection by bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea are associated with the high BRSV prevalence, while calving natural lactation was identified as a protective factor. The RT-nested PCR detected a positive sample for the F protein gene, and after its sequencing, the genetic relatedness of the sample to the other sequences, classified it as untyped. We concluded that, despite the high BRSV seroprevalence found in dairy herds in the study, there is difficulty in establishing the risk factors involved in the spread of the agent. However, the characterization of a virus sample different than those reported shows the evolutionary capacity of BRSV in herds and the necessity for greater knowledge of the circulating types in a particular area to recommend appropriate prophylactic measures.

Keywords: bovine respiratory disease, risk factors, RT-nested PCR, prevalence, subgroup, virus neutralization test

LISTA DE ABREVIATURAS

BoHV-1 – herpesvirus bovino tipo 1
BRSV – vírus respiratório sincicial bovino
BVDV – vírus da diarreia viral bovina
CATI – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral
cDNA – DNA complementar
CRIB – linhagem de células de rim de bovino resistente ao BVDV
CRSV – vírus respiratório sincicial caprino
dNTP – desorribonucleotídeo trifosfatado
DRB – doença respiratória bovina
ELISA – ensaio imunoenzimático
HRSV – vírus respiratório sincicial humano
IC – intervalo de confiança
MDBK – “Madin and Darby Bovine Kidney”
MEM – “Minimum Essential Medium”
ORSV – vírus respiratório sincicial ovino
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia pela polimerase
PI-3 – vírus da parainfluenza bovina tipo 3
RNA – ácido ribonucleico
RR – risco relativo
RT – transcriptase reversa
RT-PCR – reação em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa
SFB – soro fetal bovino
$TCID_{50}$ – dose infectante em cultura de tecidos 50%
TEB – tampão tris/borato/EDTA
Tris-HCL – “Trishydroxymethylaminomethane hydrochloride”
VN – virusneutrazalização
X^2 – qui-quadrado

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Distribuição e quantidade de amostras de sangue e de secreção nasal colhidas de bovinos em 26 propriedades rurais localizadas na região norte do Estado de São Paulo, durante os períodos de março e junho de 2011 e março e junho de 2012.. 16

Tabela 2. Iniciadores utilizados na nested PCR para os genes das proteínas F e G, segundo Vilcek et al. (1994), em amostras de secreção nasal colhidas de bezerros, em rebanhos da região norte do Estado de São Paulo, nos anos de 2011 e 2012... 25

Tabela 3. Valores consolidados da quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos das regionais de Jaboticabal, São José do Rio Preto e Catanduva, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012... 28

Tabela 4. Quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos da regional de Jaboticabal, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012... 29

Tabela 5. Quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos da regional de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012. 30

Página

Tabela 6. Quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos da regional de Catanduva, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012... 31

Tabela 7. Distribuição dos resultados do teste de Qui-quadrado (X^2) dos fatores de risco relacionados às características individuais dos 1.243 animais amostrados, risco relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) a 95% e valor de p..... 32

Tabela 8. Distribuição dos resultados do teste exato de Fisher dos fatores de risco gerais e de manejo relacionados às características comuns a todos os animais de cada rebanho, risco relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) a 95% e valor de p... 33

Tabela 9. Distribuição dos resultados do teste exato de Fisher dos fatores de risco de sanidade e cuidados com bezerros relacionados às características comuns a todos os animais de cada rebanho, risco relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) a 95% e valor de p.. 33

Tabela 10. Isolados de referência do BRSV, ORSV e HRSV, bem como origem e número de acesso no "GenBank" utilizados para comparação no dendrograma.. 40

Tabela 11. Identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre a amostra BRSV-UnespJab-1 e estirpes representativas dos subgrupos do BRSV..... 43

Tabela 12. Valores de distância genética intrassubgrupos e entre subgrupos do BRSV. 44

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Mapa gerado pelo programa Epi Info™ versão 7.0, mostrando os locais conforme as prevalências sorológicas de BRSV (≥80%, alta em vermelho e <80%, baixa em verde) das 26 propriedades rurais visitadas, das regionais de Jaboticabal, Catanduva e São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, entre março e junho de 2011 e março e junho de 2012.....35

Figura 2. Produto da amplificação do gene F do BRSV de 481pb em uma amostra de suabe nasal. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder, Invitrogen. CP: controle positivo, BRSV ATCC VR-1485. Linha 1: amostra positiva. Linhas 2, 3 e 4: amostras negativas. CN: controle negativo ("mix" de reação sem DNA).....36

Figura 3. Produto da amplificação do gene G do BRSV de 371pb. A amostra de suabe nasal positiva para o gene F não amplificou este gene. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder, Invitrogen. CP: controle positivo, BRSV ATCC VR-1485. Linha 1: amostra de suabe nasal (positiva para o gene F). Linhas 2 e 3: amostras negativas. CN: controle negativo ("mix" de reação sem DNA).....37

Figura 4. Animais jovens (A) e adultos (B) pertencentes à propriedade 25, onde foi detectada uma amostra positiva na RT-nested PCR para o gene da proteína F, Município de Sales, regional de Catanduva, Estado de São Paulo, 2012. 38

Página

Figura 5. Dendrograma construído pelo método “neighbor-joining” formado por sequências dos genes da proteína F representando as relações filogenéticas entre a amostra BRSV-UnespJab-1 e 28 amostras de referência distribuídas mundialmente. Os números de acesso no “GenBank” estão fornecidos para cada sequência junto com o nome da estirpe correspondente. A amostra BRSV-UnespJab-1 está indicada com um triângulo. Como grupos externos, foram utilizadas sequências do gene da proteína F do ORSV e HRSV. 41

Figura 6. Sequências de nucleotídeos do gene da proteína F (região 204-600) das amostras BRSV-UnespJab-1, BRSV ATCC VR-1485 e isolados de referência, representando o subgrupo AB (RB94), A (391-2) e B (BRSV-25-BR). 42

Figura 7. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos (região 61-200) que compreendem o peptídeo de fusão (KKRKRRFL), comparando as diferenças entre a amostra BRSV-UnespJab-1 com outros isolados do subgrupo AB (RB94), A (391-2) e B (BRSV-25-BR).....43

1. INTRODUÇÃO

A doença respiratória bovina (DRB) constitui-se como um dos principais obstáculos na produção de bovinos em todo o mundo. A enfermidade é desencadeada por um desequilíbrio na interação entre fatores que compreendem os microrganismos, como vírus e bactérias; fatores relacionados ao hospedeiro, como a idade do animal e condição imunológica; e, fatores relacionados ao ambiente e ao manejo, como o clima e a densidade dos animais.

Nos Estados Unidos, a DRB é a enfermidade mais comum e mais onerosa para a produção de bovinos confinados. No Brasil, não existem dados relativos aos prejuízos; no entanto, estima-se que a doença é atualmente o principal desafio relacionado à saúde animal dentro dos confinamentos. Da mesma forma, em rebanhos leiteiros criados a pasto, não há estimativa dos prejuízos causados pela DRB.

Apesar da escassez de informações, pesquisas realizadas no Brasil evidenciam a presença dos agentes infecciosos responsáveis por desencadear a enfermidade nos rebanhos bovinos. Nos últimos anos, estudos voltados ao diagnóstico do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), seja por meio do isolamento do agente, seja por meio da análise sorológica para verificar a presença de anticorpos neutralizantes, começaram a se intensificar, mostrando que esse vírus possui elevadas prevalências nos rebanhos brasileiros. Da mesma forma, pesquisas direcionadas à análise genética do vírus têm determinado diferenças daqueles relatados em outros países.

Nos rebanhos de países que possuem inverno rigoroso, as infecções pelo BRSV, na maioria das vezes, estão relacionadas a episódios de quadro clínico severo de doença respiratória, principalmente em animais jovens. Ao que tudo indica, esse vírus possui um papel importante como agente desencadeador de doença facilitando infecções secundárias, com a participação tanto de outros vírus como de bactérias, ou até mesmo de infecções associadas. Nesses países, a disseminação do BRSV está ligada principalmente a fatores ambientais e de estresse, logo após a queda brusca da temperatura ambiente, além de fatores

relacionados ao manejo dos animais, como o recolhimento e aglomeração durante o inverno.

No Brasil, o inverno não se mostra tão rigoroso como nesses países, no entanto, o estresse térmico causado por temperaturas muito elevadas também pode provocar o aparecimento da DRB. Da mesma forma, as características do sistema de produção brasileiro podem influenciar a ocorrência do BRSV nos rebanhos, já que, de acordo com as pesquisas feitas até o momento, trata-se de uma virose bastante prevalente.

Neste sentido, considerando o BRSV como um agente etiológico importante para a DRB, além da pesquisa de anticorpos específicos, torna-se necessária a investigação dos fatores de risco envolvidos na disseminação do vírus dentro dos rebanhos. O uso de técnicas de biologia molecular permite caracterizar o vírus circulante em uma determinada região na tentativa de melhor compreender sua epidemiologia e recomendar medidas de controle adequadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico do BRSV

No outono de 1955, em Washington, Estados Unidos, um episódio de doença respiratória acometeu chimpanzés pertencentes a uma colônia de um laboratório. Naquela ocasião, aparentando ser um novo vírus, ele foi denominado como agente da coriza em chimpanzés (MORRIS; BLOUNT; SAVAGE, 1956). Após o seu isolamento, pela sua característica de promover a formação de sincícios em cultivos celulares, e pelas semelhanças encontradas entre esse vírus e isolados de crianças com sintomatologia respiratória, o agente foi renomeado como vírus respiratório sincicial humano (HRSV) (CHANOCK; ROIZMAN; MYERS, 1957). A partir dessa data, estabeleceu-se a importância do HRSV como agente causador de doença respiratória em crianças em todo o mundo (CHANOCK et al., 1961).

Após um período de mais de dez anos, um vírus estreitamente relacionado ao HRSV foi isolado de bezerros durante um surto de severa doença respiratória na Suíça (PACCAUD; JACQUIER, 1970), recebendo a denominação de BRSV. Em

seguida, também foi isolado de bovinos no Japão (INABA et al., 1970) e nos Estados Unidos (ROSENQUIST, 1974). Desde então, pela falta de medidas de controle visando impedir a disseminação da enfermidade, a infecção por esse vírus tem sido relatada em vários países do mundo, seja por isolamento, seja por investigação sorológica e, recentemente, por técnicas de biologia molecular (BAKER; AMES; MARKHAM, 1985; VILCEK et al., 1994; ARNS et al., 2003; SAA et al., 2012).

No Brasil, o BRSV foi detectado pela primeira vez a partir de tecidos de pulmão de bezerros abatidos no Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 1993). Assim, seguiram-se alguns inquéritos sorológicos evidenciando que a infecção pelo BRSV está disseminada pelos rebanhos do sul e sudeste do Brasil, atingindo altas prevalências (ARNS, 1996; CAMPALANS; ARNS, 1997; AFFONSO et al., 2011). Para Flores et al. (2000), é provável que a doença venha ocorrendo nos rebanhos do sul do país desde a década de 1980.

Ao mesmo tempo, pesquisas envolvendo o uso de ferramentas de biologia molecular buscaram caracterizar o BRSV circulante nos rebanhos brasileiros. Em 1995, o vírus foi isolado e caracterizado de secreção nasotraqueal de bezerro com sinais de doença respiratória proveniente do Rio Grande do Sul (ARNS et al., 2003). Posteriormente, Almeida et al. (2006) também caracterizaram o vírus a partir de um animal com severa doença respiratória. Spilki et al. (2006) e Spilki e Arns (2008) analisaram sequências genéticas das proteínas G e F, respectivamente, de isolados brasileiros de BRSV e compararam com isolados provenientes de outros países. A análise classificou todos os isolados no mesmo subgrupo (B), o qual não era detectado desde 1970 em outras partes do mundo. Domingues, Spilki e Arns (2011) também caracterizaram amostras de BRSV, no entanto, elas eram procedentes de animais adultos sem sinais clínicos de doença respiratória, o que levou a suspeitar que a infecção pelo vírus se mantém de forma subclínica nos rebanhos brasileiros; as sequências obtidas pertenciam igualmente ao subgrupo B.

2.2. Agente etiológico

O BRSV possui muitas semelhanças com o HRSV, tanto na organização genômica como em sua estrutura viral. Também está relacionado antigenicamente

ao vírus respiratório sincicial ovino (ORSV) e ao vírus respiratório sincicial caprino (CRSV) (TRUDEL et al., 1989). O vírus pertence à ordem *Mononegavirales,* família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae,* gênero *Pneumovirus* (BUNT et al., 2005). Essa ordem compreende partículas virais compostas de RNA fita simples ("mono"), sentido negativo ("nega", sentido de leitura 3'-5') (MURPHY et al., 1995).

Na microscopia eletrônica, o BRSV apresenta-se bastante pleomórfico, com formas arredondadas com diâmetro que varia de 35 nm a 150 nm, ou formas filamentosas, com comprimento que pode chegar a 5 µm e diâmetro entre 60 nm e 100 nm (TRUDEL et al., 1989). Seu genoma é de tamanho aproximado de 15.000 nucleotídeos o qual codifica 10 RNAs mensageiros, sendo que cada um traduz uma proteína diferente (LARSEN, 2000; YUNUS et al., 2001). O envelope lipídico que envolve o vírus é derivado da membrana plasmática das células infectadas do hospedeiro e contem três glicoproteínas que estão organizadas separadamente em sua superfície na forma de espículas (VALARCHER; TAYLOR, 2007).

As proteínas de superfície desempenham importante papel na infectividade, replicação viral e resposta imune contra o vírus (FURZE et al., 1994). A proteína de fusão (F) é responsável pela penetração do vírus na célula hospedeira por meio da fusão entre as membranas do vírus e da célula. É também responsável pela fusão entre membranas celulares de células infectadas e não infectadas, dando origem às células gigantes multinucleadas, denominadas sincícios (VALARCHER; TAYLOR, 2007). O RNA mensageiro que corresponde à proteína F do BRSV compreende 1.899 nucleotídeos, e o gene contém uma única janela de leitura que prediz um polipeptídeo de 574 aminoácidos (LERCH et al., 1991).

A proteína F é considerada altamente conservada, apresentando homologia de 97% a 99% entre os isolados de BRSV (HIMES; GERSHWIN, 1992). É sintetizada como um precursor inativo (F0) que posteriormente é clivado dando origem a duas subunidades proteicas (F1 e F2) que liberam o peptídeo de fusão, responsável pela inserção da proteína na membrana celular (SCHLENDER et al., 2003; ZIMMER et al., 2003).

A proteína de adesão (G) é responsável pela interação com os receptores da membrana celular hospedeira (LEVINE; KLAIBER-FRANCO; PARADISO, 1987), e apresenta maior variação antigênica quando comparada à proteína F (FURZE et al.,

1994). O RNA mensageiro da proteína G compreende aproximadamente 838 nucleotídeos de extensão e o mesmo codifica para um polipeptídeo composto por 257 aminoácidos (LERCH; ANDERSON; WERTZ, 1990; LARSEN et al., 1998).

Uma particularidade da proteína G é que ela contém uma elevada quantidade de carboidratos, sendo que a maioria possui glicosilação semelhante à mucina, propiciando a incorporação do vírus no muco para atingir o epitélio respiratório (COLLINS, 1991; VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). A proteína G constitui o principal alvo para a neutralização viral pelo sistema imune do hospedeiro, no entanto, a produção de anticorpos neutralizantes também pode ser direcionada contra a proteína F (TAYLOR et al., 1992; TAYLOR et al., 1997; THOMAS et al., 1998).

A pequena proteína hidrofóbica (SH) é uma proteína integral de membrana cuja função ainda não foi totalmente determinada. Sua sequência de nucleotídeos varia de 462 a 566, o que codifica polipeptídeos de 81 e 73 aminoácidos, respectivamente (SAMAL; ZAMORA, 1991; ANDERSON et al., 1992). Essa proteína parece cooperar com a proteína F na fusão entre a partícula viral e a membrana celular e também na formação de sincícios (PASTEY; SAMAL, 1997; LARSEN, 2000).

Com a utilização de anticorpos monoclonais direcionados contra a proteína G em isolados do BRSV, foi possível evidenciar a presença de três diferentes subgrupos antigênicos denominados A, AB (ou intermediário) e B, sendo que alguns isolados não se enquadraram nessa classificação, por isso foram denominados de não tipáveis (FURZE et al., 1994; SCHRIJVER et al., 1996a; SCHRIJVER et al., 1996b). A importância dessa diversidade envolvendo diferenças quanto à patogenicidade e imunoprofilaxia ainda não foi totalmente compreendida, no entanto, estudos mostraram que soro policlonal obtido após vacinação contra a proteína G do BRSV do subgrupo A não reconheceu isolados do subgrupo B e não tipável (FURZE et al., 1997).

Pela análise do genoma de 54 isolados de BRSV provenientes da Europa e dos Estados Unidos e comparados a 33 sequências de nucleotídeos das proteínas F, G e N de outros isolados de BRSV obtidos de base de dados, Valarcher, Schelcher e Bourhy (2000) classificaram o vírus genotipicamente em seis grupos

distintos (I ao VI). Dessa forma, a análise filogenética utilizada por esses pesquisadores mostrou que a distribuição do BRSV parece estar associada a questões geográficas e temporais, o que foi confirmada posteriormente por pesquisas que incluíram isolados procedentes de países distintos, como Japão e Brasil (YAEGASHI et al., 2005; SPILKI et al., 2006).

Isolados pertencentes ao subgrupo A foram encontrados em alguns países europeus, Japão e Estados Unidos (FURZE et al., 1994; STINE; HOPPE; CLAYTON, 1997; LARSEN; TJORNEHOJ; VIUFF, 2000; NETTLETON et al., 2003), enquanto o AB foi relatado apenas na Europa e no Japão (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000; YAEGASHI et al., 2005). O subgrupo B foi isolado no Reino Unido na década de 1970 e posteriormente foi encontrado no Brasil (NETTLETON et al., 2003; VALARCHER; TAYLOR, 2007), de modo que todos os isolados caracterizados no país pertencem a esse subgrupo (ARNS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006; SPILKI et al., 2006; SPILKI; ARNS, 2008; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de outros subgrupos do BRSV no Brasil, pois somente quatro isolados do vírus foram caracterizados até o momento (ARNS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006; SPILKI et al., 2006; SPILKI; ARNS, 2008; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011). Como isolados do subgrupo B não eram relatados desde a década de 1970, as vacinas contra o BRSV disponíveis no mercado são fabricadas a partir de isolados pertencentes aos subgrupos A e AB por serem os subgrupos circulantes nos Estados Unidos e nos países europeus (ELLIS; HASSARD; MORLEY, 1995; WEST; ELLIS, 1997).

A evolução genética do BRSV varia de acordo com o gene, sendo o gene da proteína G o que evolui mais rapidamente, pois é altamente tolerante à fixação de mutantes (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). Desta forma, grande parte dos estudos buscando a tipificação de isolados foi direcionada a essa proteína (PROZZI et al., 1997; SCHRIJVER et al., 1998; SPILKI et al., 2006; BIDOKHTI et al., 2012). O gene da proteína F parece estar sob fortes restrições estruturais seletivas, o que pode limitar sua evolução. No entanto, apesar desses fatos, foram observadas mudanças progressivas nos acúmulos de mutações nos nucleotídeos, tanto sinônimas quanto não sinônimas, nos fragmentos dos dois genes (VALARCHER;

SCHELCHER; BOURHY, 2000). Desta forma, especula-se que o vírus esteja em constante evolução na natureza, ocasionada pela pressão seletiva exercida tanto como resultado da resposta imune induzida pelo uso de vacinas (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000) quanto pela imunidade adquirida por reinfecções nos locais onde a vacinação não é prática comum, como ocorre no Brasil (SPILKI et al., 2006; SPILKI; ARNS, 2008).

2.3. Características da infecção, controle e diagnóstico do BRSV

A infecção pelo BRSV afeta tanto bovinos criados para produção de carne quanto aqueles criados para a produção de leite (BAKER et al., 1993). Na pesquisa de Stott et al. (1980), a diferença entre a ocorrência da doença nos dois tipos de exploração é que, em bovinos de leite, ela costuma ter maior incidência em bezerros muito jovens, entre duas semanas e nove meses de idade, e em bovinos de corte, a infecção aparece mais tardiamente. Esse fato pode estar relacionado às diferenças na forma de manejo praticada entre as explorações (BAKER et al., 1993).

Nos países onde é grande a variação de temperatura durante o inverno, a infecção pelo BRSV está provavelmente relacionada à presença de fatores que aumentam a morbidade do vírus, como a aglomeração dos animais, que promove a contaminação ambiental, além do estresse térmico provocado pela queda brusca na temperatura (PIRIE et al., 1981; BOHLENDER; MCCUNE; FREY, 1982; MAHIN; SHIMI, 1982; ELVANDER, 1996). Nesses locais, a taxa de morbidade e mortalidade podem atingir 80% e 20%, respectivamente, em alguns surtos (VALARCHER; TAYLOR, 2007). No entanto, apesar de a maioria dos relatos da enfermidade ocorrer nas estações mais frias do ano, algumas infecções também podem ocorrer no verão, devido à combinação de vários fatores, entre eles a presença do agente e o estresse gerado pelo calor nos animais (ODEGAARD; KROGSRUD, 1977; BOHLENDER; MCCUNE; FREY, 1982; VAN DER POEL et al., 1993; BIDOKHTI et al., 2012). Peixoto et al. (2000) descreveram a ocorrência de infecção pelo BRSV em bezerros importados da Europa no Estado de Alagoas. Assim, as infecções pelo vírus podem ocorrer durante todo o ano e ainda em países tropicais, como o Brasil.

A transmissão do vírus ocorre por meio de secreções respiratórias e aerossóis, tanto por contato direto quanto indireto mediado por fômites (HALL; DOUGLAS, 1981; BAKER et al., 1993). O BRSV pode ser detectado em animais sem sinais clínicos da infecção (STOTT et al., 1980; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011). A elevada prevalência sorológica comparada à baixa incidência de doença clínica em alguns locais leva a suspeitar que a maioria das infecções deve ocorrer de forma subclínica (LARSEN, 2000).

A doença clínica provocada pelo BRSV é mais comum em bezerros muito jovens. Desse modo, animais adultos com infecção subclínica constituem a principal fonte de infecção, uma vez que as reinfecções pelo vírus são comuns nos rebanhos (BAKER; FREY, 1985; STOTT; TAYLOR, 1985; BAKER; AMES; MARKHAM, 1986). Para Larsen, Tjornehoj e Viuff (2000), nos surtos decorrentes de reinfecções pelo BRSV, é mais comum os rebanhos serem acometidos por novos vírus introduzidos do que por aqueles que já estavam circulando entre os animais.

Em relação à patogenia causada pelo BRSV, ela parece estar associada a mecanismos imunomediados (LARSEN, 2000). Assim, acredita-se que o vírus multiplica-se predominantemente em células ciliadas do epitélio respiratório e em pneumócitos tipo II, porém sem causar efeito citopatogênico (VALARCHER; TAYLOR, 2007). A replicação viral também tem sido responsabilizada por predispor o hospedeiro a infecções secundárias, em função da alteração dos mecanismos de defesa específicos e não específicos relacionados ao trato respiratório. Por outro lado, o BRSV não determina viremia e raramente é encontrado fora do sistema respiratório (VAN DER POEL et al., 1996; LARSEN, 2000).

Os sinais clínicos caracterizam-se por manifestações respiratórias, inicialmente com intensidade suave, como descargas nasais e oculares, podendo o quadro se agravar até o surgimento de pneumonia (BAKER et al., 1993). Nessa situação, a presença de outros agentes etiológicos é muito comum, como as bactérias *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Salmonella Dublin* e o *Mycoplasma*, além de outros agentes virais, como o herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (PI-3), que podem agravar ainda mais o quadro da DRB

(DURHAM; HASSARD, 1990; OBANDO et al., 1999; SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; YESILBAG; GÜNGÖR, 2008).

Nos rebanhos, para a prevenção ou o controle da enfermidade, podem-se empregar vacinas vivas atenuadas ou inativadas, cujo uso tem vantagens e desvantagens (BAKER et al., 1993). Para Valarcher e Taylor (2007), as vacinas vivas atenuadas são as mais eficientes, porém o uso delas possui resultados controversos. Tanto é que alguns estudos revelam níveis de proteção vacinal diferentes (TAYLOR et al., 1984; FULTON et al., 1995; GERSHWIN et al., 1998), e outros mostraram inclusive que a vacinação pode resultar em doença em alguns animais (GERSHWIN et al., 1998; KIMMAN et al., 1989). Na Europa e nos Estados Unidos, o uso de vacinas vivas atenuadas pode ter contribuído para geração de mutantes do vírus (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). No Brasil, a vacinação não é muito utilizada nos rebanhos, e quando ocorre, é com vírus inativado e combinado com outros vírus e bactérias.

A presença de variabilidade antigênica do BRSV também deve ser levada em consideração no sucesso da vacinação, pois ainda que exista imunidade sorológica cruzada, não se sabe ao certo os graus de proteção entre os subgrupos (SPILKI; ARNS, 2008).

Para o diagnóstico do BRSV, os testes mais acessíveis e rápidos são os que detectam a presença de anticorpos específicos no soro sanguíneo dos animais. Nesse sentido, o teste de virusneutralização (VN) é considerado uma prova padrão, de alta sensibilidade, principalmente para uso em estudos de determinação de soroprevalência (WESTENBRINK et al., 1985). O ensaio imunoenzimático (ELISA) também pode ser empregado para essa finalidade, porém a produção de antígeno adequado para esse teste pode ser um fator limitante para muitos laboratórios (DUBOVI, 1993). O ELISA também está disponível no mercado por meio de “kits” comerciais prontos, no entanto, muitas vezes os custos são muito elevados.

O método clássico de diagnóstico do BRSV é o isolamento viral utilizando cultivos celulares. No entanto, é considerado um método muito trabalhoso, pois muitas vezes necessita de várias passagens do material suspeito nos cultivos antes da visualização do efeito citopatogênico (POTGIETER; ALDRIDGE, 1977), além da

necessidade de ser realizado imediatamente após a colheita das amostras, para obter melhores resultados (PIRIE et al., 1981; THOMAS; STOTT, 1981).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR), técnica de biologia molecular embasada na detecção e identificação do ácido nucleico, vem sendo amplamente utilizada nas pesquisas com BRSV (OBERST et al., 1993; VILCEK et al., 1994; LARSEN et al., 1999; VALARCHER et al., 1999; ALMEIDA et al., 2005; DOMINGUES; SPILKI; ARNS, 2011). Pela característica de promover a amplificação de inúmeras cópias de um determinado segmento do vírus, mesmo sem viabilidade da partícula viral, torna-se muito vantajosa como método de diagnóstico (FURZE et al., 1997). No caso do BRSV, por ser um RNA vírus, este inicialmente precisa ser convertido em um DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa (RT), e assim a reação de PCR denomina-se por RT-PCR (MAHONY, 1996). Variações da técnica, como a “nested” PCR, podem aumentar significativamente a sensibilidade do teste, principalmente quando utilizado em amostras colhidas por meio de suabes nasais e lavados traqueais, em animais apresentando ou não sinais clínicos respiratórios, sem a necessidade de amplificação viral em cultivos celulares. Nesse sentido, os alvos preferíveis para detecção são os genes das proteínas F e G (OBERST et al., 1993; VILCEK et al., 1994; ALMEIDA et al., 2005) e também o gene da proteína N do BRSV (VALARCHER et al., 1999; VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). Ainda, a PCR se torna essencial para o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento genômico, que permite a análise da variabilidade das amostras de BRSV (VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000).

2.4. Ocorrência do BRSV e fatores de risco

A ocorrência da infecção pelo BRSV tem sido relatada há muito tempo em vários países do mundo. Os primeiros trabalhos realizados buscaram isolar e identificar o agente etiológico (INABA et al., 1970; PACCAUD; JACQUIER, 1970; ROSENQUIST, 1974), entretanto, análises sorológicas foram desenvolvidas com o passar dos anos, facilitando a forma de diagnóstico do BRSV nos rebanhos. Assim, grande parte das pesquisas feitas sobre esse vírus até o momento foi embasada nas prevalências sorológicas da infecção.

Nos inquéritos sorológicos realizados mundialmente, as taxas de prevalência encontradas para o BRSV foram bastante elevadas. Nos Estados Unidos, onde foram feitos os primeiros estudos, a prevalência de BRSV esteve entre 38% e 81% (ROSSI; KIESEL, 1974; MOHANTY; INGLING; LILLIE, 1975; SMITH; FREY; DIERKS, 1975; POTGIETER; ALDRIDGE, 1977). No Canadá, Elazhary et al. (1980) relataram prevalência de 35,9%, enquanto Durham e Hassard (1990) descreveram 78,5%. Nos países europeus, as prevalências de BRSV encontradas nos primeiros estudos atingiram taxas de 94% (PERRIN; DANNACHER; SOLSONA, 1979; MARTIN, 1983).

Levando em consideração a alta prevalência da enfermidade, várias pesquisas buscaram determinar os fatores de risco envolvidos na epidemiologia do BRSV. Na Europa, Elvander (1996) relatou surtos de doença respiratória causada pelo BRSV em rebanhos leiteiros da Suécia, com prevalências de até 89%. Os surtos ocorreram predominantemente em locais onde foram adquiridos novos animais e em áreas onde havia maior densidade populacional de bovinos. Nesse mesmo país, Ohlson et al. (2010) também constataram a presença de fatores de risco, como rebanhos com grande número de animais, localização geográfica da propriedade (sul do país) e presença de fômites, relacionados à alta prevalência da infecção.

Na Noruega, dados relativos a 431 rebanhos foram analisados e concluiu-se que surtos de doença respiratória eram mais prováveis em rebanhos maiores e nos locais onde havia tipo de exploração mista (carne e leite) (NORSTRÖM; SKJERVE; JARP, 2000). Ainda na Europa, foram analisadas para o BRSV 573 amostras colhidas de 59 rebanhos italianos, resultando em 69,1% de soropositivos (LUZZAGO et al., 2010). Nesse caso, o manejo com pastejo de verão e a infecção concomitante com BVDV foram relacionados como prováveis fatores de risco para o BRSV. Na Turquia, Yesilbag e Güngör (2008) investigaram 584 amostras provenientes de bovinos de 39 propriedades e encontraram 73% de amostras reagentes ao BRSV. Para esses autores, as maiores prevalências de infecção foram relatadas em propriedades com maior número de animais.

Estudos equivalentes aos descritos também foram realizados em alguns países da América Latina, e as altas prevalências de BRSV encontradas nos

rebanhos sustentam a hipótese de que a maior parte dos animais já foi exposta à infecção pelo vírus. Obando et al. (1999) realizaram, na Venezuela, a primeira pesquisa no intuito de detectar anticorpos contra o BRSV. De 615 amostras de soro analisadas, 85% foram reagentes ao BRSV. Nos rebanhos do Uruguai, a primeira evidência sorológica de infecção pelo BRSV resultou em uma taxa de prevalência de 95% (COSTA et al., 2000).

Em rebanhos de corte no México, Solís-Calderón et al. (2007) detectaram 90,8% de reagentes ao BRSV em 746 amostras provenientes de 54 rebanhos. Por meio da análise de fatores de risco, os autores concluíram que rebanhos com grande número de animais e animais mais velhos são os que possuem maiores chances de serem soropositivos. Nesse mesmo país, Figueroa-Chávez et al. (2012) determinaram 52,2% de reagentes ao BRSV em 232 amostras de soro procedentes de 44 rebanhos de exploração mista. No estudo, somente a idade (animais mais velhos) foi determinante como fator de risco para o BRSV.

No Equador, a prevalência de BRSV encontrada por Saa et al. (2012) em 2.367 amostras oriundas de 346 rebanhos foi de 80,48%. Nesse país, nos rebanhos de fazendas limítrofes com outros rebanhos, tipo de exploração mista e localização em altas altitudes possuíam maiores chances de infecção pelo BRSV.

No Brasil, os resultados das pesquisas de soroprevalência não foram diferentes daqueles descritos nos países vizinhos e nos demais países do mundo. No Estado de São Paulo, Arns (1996) mostrou em rebanhos de leite e de corte a ocorrência do BRSV em animais com ou sem sinais clínicos da enfermidade, que alcançaram 80% de soropositividade. Campalans e Arns (1997) encontraram 68% de reagentes em 864 amostras provenientes de 65 fazendas localizadas no sul do Brasil. Em pesquisa de Affonso et al. (2011), foram encontradas 45,61%, 59,09% e 84,42% de prevalência de BRSV em três rebanhos leiteiros da região nordeste do Estado de São Paulo, sendo a mais alta constatada em um rebanho com maior número de animais.

Os inquéritos sorológicos realizados até o momento pressupõem que o BRSV esteja disseminado em grande parte do rebanho brasileiro. Porém, no Estado de São Paulo, particularmente nas propriedades que criam bovinos para a produção de leite, poucos estudos foram feitos com a finalidade de caracterizar o agente

nesse tipo de exploração e, até o momento, nenhuma pesquisa foi realizada para determinar possíveis fatores de risco envolvidos na epidemiologia do BRSV.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar epidemiologicamente a infecção pelo BRSV em rebanhos bovinos leiteiros de alguns municípios do Estado de São Paulo.

3.2. Específicos

- Verificar a ocorrência de anticorpos neutralizantes e determinar a soroprevalência de BRSV nos rebanhos bovinos
- Determinar os fatores de risco envolvidos na disseminação da infecção pelo BRSV nas propriedades
- Pesquisar a presença do agente etiológico nos bovinos e caracterizar molecularmente as amostras de BRSV detectadas

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Propriedades

O trabalho foi desenvolvido em propriedades rurais que recebiam supervisão técnica de profissionais vinculados às unidades regionais da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) – Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, de Jaboticabal, São José do Rio Preto e Catanduva. As propriedades possuíam rebanhos criados para produção de leite, com população entre seis e 150 animais, e faziam parte do Projeto CATI Leite, onde já estavam sendo desenvolvidas atividades de assistência técnica, como o controle de brucelose e tuberculose nos rebanhos, a utilização de pasto rotacionado e a introdução de conceitos de bem-estar animal.

Os técnicos da CATI convidavam os produtores rurais para participarem do estudo, e, no caso de concordância, as visitas eram agendadas de acordo com a disponibilidade dos produtores, dos técnicos e das condições meteorológicas favoráveis. Desta forma, foram selecionadas 26 propriedades rurais, sendo oito localizadas na regional de Jaboticabal, 12 na regional de São José do Rio Preto e seis na regional de Catanduva.

As propriedades estavam distribuídas em 12 municípios localizados na região norte do Estado de São Paulo, mencionados na Tabela 1. Essas áreas, sem muita variação de altitude (440 a 617 metros), recebem classificação climática de Koeppen do tipo Aw (tropical chuvoso), que é caracterizada por inverno seco e mês mais frio com temperatura média superior a 18ºC, além de o mês mais seco apresentar precipitação inferior a 60 mm (CEPAGRI, 2013).

Nenhuma das propriedades que fizeram parte do estudo utilizava a vacinação contra agentes etiológicos responsáveis por determinar doença respiratória nos animais, entre elas o BRSV.

4.2. Amostragem e colheita de material

O número de amostras de sangue colhidas para a determinação da soroprevalência de BRSV por rebanho foi embasado na metodologia descrita em Astudillo (1979), utilizando a fórmula $\mathbf{n = Z^2.pq\ /\ (p.d/100)^2}$. Nesta fórmula, **n** representa o número de amostras, **Z** é igual a **1 - α** (um menos alfa) e refere-se ao grau de confiança, **p** é a estimativa de animais positivos para BRSV (80%), de acordo com trabalhos realizados anteriormente no Estado de São Paulo (ARNS, 1996), **q** é igual a **1-p** e **d** é o erro admitido (10%). O valor de **Z** foi obtido a partir de tabelas sobre a curva de distribuição normal. Utilizou-se um nível de confiança de **α = 0,05** (95%). Após a aplicação da fórmula, o **n** encontrado foi corrigido de acordo com o número de animais de cada propriedade, utilizando a fórmula $\mathbf{n_c = n\ /\ 1 + (n\text{-}1/N)}$, em que **N** representa o total de animais. Deste modo, após a definição da quantidade de amostras em cada fazenda, animais de todas as categorias e faixas etárias foram escolhidos de forma aleatória para a colheita. Nas fazendas com número reduzido de animais (< 30), foram colhidas amostras de todos

os animais do rebanho. Em algumas propriedades colheu-se maior número de amostras do que aquela sugerida pelo cálculo matemático, pois elas também foram utilizadas para o diagnóstico sorológico de BoHV-1 e BVDV. Além das amostras de sangue, também foram colhidas amostras de secreção nasal de bezerros, desde recém-nascidos até um ano de idade.

As colheitas foram realizadas em dois períodos, sendo o primeiro entre março e junho de 2011 e o segundo, entre março e junho de 2012. Ao todo foram colhidas 1.243 amostras de sangue, para as análises sorológicas, e 352 amostras de secreções nasais, para as análises de detecção e caracterização molecular, conforme distribuição apresentada na Tabela 1.

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular ou coccígea utilizando agulhas específicas 25x8 mm descartáveis e tubos siliconados “vacutainer” (BD®, Estados Unidos). Os frascos com sangue permaneceram à temperatura ambiente por 1 hora para coagulação e, depois de transportados para o laboratório, foram centrifugados a 1.080 x g. Os soros foram armazenados em microtubos tipo “eppendorf” de 1,5 mL, identificados e conservados em freezer à temperatura de -20°C até o momento de serem testados. As secreções nasais foram colhidas por fricção de suabes estéreis no interior das narinas dos bezerros e depois acondicionadas em tubos tipo “eppendorf” estéreis, livres de DNAses e RNAses (Axygen®, Estados Unidos), sem meio de transporte. Imediatamente após a colheita, as amostras foram transportadas em gelo para o laboratório e armazenadas em freezer à temperatura de -80°C até serem processadas.

Tabela 1. Distribuição e quantidade de amostras de sangue e de secreção nasal colhidas de bovinos em 26 propriedades rurais localizadas na região norte do Estado de São Paulo, durante os períodos de março e junho de 2011 e março e junho de 2012.

Propriedade	Regional	Município	Total animais rebanho	Nº de amostras Sangue		Nº de amostras secreção nasal
				Adultos	Bezerros	
1	Jaboticabal	Jaboticabal	75	47	25	25
2	Jaboticabal	Guariba	38	21	14	14
3	Jaboticabal	Jaboticabal	88	50	23	23
4	Jaboticabal	Guariba	55	31	20	20
5	Jaboticabal	Jaboticabal	50	25	19	19
6	Jaboticabal	Guariba	120	41	25	25
7	Jaboticabal	Jaboticabal	7	5	2	2
8	Jaboticabal	Taquaritinga	9	9	0	0
9	S.J.RioPreto	Potirendaba	120	85	16	16
10	S.J.RioPreto	Potirendaba	150	81	37	37
11	S.J.RioPreto	Bady Bassit	36	24	12	12
12	S.J.RioPreto	Potirendaba	120	83	36	36
13	S.J.RioPreto	Ipiguá	80	59	18	18
14	S.J.RioPreto	Ipiguá	40	28	3	3
15	S.J.RioPreto	S.J.RioPreto	40	26	9	9
16	S.J.RioPreto	N. Granada	15	10	5	5
17	S.J.RioPreto	Mirassol	26	20	6	6
18	S.J.RioPreto	Bady Bassit	15	12	3	3
19	S.J.RioPreto	S.J.RioPreto	60	37	13	13
20	S.J.RioPreto	Ipiguá	100	61	27	27
21	Catanduva	Itajobi	16	11	5	5
22	Catanduva	Itajobi	6	6	0	0
23	Catanduva	N. Horizonte	52	37	11	11
24	Catanduva	N. Horizonte	22	19	3	3
25	Catanduva	Sales	62	44	17	17
26	Catanduva	N. Horizonte	22	19	3	3
Total				**891**	**352**	**352**

4.3. Processamento das amostras de soro sanguíneo: Técnica de virusneutralização (VN)

Para a pesquisa de anticorpos contra o BRSV nas 1.243 amostras de soro sanguíneo utilizou-se o teste de VN. As análises sorológicas foram realizadas no Laboratório de Viroses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/Unesp, utilizando a estirpe de BRSV

ATCC VR-1485 gentilmente cedida pela Drª. Edviges Maristela Pituco, do Laboratório de Viroses dos Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo. Essa amostra havia sido propagada anteriormente em células CRIB (linhagem de células de rim de bovino resistente ao BVDV) e já estava adaptada para o uso em células Madin and Darby Bovine Kidney (MDBK). A técnica de VN seguiu o protocolo padronizado no Instituto Biológico de São Paulo.

4.3.1. Manutenção das culturas celulares

Células de linhagem permanente MDBK foram utilizadas para a realização do teste de VN e multiplicação da estirpe do BRSV. As monocamadas celulares eram mantidas em garrafas de poliestireno de 75 cm^2 (TPP®, Suíça), contendo meio de manutenção "Minimum Essential Medium" (Eagle-MEM) Gibco® (Invitrogen™, Estados Unidos), filtrado, sem adição de antibióticos, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio, mantido em pH 7 e enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®, Brasil). A cada 48 horas repetia-se o processo de replicação celular, que consistia em descarte do meio de manutenção, lavagem dupla do tapete celular com tripsina-versene (Difco™, Estados Unidos) a 0,2% aquecida e, numa terceira vez, a tripsina era mantida sobre a monocamada por 5 minutos, para causar a individualização e o desprendimento das células. Após esse período, a tripsina era desprezada, as garrafas batidas e as células ressuspendidas em certa quantidade de meio Eagle-MEM para contagem em câmaras de Neubauer, utilizando azul de Tripan como corante. Depois de realizada a contagem e os cálculos de rendimento da suspensão celular, para as reações de VN preparava-se uma suspensão com 3 x 10^5 células/mL, e para outros subcultivos, 2 x 10^5 células/mL, os quais recebiam meio de manutenção. As garrafas com os subcultivos eram colocadas em estufa à temperatura de 37ºC para formação de novas monocamadas celulares.

4.3.2. Amplificação viral

Para formação de estoque viral e uso na VN, o amostra de vírus foi multiplicada sucessivamente em células MDBK. A amplificação do BRSV era

realizada em monocamada celular preparada com 24 horas de antecedência, na concentração de 2 x 10^5 células/mL, em frascos de poliestireno de 25 cm^2 e 75 cm^2. Assim, após desprezado o meio de manutenção, 1 mL do vírus era depositado dentro da garrafa e esta incubada em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO_2 à temperatura de 37ºC, durante um período de 60 minutos, para adsorção das partículas virais às células. Transcorrido esse tempo, eram adicionados à garrafa 9 mL de meio de manutenção e esta era novamente colocada em incubação à temperatura de 37ºC. Observava-se a garrafa diariamente para visualização da formação de sincícios em microscópio invertido (Coleman, Brasil). Quando os sincícios ocupavam aproximadamente 80% da monocamada celular, período que variava de 5 a 7 dias, a garrafa era congelada à temperatura de -80°C e descongelada rapidamente à temperatura de 37ºC para ocasionar o rompimento das células e liberação das partículas virais. Posteriormente, este material era submetido à centrifugação refrigerada (4ºC) a 5.000 x g por 15 minutos para decantação dos restos celulares. O sobrenadante contendo o vírus era separado, distribuído em criotubos em alíquotas de 1 mL, e armazenado em botijões contendo nitrogênio líquido, à temperatura de -196ºC.

4.3.3. Determinação do título infectante viral

Depois de realizada a amplificação viral, uma ampola do vírus armazenada em nitrogênio líquido era titulada para uso no teste de VN. Inicialmente, após descongelamento do criotubo à temperatura de 37°C, 500 µL de vírus eram adicionados a 4,5 mL de meio Eagle-MEM em tubo de ensaio imerso em gelo, para diluição seriada do vírus na base 10 (10^{-1} a 10^{-8}). Depois, 50 µL das diluições do vírus foram distribuídos em uma microplaca descartável de poliestireno com 96 cavidades (TPP®, Suíça), ocupando 64 cavidades (colunas 1 a 8), começando a distribuição da última (10^{-8}) para a primeira diluição (10^{-1}), onde anteriormente haviam sido adicionados 50 µL de meio Eagle-MEM. Por último, eram adicionados 50 µL de suspensão de células MDBK em uma concentração de 3 x 10^5 células/mL. As duas últimas colunas da placa (colunas 11 e 12) eram utilizadas para controle celular contendo 50 µL de suspensão de células e 100 µL de meio Eagle-MEM por

cavidade. A placa era então mantida sob a temperatura de 37ºC em incubadora com atmosfera controlada de 5% de CO_2, por 96 horas. A leitura do resultado era feita pela visualização da formação de sincícios em microscópio invertido. O cálculo do título infeccioso do vírus, capaz de determinar 50% de destruição na cultura de células ($TCID_{50\%}$), foi realizado pelo método de Reed e Muench (1938).

4.3.4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes

Os soros armazenados em freezer à temperatura de -20ºC eram descongelados em temperatura ambiente e colocados em banho-maria a 56ºC por 30 minutos para inativação do sistema complemento. Enquanto isso, na primeira coluna de uma microplaca de 96 cavidades, eram adicionados 100 µL de meio Eagle-MEM acrescido de 1% de uma solução de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL) (Cultilab®, Brasil), e 50 µL nas colunas de 2 a 12, excetuando a coluna 3. Depois de inativados, eram adicionados 50 µL de soro nas colunas 2 e 3. A partir da coluna 3 (diluição 1:2), era feita a diluição seriada do soro até a coluna 12 (diluição 1:1024), e após a diluição, 50 µL de suspensão viral de BRSV, ajustados a uma concentração de 200 $TCID_{50}$, eram adicionados a essas cavidades. A microplaca era incubada por 60 minutos em estufa com tensão controlada de 5% de CO_2 à temperatura de 37ºC. Após esse período, eram acrescentados às cavidades da microplaca 50 µL de uma suspensão de células MDBK, na concentração de 3 x 10^5 células/mL. Esta era novamente incubada nas mesmas condições por um período de 96 horas. Transcorrido esse tempo, a leitura da microplaca era realizada em microscópio invertido, verificando primeiro as cavidades do controle da suspensão celular e do controle de toxicidade do soro teste (colunas 1 e 2), para em seguida verificar a presença ou não da formação de sincícios nas outras cavidades.

Considerou-se reagente a amostra de soro que promoveu neutralização total de 200 $TCID_{50}$ do BRSV a partir da diluição 1:2. Amostras de cada animal foram testadas em duplicata na mesma microplaca, e o título, expresso como o inverso da diluição em que foi verificada a neutralização viral, foi calculado por meio de média geométrica.

4.3.5. Controle das $TCID_{50}$

Para todos os testes de VN realizados era preparada uma microplaca de retrotitulação e controle de $TCID_{50}$. Como para o BRSV o intervalo de variação aceito é de 20 a 200 $TCID_{50}$, utilizava-se a mesma diluição que definiu as 200 $TCID_{50}$ na microplaca de validação do teste e, a partir desta, eram obtidas diluições de 20 $TCID_{50}$, 2,0 $TCID_{50}$ e 0,2 $TCID_{50}$. Assim, em uma microplaca de 96 cavidades já adicionadas de 50 µL de meio Eagle-MEM, 50 µL das diluições das doses infectantes eram adicionadas por cavidade às quatro primeiras colunas, sendo 0,2 $TCID_{50}$, 2,0 $TCID_{50}$, 20 $TCID_{50}$ e 200 $TCID_{50}$, respectivamente. Da sexta à nona coluna era feito o controle do título viral da mesma forma descrita no item 4.3.3. Desta forma, a partir do conhecimento do título utilizado no teste, preenchiam-se as cavidades (50 µL) com diluições próximas àquelas do título viral. A quinta e a décima colunas permaneciam vazias e as duas últimas eram destinadas ao controle da suspensão celular.

Após incubação em estufa a 37°C com tensão controlada de 5% de CO_2 por 60 minutos, eram adicionados a todas as cavidades 50 µL de suspensão celular contendo 3×10^5 células/mL. Por fim, essa placa era incubada junto com as demais descritas no item 4.3.4. por 96 horas, e sua leitura era feita anteriormente a elas, pois os resultados nela encontrados validavam ou não o teste realizado.

4.4. Análise estatística dos resultados da VN

A análise estatística pelo teste exato de Fisher foi utilizada para comparar animais reagentes e não reagentes ao BRSV na VN, entre as propriedades das regionais de Jaboticabal, São José do Rio Preto e Catanduva. As análises foram feitas pelo programa GraphPad Prism® versão 5.0, com intervalo de confiança de 95%.

4.5. Determinação de fatores de risco

Durante as visitas às propriedades para a colheita de amostras, um questionário foi aplicado ao proprietário de cada fazenda com a finalidade de indicar possíveis fatores de risco relacionados à epidemiologia do BRSV naqueles locais (APÊNDICE). Assim, o questionário foi elaborado de acordo com dados referentes aos fatores de risco já descritos na literatura por diversos autores (SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; LUZZAGO et al., 2010; OHLSON et al., 2010; SAA et al., 2012) e também com informações relacionadas às condições de criação dos rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo.

As variáveis questionadas compreenderam:

- Dados gerais da propriedade: tamanho do rebanho ($\leq$75, >75 animais), densidade ($\leq$5, >5 animais/hectare);
- Informações do rebanho: idade dos animais ($\leq$1, >1 ano), raça predominante (Holandesa, Mestiça);
- Medidas de manejo: tipo de reprodução (monta natural, inseminação artificial), compra de animais (últimos seis meses) (sim, não), frequência de limpeza das instalações (diária, esporádica);
- Sanidade: histórico de doença respiratória em bezerros e animais adultos (últimos seis meses) (sim, não), histórico de diarreia em bezerros (últimos seis meses) (sim, não), utilização de quarentena (sim, não), isolamento de animais doentes (sim, não), histórico de aborto (sim, não), presença de BoHV-1 e BVDV (sorologia) (sim, não);
- Cuidados com bezerros: tipo de bezerreiro (individual, coletivo), tipo de aleitamento (natural, artificial), mistura de bezerros com animais adultos (sim, não).

Nos cuidados com os bezerros, as variáveis desinfecção do umbigo e administração de colostro não foram analisadas porque eram atividades praticadas em todas as propriedades visitadas. A variação dos fatores tamanho do rebanho e densidade foi baseada nas médias dos dados registrados. Dados relacionados à classificação climática e estação do ano no momento da colheita não foram incluídos porque a variação destes quesitos mostrou-se mínima nas regiões de estudo. Por

fim, fatores relacionados à possível disseminação do agente, como o contato com outros animais domésticos (sim, não) e animais silvestres (sim, não), também foram considerados.

Nas visitas às propriedades, as coordenadas geográficas foram registradas para a construção de um mapa georreferenciado, com a finalidade de possibilitar uma melhor visualização das prevalências sorológicas de BRSV em cada rebanho, sendo adotados como critério alta (≥80%) e baixa (<80%), baseado em trabalhos de Arns (1996) e Affonso et al. (2011). Utilizou-se para isso o programa Epi Info™ versão 7.0.

4.5.1. Análise dos fatores de risco

A análise das variáveis apontadas como possíveis fatores de risco para o BRSV foi realizada agrupando-se os dados das 26 propriedades rurais do estudo e foi conduzida de duas formas. A primeira, direcionada às variáveis individuais, que caracterizava cada animal, como idade e resultados de sorologia para BoHV-1 e BVDV, foi analisada por testes de Qui-quadrado (X^2), que comparou as variáveis com os resultados da VN para o BRSV; a segunda, relativa às características que eram comuns a todos os animais de cada rebanho, como o tamanho do rebanho, densidade, compra de animais, entre outros, foi analisada pelo teste exato de Fisher, que comparou essas variáveis com os resultados de prevalência de BRSV em cada propriedade, sendo considerada alta ≥80% e baixa <80%. Nesta segunda análise, as variáveis com valor de p<0,2 (Fisher bicaudal) foram selecionadas para regressão logística. As análises foram feitas utilizando o programa Epi Info™ versão 7.0.

4.6. Processamento das amostras de secreção nasal: Técnica de RT-nested PCR

A RT-nested PCR foi utilizada para a detecção dos genes das proteínas F e G do BRSV nas 352 amostras de secreções nasais colhidas de bezerros. Utilizou-se o protocolo proposto por Vilcek et al. (1994), com algumas adaptações. A técnica foi padronizada e realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular do

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/Unesp.

Como o procedimento poderia gerar resultados falso-positivos em decorrência da contaminação com produtos amplificados, foram utilizados três fluxos laminares para a execução da técnica, sendo um para extração do ácido ribonucleico, outro para o manuseio dos reagentes e preparo da “mix” para PCR, e um terceiro, para a manipulação dos produtos amplificados. Outros cuidados consistiram em utilizar em cada espaço físico um jogo de pipetas automáticas e equipamentos de proteção individual específicos, além de higiene rigorosa com hipoclorito de sódio e uso de lâmpada ultravioleta.

4.6.1. Extração do RNA

Para a extração do RNA viral, foi utilizado protocolo com TRIzol® (Invitrogen™, Estados Unidos). Após o descongelamento das amostras de secreção nasal, 1 mL de TRIzol® foi adicionado aos microtubos e deixado reagir por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, os suabes foram drenados e retirados do microtubo. Em seguida, foram acrescentados às amostras 200 µL de clorofórmio gelado seguido de agitação vigorosa em vórtex durante 15 segundos e repouso de 3 minutos à temperatura ambiente. Logo após, realizou-se centrifugação à temperatura de 4°C durante 15 minutos a 13.400 x *g*. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril e livre de RNAses de 1,5 mL, onde também foram acrescentados 500 µL de isopropanol gelado, sendo a mistura mantida em repouso por 10 minutos à temperatura de -20°C. Após a precipitação do RNA, as amostras foram centrifugadas a 13.400 x *g*. A fase líquida foi descartada e o “pellet” de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o “pellet” foi colocado para secar por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o “pellet” foi ressuspendido em 30 µL de água livre de RNAses.

O RNA foi convertido em cDNA imediatamente após o término da etapa de extração. Como controle positivo, o padrão de BRSV ATCC VR-1485 foi extraído juntamente com as amostras de secreção nasal.

4.6.2. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o “kit” High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Estados Unidos), segundo a metodologia recomendada pelo fabricante. A reação de transcrição constituiu-se de 2 µL de tampão 10X, 0,8 µL de dNTP Mix (100 mM), 2 µL de iniciadores randômicos, 1 µL da Enzima MultiScribe™ Transcriptase Reversa, 4,2 µL de água livre de RNAses e 10 µL de RNA, totalizando 20 µL. O cDNA foi sintetizado em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Estados Unidos) programado para 10 minutos à temperatura de 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. Terminado o ciclo, o cDNA foi armazenado em freezer à temperatura de -20°C até o momento de ser empregado na nested PCR.

4.6.3. Nested PCR

Para a identificação dos genes por meio da nested PCR, foram empregados “primers” que se ligam às regiões altamente conservadas dos genes que codificam para as proteínas F e G do BRSV. Desta forma, para o gene F, utilizaram-se dois pares de iniciadores externos, denominados B1 e B2A, e dois pares de iniciadores internos, chamados de B3 e B4A. Os tamanhos dos produtos amplificados foram, respectivamente, 711 e 481 pares de base (pb). Para o gene G, também foram utilizados dois pares de iniciadores externos (B5A e B6) e dois pares de iniciadores internos (B7A e B8), cujos produtos foram de 603 e 371 pb, respectivamente. Os “primers” desenvolvidos por Vilcek et al. (1994) estão descritos na Tabela 2.

Para a primeira reação de PCR utilizou-se 2,0 µL de Tampão PCR 1X, 0,8 µL de $MgCl_2$ (2mM), 0,4 µL de dNTP’s (0,2mM), 0,2 µL de 1,0U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen™, Estados Unidos), 0,4 µL (1,5pmol) dos iniciadores B1/B2A para o gene F e B5A/B6 para o gene G, 2,0 µL de cDNA e água pura q.s.p. 20 µL. A amplificação dos fragmentos ocorreu em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Estados Unidos) programado para realizar um ciclo a 95°C por 4 minutos, 25 ciclos a 95°C durante 1 minuto, anelamento a 53°C para o gene F

e a 60°C para o gene G por 1 minuto, 72°C durante 1 minuto e 30 segundos, e para finalizar, um ciclo a 72ºC por 7 minutos.

A segunda PCR foi composta pelas mesmas concentrações de reagentes da PCR 1, substituindo o cDNA por 1 µL do produto da primeira PCR, e 1 µL (5pmol) dos iniciadores do gene F (B3/B4A) e do gene G (B7A/B8). A amplificação desta PCR ocorreu no mesmo termociclador descrito anteriormente programado para realizar um ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 53°C para o gene F e a 62°C para o gene G, por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido por uma extensão final a 72ºC por 7 minutos.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na nested PCR para os genes das proteínas F e G, segundo Vilcek et al. (1994), em amostras de secreção nasal colhidas de bezerros, em rebanhos da região norte do Estado de São Paulo, nos anos de 2011 e 2012.

Proteína	Iniciador	Sequência (5'→3')	Posição	Tamanho (pb)
F	B1	AATCAACATGCAGTGCAGTTAG	114-135	711
	B2A	TTTGGTCATTCGTTATAGGCAT	824-803	
F	B3	GTGCAGTTAGTAGAGGTTATCTTAGT	126-151	481
	B4A	TAGTTCTTTAGATCAAGTACTTTGC	606-581	
G	B5A	CCACCCTAGCAATGATAACCTTGAC	110-134	603
	B6	AAGAGAGGATGC(T/C)TTGCTGTGG	712-691	
G	B7A	CATCAATCCAAAGCACCACACTGTC	281-305	371
	B8	GCTAGTTCTGTGGTGGATTGTTGTC	651-627	

Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos e após o término da nested PCR, os microtubos foram armazenados à temperatura de 4°C até o momento de serem analisados pela eletroforese em gel de agarose.

4.6.4. Análise dos produtos da RT-nested PCR

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen™, Estados Unidos) a 1% (p/v) contendo GelRed™ 1X (Uniscience, Brasil) em tampão de corrida TEB 1X (Tris 0,89 M; EDTA 0,025 M; Borato 0,89 M). A cada amostra contendo o produto da amplificação da PCR 2 foram acrescentados 5 µL de tampão de amostra (glicerol 50%; azul de bromofenol 0,02%; 50mM Tris-HCl pH 8,0) e, após homogeneização, foram aplicados no gel de agarose

8,0 µL da solução. A eletroforese foi realizada sob corrente de 85 V durante 80 minutos e os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação Gel Doc XR System (Bio-Rad, Estados Unidos). Os fragmentos obtidos foram comparados com padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™, Estados Unidos).

4.7. Sequenciamento de genes

A reação de PCR de sequenciamento foi realizada a partir do produto de amplificação referente à PCR 1, em duas repetições, utilizando-se os iniciadores "forward" e "reverse" separadamente e o "kit" Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, Estados Unidos) conforme instruções do fabricante. O programa de termociclagem foi o mesmo utilizado para a amplificação dos fragmentos desta região. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Estados Unidos).

Os cromatogramas obtidos foram visualizados e analisados por meio do software ABI Analysis Data Collection e convertidos em sequências de nucleotídeos por meio do programa DNA Sequencing Analysis Versão 3.3. Os cromatogramas gerados pelo processo de sequenciamento foram então submetidos ao conjunto de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; GREEN, 1996; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), para verificação da sua qualidade, alinhamento e corte das extremidades, considerando as bases de qualidade aquelas com qualidade Phred maior que 20. As sequências de nucleotídeos foram então comparadas a outras sequências depositadas em banco de dados "GenBank" (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHULL et al., 1997).

O programa BioEdit versão 7.01 (HALL, 1999) foi utilizado para editar as sequências obtidas de nucleotídeos e aminoácidos. Para a construção do dendrograma, as sequências de nucleotídeos obtidas e outras sequências de referência do BRSV retiradas do "GenBank" foram alinhadas utilizando-se a ferramenta ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). O dendrograma foi

construído pelo método de distância com o algoritmo de agrupamento “Neighbor-joining” e modelo de substituição de nucleotídeos de “Kimura-2 parameter” (KIMURA, 1980), utilizando o “software” MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). O mesmo “software” foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas (TAMURA, 1992). Para assegurar a confiabilidade do agrupamento, a avaliação da significância por “boostrap” foi realizada com 2.000 repetições (EFRON; HALLORAN; HOLMES, 1996).

5. RESULTADOS

5.1. Prevalência da infecção pelo BRSV

Nos testes de VN para o BRSV foram analisadas 1.243 amostras de soro sanguíneo provenientes de 26 rebanhos leiteiros não vacinados de 12 municípios da região norte do Estado de São Paulo, das quais 988 (79,49%) foram reagentes. Observando os resultados de acordo com a faixa etária, das 891 amostras de animais adultos, 767 (86,08%) foram soropositivas, enquanto das 352 amostras de bezerros, 221 (62,78%) reagiram ao teste.

Considerando os resultados separadamente, para a regional de Jaboticabal, de 357 amostras analisadas, 272 (76,19%) foram reagentes à VN. Das 229 amostras oriundas de animais adultos, 193 (84,28%) reagiram, e das 128 amostras de bezerros, 79 (61,72%) foram soropositivas para o BRSV.

Nos testes de VN nas 711 amostras procedentes da regional de São José do Rio Preto, 595 (83,68%) foram reagentes. Das 526 oriundas de animais adultos, 475 (90,30%) amostras reagiram, e das 185 amostras de bezerros, 120 (64,86%) foram soropositivas para o BRSV.

Para a regional de Catanduva, de 175 amostras analisadas, 121 (69,14%) foram reagentes à VN. Das 136 amostras de animais adultos, 99 (72,79%) reagiram, e de 39 amostras provenientes de bezerros, 22 (56,41%) foram soropositivas.

Os resultados gerais consolidados estão apresentados na Tabela 3. A distribuição da quantidade de amostras reagentes por rebanho conforme a regional, as variações dos respectivos títulos médios de anticorpos contra o BRSV assim

como os resultados obtidos conforme a faixa etária estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 3. Valores consolidados da quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos das regionais de Jaboticabal, São José do Rio Preto e Catanduva, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012.

Regional	Quantidade de propriedades	Reagentes/ total adultos	Variação título anticorpos	Reagentes/ total bezerros	Variação título anticorpos	Reagentes/ total rebanho
Jaboticabal	8	193/229 (84,28%)	2 a 512	79/128 (61,72%)	2 a 32	272/357 (76,19%)
S.J.RioPreto	12	475/526 (90,30%)	2 a 256	120/185 (64,86%)	2 a 32	595/711 (83,68%)
Catanduva	6	99/136 (72,79%)	2 a 128	22/39 (56,41%)	2 a 32	121/175 (69,14%)
Total	**26**	**767/891 (86,08%)**	**2 a 512**	**221/352 (62,78%)**	**2 a 32**	**988/1.243 (79,49%)**

Nas propriedades da regional de Jaboticabal (Tabela 4), todos os rebanhos apresentaram bovinos adultos soropositivos para o BRSV, sendo que nas propriedades 2 e 3, 100% das amostras de bovinos adultos foram reagentes. Na propriedade 2 todos os bezerros amostrados foram reagentes à VN. Apesar de a propriedade 2 apresentar 100% das amostras soropositivas para o BRSV, não foram relatados problemas com DRB nos seis meses que antecederam a colheita das amostras. Em contrapartida, as propriedades 3 e 5 apresentaram problemas com DRB, principalmente nos bezerros. Na propriedade 7, nenhum dos bezerros analisados foi soropositivo. As prevalências de BRSV nos rebanhos variaram de 49,02% a 100% de reagentes. Os títulos médios de anticorpos para animais adultos foram de 2 até 512, e para bezerros, de 2 até 32. Os maiores títulos de anticorpos foram encontrados na propriedade 3.

Tabela 4. Quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos da regional de Jaboticabal, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012.

Propriedade	Município	Reagentes/ total adultos	Variação título anticorpos	Reagentes/ total bezerros	Variação título anticorpos	Reagentes/ total rebanho
1	Jaboticabal	41/47 (87,23%)	2 a 64	23/25 (92%)	2 a 8	64/72 (88,89%)
2	Guariba	21/21 (100%)	2 a 64	14/14 (100%)	2 a 16	35/35 (100%)
3	Jaboticabal	50/50 (100%)	2 a 512	16/23 (69,56%)	2 a 32	66/73 (90,41%)
4	Guariba	19/31 (61,29%)	2 a 64	6/20 (30%)	2 a 16	25/51 (49,02%)
5	Jaboticabal	15/25 (60%)	2 a 16	14/19 (73,68%)	2 a 8	29/44 (65,91%)
6	Guariba	36/41 (87,80%)	2 a 64	6/25 (24%)	2 a 8	42/66 (63,64%)
7	Jaboticabal	4/5 (80%)	2 a 4	0/2 (0%)	<2	4/7 (57,14%)
8	Taquaritinga	7/9 (77,77%)	2 a 8	0/0 (0%)	0	7/9 (77,77%)
Total		**193/229 (84,28%)**	**2 a 512**	**79/128 (61,72%)**	**2 a 32**	**272/357 (76,19%)**

Nas propriedades da regional de São José do Rio Preto (Tabela 5), as prevalências de BRSV nos rebanhos foram de 40% até 97,22%. Em todos os rebanhos existiram bovinos adultos reagentes, com 100% de prevalência nessa faixa etária na propriedade 11. Todos os rebanhos apresentaram pelo menos um bezerro soropositivo, sendo que a propriedade 14 apresentou 100% de bezerros reagentes na VN. Nas propriedades 9, 10, 11, 14, 17 e 18 foram relatados problemas com DRB, e nas propriedades 11 e 14 foi observada doença clínica nos bezerros durante a colheita de material. Os títulos médios de anticorpos VN encontrados foram de 2 até 256 entre os animais adultos, e 2 até 32 entre os bezerros. Os maiores títulos de anticorpos foram constatados nos animais da propriedade 19.

Tabela 5. Quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos da regional de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012.

Propriedade	Município	Reagentes/ total adultos	Variação título anticorpos	Reagentes/ total bezerros	Variação título anticorpos	Reagentes/ total rebanho
9	Potirendaba	78/85 (91,76%)	2 a 23	12/16 (75%)	2 a 16	90/101 (89,11%)
10	Potirendaba	79/81 (97,53%)	2 a 32	26/37 (70,27%)	2 a 16	105/118 (88,98%)
11	Bady Bassit	24/24 (100%)	4 a 128	11/12 (91,67%)	2 a 6	35/36 (97,22%)
12	Potirendaba	79/83 (95,18%)	2 a 32	33/36 (91,67%)	2 a 16	112/119 (94,12%)
13	Ipiguá	54/59 (91,52%)	2 a 16	9/18 (50%)	2 a 16	63/77 (81,82%)
14	Ipiguá	26/28 (92,86%)	2 a 32	3/3 (100%)	3 a 8	29/31 (93,55%)
15	S.J.RioPreto	24/26 (92,31%)	3 a 64	4/9 (44,44%)	6 a 32	28/35 (80%)
16	N. Granada	5/10 (50%)	2 a 12	1/5 (20%)	3	6/15 (40%)
17	Mirassol	18/20 (90%)	2 a 16	2/6 (33,33%)	2 a 8	20/26 (76,92%)
18	Bady Bassit	10/12 (83,33%)	2 a 16	2/3 (66,66%)	2 a 4	12/15 (80%)
19	S.J.RioPreto	26/37 (70,27%)	2 a 256	2/13 (15,38%)	3 a 4	28/50 (56%)
20	Ipiguá	52/61 (85,25%)	2 a 32	15/27 (55,55%)	2 a 16	67/88 (76,14%)
Total		**475/526 (90,30%)**	**2 a 256**	**120/185 (64,86%)**	**2 a 32**	**595/711 (83,68%)**

Na regional de Catanduva (Tabela 6) todas as propriedades também apresentaram bovinos adultos reagentes na VN. Para a propriedade 25, 100% dos adultos foram reagentes. Com relação aos bezerros, 100% das amostras da propriedade 21 foram reagentes, em contrapartida, nenhum bezerro foi soropositivo na propriedade 26. Os títulos médios de anticorpos variaram de 2 a 128 e de 2 a 32 para animais adultos e bezerros, respectivamente. A propriedade 25 apresentou os maiores títulos de anticorpos, atingindo 128. As prevalências de BRSV encontradas nos rebanhos estiveram entre 43,75% e 93,44%. Somente nas propriedades 23 e 24 foram relatados problemas relacionados à DRB.

Tabela 6. Quantidade de bovinos reagentes ao teste de VN sobre o total de examinados (porcentagem) de acordo com a faixa etária e a variação dos títulos de anticorpos para o BRSV, nos rebanhos da regional de Catanduva, Estado de São Paulo, nos períodos de março a junho de 2011 e março a junho de 2012.

Propriedade	Município	Reagentes/ total adultos	Variação título anticorpos	Reagentes/ total bezerros	Variação título anticorpos	Reagentes/ total rebanho
21	Itajobi	5/11 (45,45%)	2 a 32	5/5 (100%)	2 a 32	10/16 (62,50%)
22	Itajobi	4/6 (66,67%)	3 a 11	0/0 (0%)	0	4/6 (66,67%)
23	Novo Horizonte	18/37 (48,65%)	2 a 32	3/11 (27,27%)	2 a 4	21/48 (43,75%)
24	Novo Horizonte	16/19 (84,21%)	2 a 64	1/3 (33,33%)	4	17/22 (77,27%)
25	Sales	44/44 (100%)	2 a 128	13/17 (72,47%)	2 a 32	57/61 (93,44%)
26	Novo Horizonte	12/19 (63,16%)	2 a 8	0/3 (0%)	<2	12/22 (54,55%)
Total		**99/136 (72,79%)**	**2 a 128**	**22/39 (56,41%)**	**2 a 32**	**121/175 (69,14%)**

O teste exato de Fisher foi aplicado para comparar as três regionais quanto à prevalência de BRSV. De acordo com o teste, foi verificada diferença estatística significativa ($p<0,05$) da regional de São José do Rio Preto com a regional de Jaboticabal, e da regional de São José do Rio Preto com a regional de Catanduva. Não houve diferença estatística significativa entre as regionais de Jaboticabal e Catanduva ($p>0,05$).

5.2. Análise dos fatores de risco

A análise estatística pelo X^2, utilizada para comparar os fatores de risco relacionados à idade dos animais e soropositividade para BoHV-1 e BVDV com os resultados da VN para o BRSV, indicou que nos 1.243 animais amostrados a prevalência de BRSV é elevada em animais adultos (>1 ano) quando comparada à dos bezerros, e também em animais que foram reagentes aos vírus BoHV-1 e BVDV. Os resultados da análise estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Distribuição dos resultados do teste de Qui-quadrado (X^2) dos fatores de risco relacionados às características individuais dos 1.243 animais amostrados, risco relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) a 95% e valor de p.

Fator de risco	Condição	BRSV		RR	IC (95%)		Valor de p
		Reagente	Não reagente		Limite inferior	Limite superior	
Idade	Adulto	775	116	1,44	1,32	1,57	<0,0001
	Bezerro	213	139				
BoHV-1	Reagente	565	85	1,22	1,15	1,29	<0,0001
	Não reagente	423	170				
BVDV	Reagente	298	33	1,19	1,13	1,25	<0,0001
	Não reagente	690	222				

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os fatores de risco que eram comuns a todos os animais de cada rebanho com os resultados de prevalência de BRSV (alta $\geq$80%, baixa <80%). Apesar de as variáveis gerais e de manejo das propriedades como tamanho do rebanho (>75 animais), densidade (>5 animais/hectare) e raça predominante (Holandesa) terem apresentado RR maior que 1, o mesmo não foi confirmado pelos respectivos IC e pelo teste estatístico. A variável tipo de reprodução (monta natural) se comportou como um fator protetivo, porém, apesar de ter apresentado diferença estatística, não foi confirmada pelo IC. As demais variáveis de manejo se comportaram também como fatores protetivos, no entanto, não houve confirmação estatística e do IC. Esses resultados estão apresentados na tabela 8.

Para as variáveis relacionadas à sanidade e aos cuidados com os bezerros consideradas importantes fatores de risco na disseminação do BRSV, como a mistura de bezerros com animais adultos, bezerreiro coletivo e aleitamento natural dos bezerros, os valores do RR foram menores que 1, ou seja, foram considerados fatores protetivos. Porém, somente a variável aleitamento natural foi confirmada como fator de proteção pelo IC e pelo teste estatístico. O teste não verificou nenhuma diferença para as outras variáveis consideradas como fatores de risco para o BRSV. Esses resultados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 8. Distribuição dos resultados do teste exato de Fisher dos fatores de risco gerais e de manejo relacionados às características comuns a todos os animais de cada rebanho, risco relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) a 95% e valor de p.

Fator de risco	Condição	Prevalência de BRSV		RR	IC (95%)		Valor de p
		Alta	Baixa		Limite inferior	Limite superior	
Rebanho grande	Sim	3	2	1,40	0,59	3,34	0,422
	Não	9	12				
Alta densidade	Sim	5	4	1,34	0,60	3,05	0,387
	Não	7	10				
Raça Holandesa	Sim	7	7	1,20	0,51	2,81	0,488
	Não	5	7				
Monta Natural	Sim	2	8	0,32	0,09	1,17	0,042
	Não	10	6				
Compra de animais	Sim	6	10	0,63	0,28	1,41	0,237
	Não	6	4				
Limpeza esporádica	Sim	7	9	0,88	0,38	2,01	0,536
	Não	5	5				
Animais domésticos	Sim	11	13	0,92	0,21	3,92	0,720
	Não	1	1				
Animais silvestres	Sim	5	9	0,61	0,26	1,43	0,224
	Não	7	5				

Tabela 9. Distribuição dos resultados do teste exato de Fisher dos fatores de risco de sanidade e cuidados com bezerros relacionados às características comuns a todos os animais de cada rebanho, risco relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) a 95% e valor de p.

Fator de risco	Condição	Prevalência de BRSV		RR	IC (95%)		Valor de p
		Alta	Baixa		Limite inferior	Limite superior	
Doença resp. bezerros	Sim	7	6	1,40	0,60	3,28	0,347
	Não	5	8				
Doença resp. adultos	Sim	0	1	0,00	-	-	0,538
	Não	12	13				
Diarreia em bezerros	Sim	10	8	2,22	0,62	7,91	0,216
	Não	2	6				
Ausência quarentena	Sim	10	11	1,19	0,37	3,81	0,578
	Não	2	3				
Ausência isolamento	Sim	6	10	0,63	0,28	1,40	0,237
	Não	6	4				
Aborto	Sim	5	6	0,97	0,42	2,26	0,632
	Não	7	8				
Bezerreiro coletivo	Sim	9	14	0,39	0,24	0,65	0,085
	Não	3	0				
Aleitamento Natural	Sim	3	10	0,33	0,12	0,96	0,023
	Não	9	4				
Mistura de Animais	Sim	4	10	0,43	0,17	1,08	0,060
	Não	8	4				

Na regressão logística, a análise das variáveis monta natural, bezerreiro coletivo, aleitamento natural e mistura de animais, não mostrou resultados significativos, com valores de p=0,38, p=0,639, p=0,962 e p=0,965, respectivamente, não confirmando essas variáveis como fatores de risco potenciais para a alta prevalência de BRSV.

De acordo com os resultados de prevalência sorológica de BRSV encontrados nas propriedades do estudo, um mapa georreferenciado foi organizado conforme a prevalência maior ou menor que 80%. O mapa foi feito utilizando o programa Epi Info™ versão 7.0 (Figura 1).

Sem levar em consideração outras propriedades existentes nesses locais, a Figura 1 permite visualizar a predominância das maiores prevalências de BRSV na regional de São José do Rio Preto, ou seja, oito de 12 propriedades visitadas. Na regional de Jaboticabal, três de oito propriedades apresentaram elevadas prevalências de BRSV, e na regional de Catanduva, apenas uma de seis propriedades analisadas.

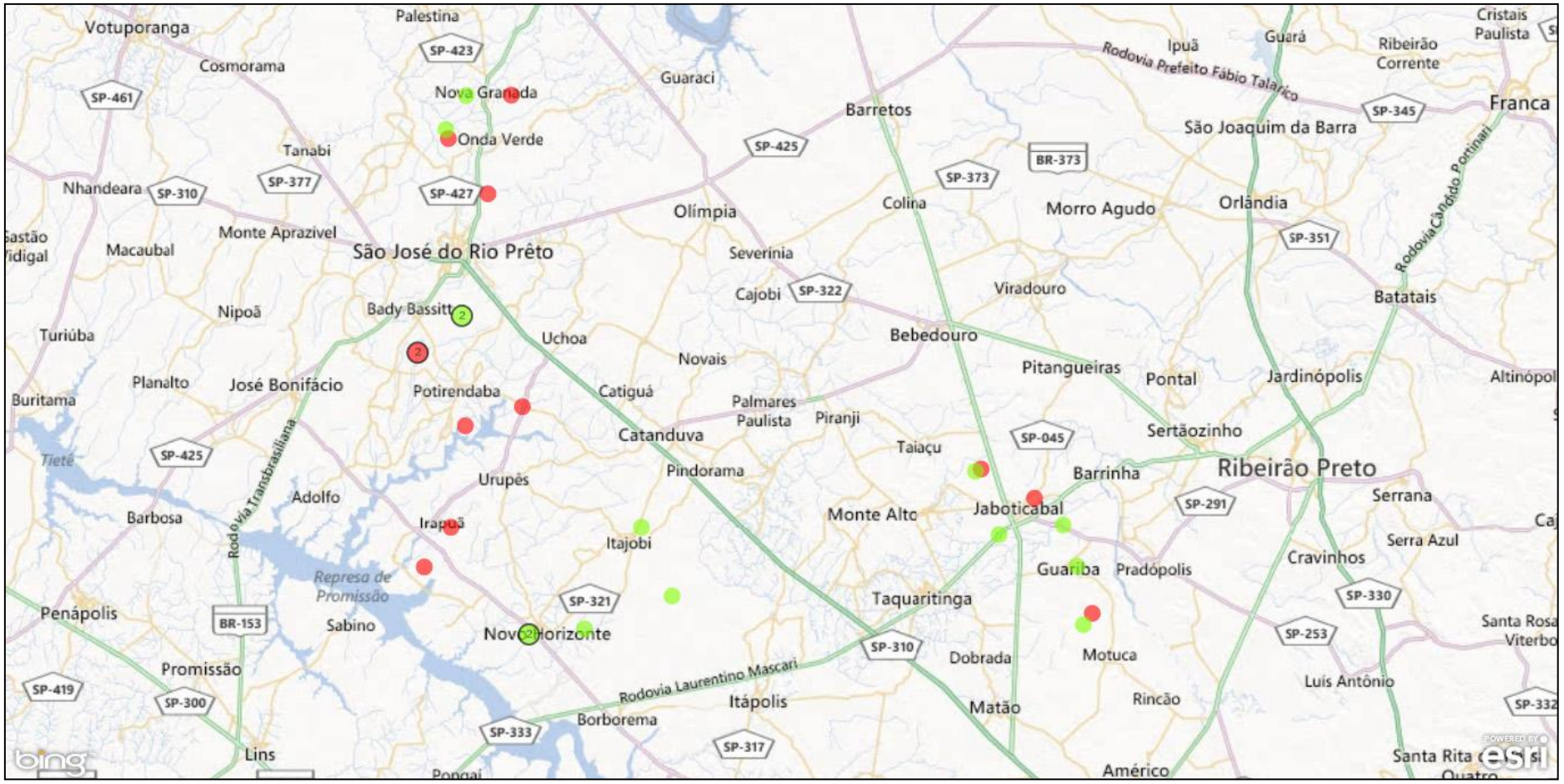


Figura 1. Mapa gerado pelo programa Epi Info™ versão 7.0, mostrando os locais conforme as prevalências sorológicas de BRSV (≥80%, alta em vermelho e <80%, baixa em verde) das 26 propriedades rurais visitadas, das regionais de Jaboticabal, Catanduva e São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, entre março e junho de 2011 e março e junho de 2012.

5.3. Técnica de RT-nested PCR

A RT-nested PCR foi conduzida em 352 amostras de suabes nasais de bezerros, desde recém-nascidos até um ano de idade, provenientes de propriedades com histórico ou não de DRB, com a finalidade de detectar segmentos dos genes das proteínas F e G do BRSV. Dessas amostras, somente uma foi positiva para o gene F (Figura 2), sendo que não houve amplificação dessa mesma amostra para o gene G (Figura 3). A amostra padrão positiva do BRSV ATCC VR-1485 amplificou ambos os genes (Figura 2 e Figura 3).

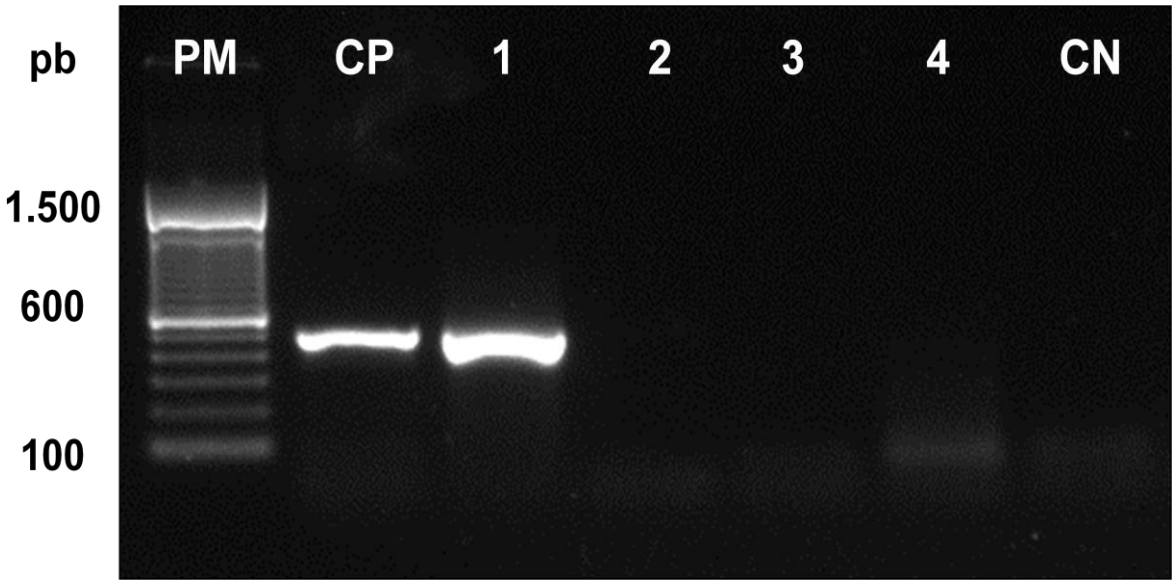


Figura 2. Produto da amplificação do gene F do BRSV de 481pb em uma amostra de suabe nasal. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder, Invitrogen. CP: controle positivo, BRSV ATCC VR-1485. Linha 1: amostra positiva. Linhas 2, 3 e 4: amostras negativas. CN: controle negativo (“mix” de reação sem DNA).

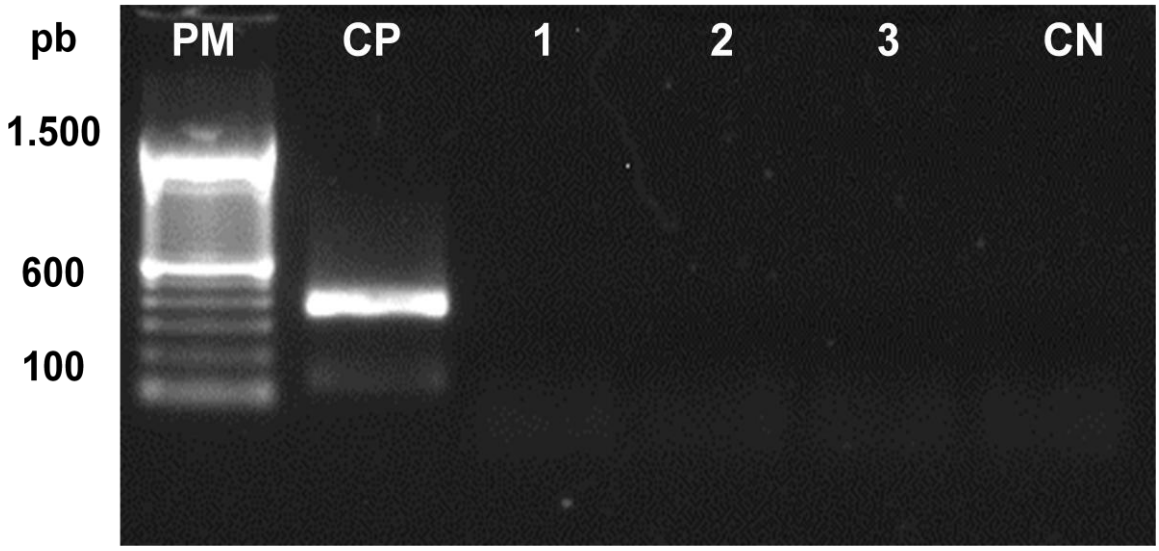


Figura 3. Produto da amplificação do gene G do BRSV de 371pb. A amostra de suabe nasal positiva para o gene F não amplificou este gene. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder, Invitrogen. CP: controle positivo, BRSV ATCC VR-1485. Linha 1: amostra de suabe nasal (positiva para o gene F). Linhas 2 e 3: amostras negativas. CN: controle negativo ("mix" de reação sem DNA).

Devido à não amplificação da amostra positiva para o gene da proteína G, a nested PCR foi repetida no mínimo três vezes com a amostra positiva detectada para o gene F, incluindo também mudanças no protocolo, como a utilização do cDNA do vírus na PCR 2 em vez de o produto da PCR 1 e variações na temperatura de anelamento. No entanto, apesar dessas mudanças, não foi observada amplificação.

A amostra positiva na RT-nested PCR para o gene da proteína F do BRSV foi colhida de uma bezerra com 20 dias de idade da propriedade 25 no Município de Sales, regional de Catanduva. Nessa propriedade, o proprietário não relatou problemas relacionados à DRB, e o animal em questão aparentava estar saudável. Esse mesmo animal também foi reagente ao BRSV, apresentando título de anticorpos 16. Apesar de não haver problemas com DRB no rebanho, a prevalência de BRSV nessa propriedade foi a maior entre os rebanhos dessa regional, com 93,44% de soropositivos e 100% dos animais adultos reagentes. Os títulos de anticorpos contra o BRSV nos animais dessa propriedade eram elevados, atingindo o título 128. A Figura 4 ilustra os animais jovens e adultos dessa propriedade.



Figura 4. Animais jovens (A) e adultos (B) pertencentes à propriedade 25, onde foi detectada uma amostra positiva na RT-nested PCR para o gene da proteína F, Município de Sales, regional de Catanduva, Estado de São Paulo, 2012.

5.4. Sequenciamento de genes

A amostra que apresentou amplificação para o gene da proteína F e a amostra padrão positiva BRSV ATCC VR-1485 tiveram o produto da PCR 1 sequenciado. Como não houve amplificação da amostra positiva para o gene da proteína G, não foi realizado o sequenciamento para este gene. A amostra positiva recebeu a denominação de BRSV-UnespJab-1.

A relação genética entre a amostra BRSV-UnespJab-1 e demais sequências gênicas da proteína F do BRSV retiradas do “GenBank” (Tabela 10) está ilustrada na Figura 5. No dendrograma, a amostra BRSV-UnespJab-1 não se agrupou a nenhum dos subgrupos de isolados de referência do BRSV proposto por Valarcher, Schelcher e Bourhy (2000), nem ao subgrupo B, a qual pertence o isolado brasileiro BRSV-25-BR (ARNS et al., 2003). Sendo assim, ela foi classificada como pertencente a um subgrupo não tipável. A sequência do gene F da amostra padrão positiva BRSV ATCC VR-1485 não estava disponível no banco de dados do “GenBank”, e o sequenciamento dela permitiu caracterizá-la como pertencente ao subgrupo B do BRSV, juntamente com outro isolado padrão (A51908) e o isolado brasileiro BRSV-25-BR (Figura 5).

Apesar de a amostra BRSV-UnespJab-1 não ter se agrupado a nenhum dos subgrupos já definidos para o BRSV, a análise da sequência de nucleotídeos dessa amostra comparada às amostras do subgrupo AB (RB94), A (391-2) e B (BRSV-25-BR) não se mostrou muito diferente (Figura 6), revelando um pequeno acúmulo de mutações. Essas mutações podem ter sido sinônimas, pois a sequência de aminoácidos também não se mostrou muito alterada. O fragmento que origina o peptídeo de fusão (KKRKRRFL) permaneceu conservado (Figura 7).

O grau de identidade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos da amostra BRSV-UnespJab-1 e isolados representativos dos subgrupos do BRSV foi maior que 92%, com maior proximidade do subgrupo A, o qual apresentou porcentagens de homologia dos nucleotídeos e aminoácidos de 96% e 97,7%, respectivamente. Esses dados estão apresentados na Tabela 11. Os cálculos da distância genética entre os subgrupos também mostrou que a amostra BRSV-

UnespJab-1 é mais próxima geneticamente dos subgrupos A e AB, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 10. Isolados de referência do BRSV, ORSV e HRSV, bem como origem e número de acesso no "GenBank" utilizados para comparação no dendrograma.

Isolado	País de origem	Acesso "GenBank"
A2Gelfi	França	**AF124561**
394	França	**AF188554**
A1	França	**AF188555**
B1	França	**AF188556**
B2	França	**AF188557**
C2	França	**AF188558**
G2	França	**AF188559**
J1	França	**AF188560**
K1	França	**AF188561**
90504	França	**AF188562**
L1	França	**AF188563**
F2	França	**AF188564**
W6	França	**AF188565**
P3	Bélgica	**AF188566**
P8	Bélgica	**AF188567**
880	França	**AF188568**
V347	Holanda	**AF188569**
5761	Bélgica	**AF188570**
Bayovac	Estados Unidos	**AF188571**
W2	Bélgica	**AF188572**
Lelystad	Holanda	**AF188573**
FV160	Bélgica	**AF188574**
220-69	Bélgica	**AF188575**
4642	Reino Unido	**AF188576**
A51908	Estados Unidos	**AF295544**
BRSV-25-BR	Brasil	**AY862148**
RB94	Bélgica	**D00953**
391-2	Estados Unidos	**M58350**
ORSV	Estados Unidos	**AF334398**
HRSV-B1	Estados Unidos	**AF013254**

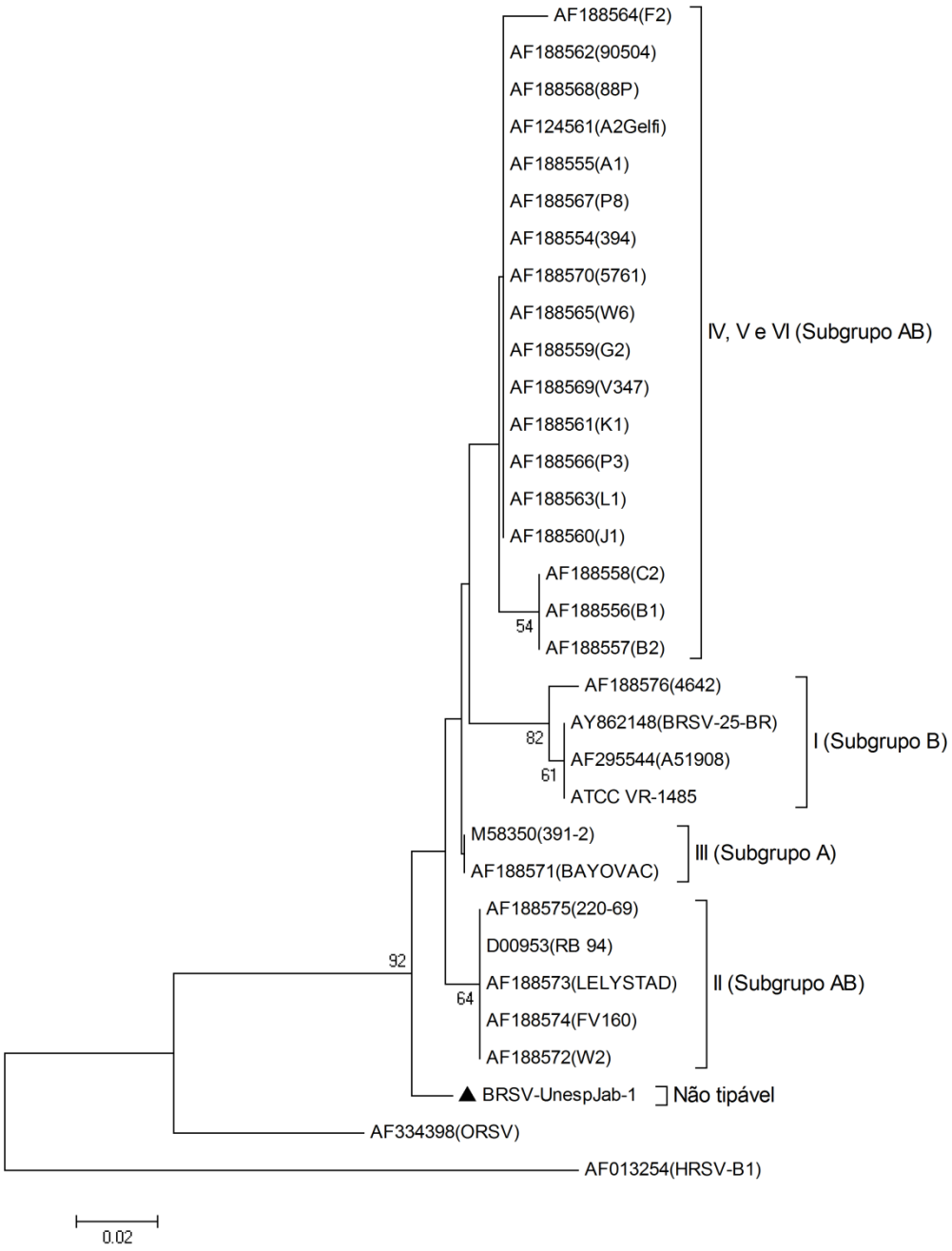


Figura 5. Dendrograma construído pelo método “neighbor-joining” formado por sequências dos genes da proteína F representando as relações filogenéticas entre a amostra BRSV-UnespJab-1 e 28 amostras de referência distribuídas mundialmente. Os números de acesso no “GenBank” estão fornecidos para cada sequência junto com o nome da estirpe correspondente. A amostra BRSV-UnespJab-1 está indicada com um triângulo. Como grupos externos, foram utilizadas sequências do gene da proteína F do ORSV e HRSV.

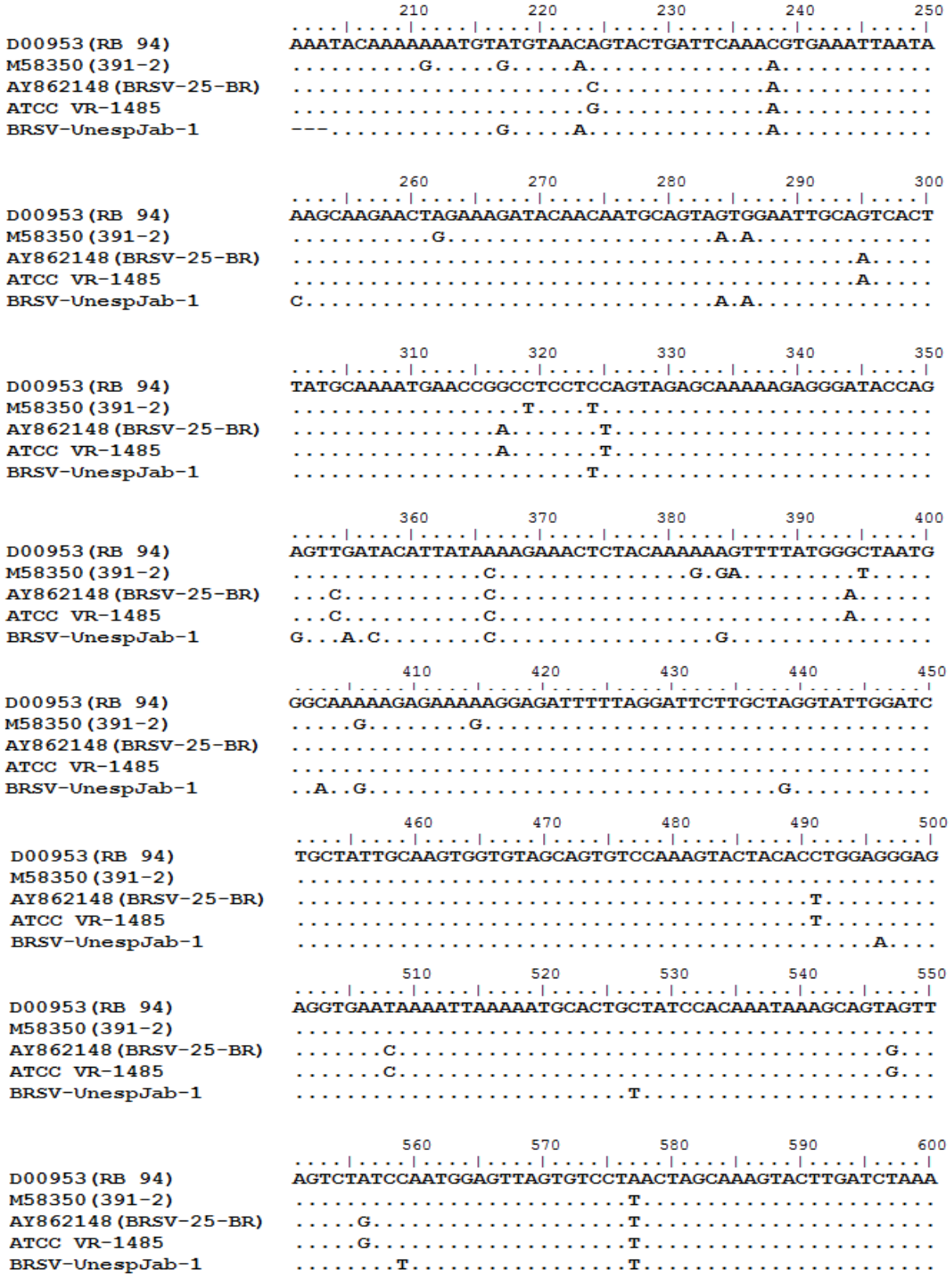


Figura 6. Sequências de nucleotídeos do gene da proteína F (região 204-600) das amostras BRSV-UnespJab-1, BRSV ATCC VR-1485 e isolados de referência, representando o subgrupo AB (RB94), A (391-2) e B (BRSV-25-BR).

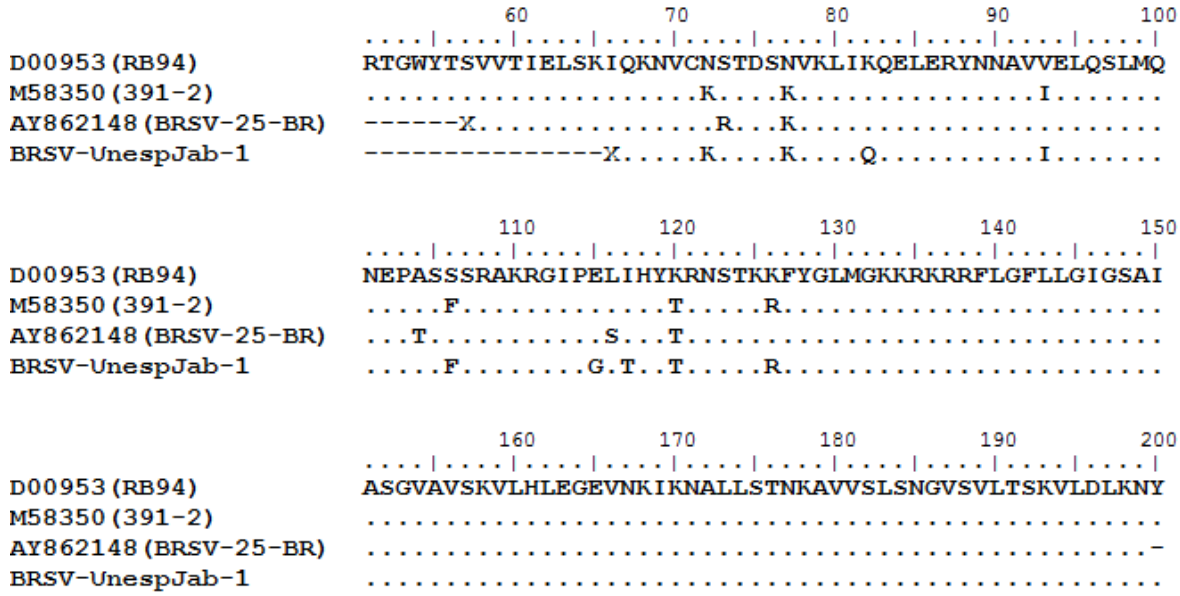


Figura 7. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos (região 61-200) que compreendem o peptídeo de fusão (KKRKRRFL), comparando as diferenças entre a amostra BRSV-UnespJab-1 e outros isolados do subgrupo AB (RB94), A (391-2) e B (BRSV-25-BR).

Tabela 11. Identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre a amostra BRSV-UnespJab-1 e estirpes representativas dos subgrupos do BRSV.

	RB94 (AB)	391-2 (A)	BRSV-25-BR (B)	BRSV-UnespJab-1
RB94 (AB)	-	*95,4*	*96,2*	*93,2*
391-2 (A)	95,7	-	*94,7*	*97,7*
BRSV-25-BR (B)	96,7	94	-	*92,4*
BRSV-UnespJab-1	95,2	96	93,5	-

Valores de identidade dos nucleotídeos e aminoácidos estão fornecidos em números normais e itálicos, respectivamente.

Tabela 12. Valores de distância genética intrassubgrupos e entre subgrupos do BRSV.

Subgrupos	Intrassubgrupos	Subgrupos			
		A	B	AB	BRSV-UnespJab-1
A	0,000	-			
B	0,005	0,022			
AB	0,011	0,007	0,028		
BRSV-Unesp-Jab-1	-	0,022	0,045	0,027	-

6. DISCUSSÃO

6.1. Prevalência sorológica e fatores de risco de infecção pelo BRSV

A prevalência total de BRSV encontrada neste estudo, agrupando todas as amostras das propriedades visitadas, aproximou-se da estimativa esperada, com 79,49% de animais reagentes. Contudo, a amostragem utilizada continha animais de todas as faixas etárias, entre elas, bezerros recém-nascidos até um ano de idade. Alguns estudos apontam períodos diferentes de persistência de anticorpos colostrais contra o BRSV em bezerros, sendo a duração variável de três a oito meses de idade (BAKER; AMES; MARKHAM, 1986; AFFONSO et al., 2012). Desta forma, como não seria possível distinguir anticorpos colostrais daqueles provenientes de infecção natural nos bezerros, torna-se mais verdadeiro considerar a prevalência de BRSV encontrada nos animais adultos, com 86,98% de animais reagentes, estando esse valor um pouco maior que a estimativa esperada de infecção. Com relação aos bezerros, com a provável interferência de anticorpos colostrais, a estimativa da infecção pelo BRSV pode ser menor que a detectada (60,51%).

De acordo com os valores de prevalência sorológica de BRSV encontrados, pode-se observar que a infecção pelo vírus ocorreu nos rebanhos das três regionais estudadas, localizadas na região nordeste e noroeste do Estado de São Paulo. Na regional de Jaboticabal, a prevalência total e dos animais adultos foi de 76,19% e 87,77%, respectivamente. A quantidade de bovinos reagentes nos rebanhos da regional de São José do Rio Preto foi maior do que as demais, com prevalência total

de BRSV de 83,68%, e de 90,30% de animais adultos. Nas propriedades da regional de Catanduva foram encontradas as menores prevalências, sendo 69,14% a geral e 72,29% a prevalência entre os animais adultos.

A diferença estatística observada entre as prevalências de BRSV nas propriedades da regional de São José do Rio Preto com as propriedades das regionais de Jaboticabal e Catanduva pode estar associada ao fato de que todos os rebanhos com grande número de animais faziam parte da regional de São José do Rio Preto. Essa característica foi confirmada como fator de risco para elevada prevalência de BRSV em algumas pesquisas (NORSTRÖM; SKJERVE; JARP, 2000; SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; YESILBAG; GÜNGÖR, 2008; OHLSON et al., 2010; AFFONSO et al., 2011). No entanto, quando o presente estudo analisou a variável tamanho do rebanho (> 75 animais), o teste estatístico não confirmou esse fator como de risco. Por isso, outros possíveis fatores de risco que não foram considerados podem ser responsáveis pela disseminação do BRSV nas propriedades desta regional, já que mais da metade dos rebanhos apresentaram prevalências de BRSV iguais ou superiores à esperada.

Considerando os resultados agrupados de todas as regionais e também de cada regional, nota-se que a proporção de bovinos adultos reagentes foi maior do que a de bezerros reagentes, comprovando os descritos da literatura que a prevalência de BRSV é extremamente alta em animais adultos (SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; FIGUEROA-CHÁVEZ et al., 2012). Os animais adultos estão associados à alta prevalência de BRSV, pois possuem mais chances de exposição às infecções ao longo da vida, e também a possibilidade de reinfecções pelo vírus.

Da mesma forma, os maiores títulos de anticorpos encontrados foram associados aos bovinos adultos. Isso normalmente ocorre em animais não vacinados quando expostos a reinfecções sucessivas pelo vírus, causando o efeito “booster” nos títulos de anticorpos (VAN DER POEL et al., 1993). Outra possibilidade de títulos de anticorpos elevados são as infecções ou reinfecções recentes pelo BRSV nos rebanhos, que só podem ser confirmadas por meio de sorologia pareada, pela pesquisa de anticorpos em bezerros após o desaparecimento dos anticorpos colostrais ou pela detecção do vírus por métodos diretos. Essas hipóteses poderiam explicar os elevados títulos de anticorpos

encontrados nos animais adultos das propriedades 3 e 11, que inclusive relataram problemas com DRB. Na propriedade 19, apesar dos altos títulos de anticorpos encontrados nos animais, não foi mencionada DRB nos últimos seis meses da colheita das amostras. Nos animais da propriedade 25, que também apresentaram elevados títulos de anticorpos, a presença do agente viral foi confirmada por meio da técnica de RT-nested PCR, apesar de não haver histórico de DRB no rebanho. Esse fato será discutido detalhadamente no item 6.2.

Nas propriedades 5, 9, 10, 14, 17, 18, 23 e 24, os proprietários relataram a ocorrência de problemas respiratórios nos animais, principalmente em bezerros. Como a prevalência de BRSV mostrou-se muito elevada em quase todas as propriedades e pela falta de confirmação da atividade viral, torna-se difícil inferir se o BRSV seria a causa da DRB nesses rebanhos. Nos rebanhos das propriedades 1, 2, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 25 e 26, apesar de apresentarem prevalências elevadas de BRSV, não houve queixa relacionada à doença respiratória nos animais, apesar de se ter confirmado a presença do agente viral na propriedade 25. De acordo com Larsen (2000), a maioria das infecções pelo BRSV parece se comportar de forma subclínica, uma vez que é muito comum a elevada prevalência sorológica da infecção nos rebanhos e baixa incidência de doença nos animais. No entanto, uma vez que os relatos de DRB foram frequentes nos rebanhos leiteiros do estudo, não se pode descartar a suspeita de que a doença tenha participação do BRSV.

Ao mesmo tempo, a presença de outros agentes etiológicos também está associada à prevalência do BRSV (OBANDO et al., 1999; SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; YESILBAG; GÜNGÖR, 2008; LUZZAGO et al., 2010). Essa possibilidade pode explicar a associação da prevalência sorológica de BRSV com as prevalências de BoHV-1 e BVDV. Por serem viroses que também acometem o sistema respiratório dos bovinos e de prevalências muito elevadas (DEL FAVA; PITUCO; D'ANGELINO, 2002; FLORES et al., 2005), pode-se inferir que seja comum a infecção concomitante por esses vírus nos animais pertencentes aos rebanhos da região estudada.

Apesar da regressão logística não ter confirmado as variáveis aleitamento natural, bezerreiro coletivo e mistura de animais como fatores de risco potenciais

para alta prevalência de BRSV, um fato curioso foi detectado na análise estatística univariada a respeito dos fatores de risco relacionados aos cuidados com os bezerros nos rebanhos que utilizam aleitamento natural. Admitindo-se que os bovinos adultos são as principais fontes de infecção do BRSV para os bezerros (BAKER; AMES; MARKHAM, 1986), seria possível supor que a mistura de animais jovens e adultos durante o aleitamento constituísse um fator de risco para o BRSV. No entanto, a análise mostrou esse fator como protetivo para os animais. Possivelmente, o contato dos bezerros com secreções nasais e fômites é reduzido pelo aleitamento natural, já que o bezerro irá se alimentar apenas nos tetos da mãe, evitando o contato com baldes ou vasilhas compartilhadas com outros animais. Ainda, apesar de não terem sido confirmados pelo teste, o bezerreiro coletivo e a mistura de bezerros com animais adultos também foram relacionados a fatores protetivos. Consequentemente, como não existem relatos desse tipo na literatura, uma vez que são pesquisas que foram realizadas em locais onde a forma de criação dos bezerros é diferente da praticada nos rebanhos visitados, pode-se sugerir que esses fatores não correspondem necessariamente a um risco de infecção pelo vírus nos rebanhos leiteiros do presente estudo, já que a prevalência de BRSV frequentemente é muito elevada.

Comparando os valores de prevalência de BRSV encontrados neste estudo às pesquisas realizadas anteriormente no Brasil, observam-se similaridades nos resultados (ARNS, 1996; CAMPALANS; ARNS, 1997; AFFONSO et al., 2011). Nos países da América Latina também foram encontradas prevalências de BRSV equivalentes (OBANDO et al., 1999; COSTA et al., 2000; SOLÍS-CALDERÓN et al., 2007; SAA et al., 2012), além de dificuldades em detectar os fatores de risco envolvidos na disseminação do agente, mesmo utilizando diferentes formas de amostragem e analisando uma quantidade considerável de variáveis.

Sendo assim, as altas prevalências sorológicas de BRSV refletem o desconhecimento de medidas de controle dessa enfermidade, uma vez que no Brasil e nos países da América Latina ela não é considerada importante, pela falta de diagnóstico. Também, o conhecimento dos fatores de risco possibilitaria compreender melhor os mecanismos envolvidos na disseminação do agente, porém assim como em outras pesquisas, esses fatores não se tornaram muito claros no

presente estudo. Assim, existem particularidades relacionadas ao manejo e aspectos regionais que precisam ser considerados para melhor compreender as infecções provocadas pelo BRSV nos rebanhos leiteiros com altas prevalências.

6.2. Técnica de RT-nested PCR

Os resultados da RT-nested PCR permitiram detectar somente uma amostra positiva em 352 amostras de suabes nasais colhidas de bezerros, desde recém-nascidos até 12 meses de idade, de rebanhos com histórico ou não de DRB. No entanto, a amostra positiva, denominada BRSV-UnespJab-1, amplificou somente amplificação o gene da proteína F do BRSV, sendo que a amostra padrão positiva BRSV ATCC VR-1485 amplificou para o gene das proteínas F e G. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Vilcek et al. (1994), Almeida et al. (2005) e Bidokhti et al. (2012), que utilizaram os mesmos pares de “primers” e obtiveram sucesso na amplificação das amostras para os dois genes.

A veracidade da não amplificação do gene da proteína G foi confirmada por três repetições da RT-nested PCR. Considerando a possibilidade de haver alguma mutação no fragmento homólogo aos “primers” B5A e B6, utilizados na PCR 1 para o gene G, testou-se a PCR 2 utilizando o cDNA da amostra BRSV-UnespJab-1 em vez de o produto de amplificação da PCR 1, além de alterações nas temperaturas de anelamento, no entanto, os procedimentos não possibilitaram a amplificação do fragmento.

A maioria dos estudos genéticos das proteínas virais do BRSV destina-se a caracterizar a proteína G, pelo fato de ela possuir maior variação antigênica e sua evolução na natureza ser mais rápida que a das demais, pois é altamente tolerante à fixação de mutantes (FURZE et al., 1994; VALARCHER; SCHELCHER; BOURHY, 2000). No Brasil, Spilki et al. (2006) relataram diferenças na composição da sequência de aminoácidos do gene da proteína G da amostra brasileira BRSV-25-BR quando comparadas às amostras de outros países. Assim, uma vez que o sequenciamento do gene da proteína F reafirmou o resultado da amostra positiva BRSV-UnespJab-1, pode-se deduzir que a não amplificação do gene G se deve ao

possível acúmulo de mutações que inviabilizou sua detecção pelos “primers” do gene G utilizados.

Amostras de suabes nasais para análise na RT-nested PCR como meio de detecção direta do BRSV, sem a passagem do material em cultivo celular para amplificação, apresentaram resultados satisfatórios em pesquisa realizada por Vilcek et al. (1994). No entanto, as amostras detectadas eram provenientes de rebanhos com surtos de doença respiratória. No caso do presente estudo, apesar de as propriedades terem apresentado elevadas soroprevalências de BRSV, este fato não possibilita confirmar a presença de atividade viral fluente entre os animais dos rebanhos. Por isso, a utilização da RT-nested PCR em amostras procedentes de rebanhos reagentes sorologicamente, porém sem surtos de DRB, pode resultar em poucas amostras positivas, uma vez que não houve possibilidade de identificar os animais que estariam eliminando o vírus. Da mesma forma nos rebanhos com histórico de DRB e nos bezerros com doença clínica, apesar da maior possibilidade de obter amostras do vírus nas secreções, a chance de colher o material no momento certo da eliminação do agente é reduzida. O vírus se comporta como agente primário de infecção, seguido rapidamente por infecções secundárias por outros microrganismos no trato respiratório (VAN DER POEL et al., 1996), o que influencia sua eliminação nas secreções e consequentemente sua detecção direta nas técnicas de biologia molecular.

Como os bezerros são mais susceptíveis à doença clínica pelo BRSV, a chance de detectar a eliminação do vírus é muito maior nesses animais, apesar de os animais adultos constituírem a principal fonte de infecção e manutenção do vírus nos rebanhos. Assim, a amostra positiva na RT-nested PCR para o BRSV foi detectada em uma bezerra de 20 dias de idade, porém sem sinais de DRB, provavelmente em decorrência dos anticorpos de origem colostral, já que o animal apresentou título 16 na VN. O rebanho de origem dessa bezerra (propriedade 25) apresentou prevalência de BRSV bastante elevada (93,44%), com 100% dos animais adultos reagentes, além de títulos elevados de anticorpos. Portanto, a infecção ou reinfecção desses animais deve ter ocorrido perto da colheita das amostras, uma vez que houve atividade viral confirmada pela RT-nested PCR, porém sem a observação de sinais clínicos de DRB nos animais.

De acordo com Domingues, Spilki e Arns (2011), a ocorrência do vírus em rebanhos sem DRB pode ser comum. Nessa pesquisa, os autores detectaram duas amostras positivas para o BRSV a partir de suabes nasais de bovinos adultos que não apresentavam sinais clínicos de doença respiratória. As duas amostras foram caracterizadas no subgrupo B do BRSV, da qual já havia outros isolados brasileiros. De modo geral, os resultados encontrados sustentam a hipótese de que a manutenção do BRSV nos rebanhos está relacionada a infecções ou reinfecções subclínicas constantes em um pequeno número de indivíduos, o que explica sua elevada prevalência.

6.3. Sequenciamento de genes

O sequenciamento da amostra positiva BRSV-UnespJab-1 para o gene da proteína F do BRSV e sua relação genética com as demais sequências retiradas do "GenBank" revelou que ela pertence a um subgrupo não definido do BRSV (não tipável), apesar de a amostra ter mostrado maior proximidade na identidade de nucleotídeos e aminoácidos com o subgrupo A. No entanto, o fato de a amostra não ter amplificado para o gene G não permitiu que o mesmo fosse caracterizado, já que na literatura a maioria dos trabalhos de filogenia do BRSV está direcionada para as variações que são mais encontradas nesse gene (PROZZI et al., 1997; SCHRIJVER et al., 1998; SPILKI et al., 2006; BIDOKHTI et al., 2012).

Na revisão sobre BRSV de Spilki e Arns (2008), os autores apresentaram um dendrograma baseado nas sequências de nucleotídeos do gene da proteína F do BRSV, e três isolados brasileiros foram classificados como pertencentes ao subgrupo B. Entretanto, como foram poucos os isolados caracterizados até o momento, outros subgrupos do BRSV também podem estar presentes no território brasileiro, como a amostra BRSV-UnespJab-1 que foi encontrada no presente estudo.

Apesar de a proteína F se mostrar mais conservada do que a proteína G (HIMES; GERSHWIN, 1992), não significa que ela também não esteja em constante evolução. Valarcher, Schelcher e Bourhy (2000) verificaram a evolução das sequências gênicas da proteína F de isolados de vários países e constataram

valores importantes nas taxas de mutações sinônimas e não sinônimas na sequência de nucleotídeos desse gene. No entanto, as mutações não sinônimas foram muito inferiores às encontradas para o gene G. As elevadas taxas de mutações sinônimas comparadas às não sinônimas podem explicar o fato de a amostra BRSV-UnespJab-1 não ter apresentado muita variação na sequência de aminoácidos, que inclusive manteve conservado o peptídeo de fusão. Dessa forma, apesar de ser uma amostra diferente das demais relatadas na literatura, a função da proteína pode ter se mantido inalterada.

A caracterização de isolados do BRSV, seja por meio de anticorpos monoclonais, seja por técnicas de sequenciamento, nem sempre permitiu a classificação de acordo com os subgrupos definidos, revelando muitas amostras não tipáveis (FURZE et al., 1994; FURZE et al., 1997; SCHRIJVER et al., 1996a; SCHRIJVER et al., 1996b), entretanto, nenhuma sequência gênica da proteína F de um BRSV não tipável está disponível no “GenBank” para comparação com a amostra BRSV-UnespJab-1. A sequência da estirpe holandesa não tipável WBH, que foi a melhor caracterizada até o momento, está disponível apenas para o gene da proteína G, sendo inviável a sua comparação com a amostra do presente estudo.

Para Valarcher, Schelcher e Bourhy (2000), na análise da evolução dos isolados do BRSV europeus e norte-americanos, o vírus combina uma alta taxa de sequência evolutiva com uma alta taxa de mudanças nos aminoácidos de algumas regiões da proteína G, consideradas antigenicamente importantes (SULLENDER; EDWARDS, 1999). Essas mudanças podem ter sido exacerbadas pelo uso extensivo de vacinas contra o BRSV nos rebanhos europeus, proporcionando ao vírus a oportunidade de evadir-se do sistema imune do hospedeiro, já que a vacina pode ter ajudado a provocar uma pressão seletiva no vírus circulante nesses locais.

Diferentemente do que ocorre no Brasil, onde a vacinação contra o BRSV é minimamente utilizada, as diferenças encontradas na caracterização das estirpes devem estar relacionadas ao isolamento geográfico do rebanho nacional proporcionado pela diminuição das importações de bovinos da Europa, assim como pela seleção de mutantes de escape do vírus nas reinfecções pelo BRSV nos animais. Mesmo que a vacinação seja estimulada nos rebanhos brasileiros, o fato de a maioria das vacinas serem fabricadas a partir de isolados do subgrupo A e AB

precisa ser levado em consideração, pois até o momento, como não se dispõe da caracterização molecular do BRSV nos rebanhos do Brasil como um todo, o uso da vacina pode não surtir efeito satisfatório.

Sendo assim, apesar da alta soroprevalência de BRSV encontrada nos rebanhos leiteiros do presente estudo, a não confirmação de fatores de risco envolvidos na disseminação do agente e a caracterização da amostra BRSV-UnespJab-1 como não tipável, abrem perspectivas para estudos futuros relacionados à melhor caracterização do vírus nos rebanhos nacionais e aspectos de controle e prevenção da doença.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente estudo foi possível concluir que:

- a prevalência de BRSV nos 26 rebanhos bovinos esteve dentro da estimativa esperada, com 79,49% de reagentes;
- as elevadas prevalências de BRSV nos rebanhos leiteiros estudados dificultaram a determinação dos fatores de risco envolvidos na sua disseminação;
- a idade mais avançada dos animais e a presença dos vírus BoHV-1 e BVDV foram associadas à alta prevalência de BRSV, enquanto que o aleitamento natural constituiu-se como fator protetivo;
- foi caracterizada uma amostra circulante de BRSV diferente das demais amostras tipificadas no Brasil, o que sugere variações nos subgrupos conhecidos e também a necessidade de se conhecer melhor o tipo circulante em uma determinada área para recomendar medidas de profilaxia adequadas.

8. REFERÊNCIAS

AFFONSO, I. B.; GATTI, S. P.; ALEXANDRINO, B.; OLIVEIRA, M. C.; MEDEIROS, A. S. R.; BUZINARO, M. G.; SAMARA, S. I. Detection of antibodies against bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in dairy cattle with different prevalences of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 295-300, 2011.

AFFONSO, I. B.; GATTI, S. P.; MEDEIROS, A. S. R.; BUZINARO, M. G.; SAMARA, S. I. Atividade viral do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bezerros leiteiros. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, n. 2, p. 253-258, 2012.

ALMEIDA, R. S.; DOMINGUES, H. G.; SPILKI, F. R.; LARSEN, L. E.; HAGGLUND, S.; BELÁK, S.; ARNS, C. W. Circulation of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Veterinary Record**, London, v. 158, n. 18, p. 632-634, 2006.

ALMEIDA, R. S.; SPILKI, F. R.; ROEHE, P. M.; ARNS, C. W. Detection of Brazilian bovine respiratory syncytial virus strain by a reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction in experimentally infected calves. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 131-135, 2005.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANDERSON, K.; KING, A. M.; LERCH, R. A.; WERTZ, G. W. Polylactosaminoglycan modification of the respiratory syncytial virus small hydrophobic (SH) protein: a conserved feature among human and bovine respiratory syncytial viruses. **Virology**, New York, v. 19, n. 1, p. 417-430, 1992.

ARNS, C. W. Vírus Respiratório Sincicial dos Bovinos (BRSV): Situação no Brasil. In: SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1., 1996, Guarulhos. **Anais...** p. 37-39.

ARNS, C. W.; CAMPALANS, J.; COSTA, S. C. B.; DOMINGUES, H. G.; D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S. Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 2, p. 213-218, 2003.

ASTUDILLO, V. M. **Encuestas por muestreo para estudios epidemiologiclos en poblaciones animales**. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Rio de Janeiro: Editora Panamericana, 1979. p. 18-24.

BAKER, J. C.; AMES, T. R.; MARKHAM, R. J. F. Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 891-892, 1985.

BAKER, J. C.; AMES, T. R.; BELKNAP, E. B.; DUBOVI, E. J.; BRYSON, D. G.; KELLING, C. L. BRSV (Bovine Respiratory Syncytial Virus) infection: its pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 88, p. 880-906, 1993.

BAKER, J. C.; AMES, T. R.; MARKHAM, R. J. F. Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 240-245, 1986.

BAKER, J. C.; FREY, M. Bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 1, n. 2, p. 259-272, 1985.

BIDOKHTI, M. R. M.; TRAVÉN, M.; OHLSON, A.; ZARNEGAR, B.; BAULE, C.; BELÁK, S.; ALENIUS, S.; LIU, L. Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds. **Archives of Virology**, New York, v. 157, n. 4, p. 601-607, 2012.

BOHLENDER, R. E.; MCCUNE, M. W.; FREY, M. L. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Modern Veterinary Practice**, Santa Barbara, v. 63, p. 613-618, 1982.

BUNT, A. A.; MILNE, R. G.; SAYAYA, T.; VERBEEK, M.; VETTEN, H. J.; WALSH, J. A. Paramyxoviridae. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds.), **Virus taxonomy, Eigth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier, Academic Press, 2005. p. 655-671.

CAMPALANS, J; ARNS, C. W. Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1-2, p. 50-56, 1997.

CEPAGRI. **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br>. Acesso em: 20 abr 2013.

CHANOCK, R. M.; KIM, H. W.; VARGOSKO, A. J.; DELEVA, A.; JOHNSON, K. M.; CUMMING, C.; PARROT, R. H. Respiratory syncytial virus. I Virus recovery and other observations during 1960 outbreaks of bronchilitis pneumonia, and minor respiratory disease in child. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 176, n. 27, p. 647-653, 1961.

CHANOCK, R.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infants of a virus related to chimpanzees coryza agent. II. Epidemiologic aspects of infections in infants and young children. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 66, n. 3, p. 291-300, 1957.

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

COSTA, M.; GARCÍA, L.; YUNUS, A. S.; ROCKEMANN, D. D.; SAMAL, S. K.; CRISTINA, J. Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. **Veterinary Research**, Le Ulis, v. 31, n. 2, p. 241-246, 2000.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista de Educação Continuada CRMV- SP**, São Paulo, v. 5, fascículo 3, p. 300-312, 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**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 11, p. 961-966, 2011.

DUBOVI, E. J. Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.13, p.888-893, 1993.

DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 31, p. 815-820, 1990.

EFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 23, p. 13429–13434, 1996.

ELAZHARY, M. S. S. Y.; ROY, R. S.; CHAMPLIN, R.; HIGGINS, R.; MARSOLAIS, G. Bovine respiratory syncytial virus in Quebec, antibody prevalence and disease outbreak. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 44, n. 3, p. 299-303, 1980.

ELLIS, J. A.; HASSARD, L. E.; MORLEY, P. S. Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 206, n. 3, p. 354-361, 1995.

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

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FIGUEROA-CHÁVEZ, D.; SEGURA-CORREA, J. C.; GARCÍA-MÁRQUEZ, L. J.; PESCADOR-RUBIO, A.; VALDIVIA-FLORES, A. G. Detection on antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual purpose farms in Colima, Mexico. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 7, p. 1417-1421, 2012.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; BOTTON, S. A.; MEDEIROS, M.; IRIGOYEN, L .F.; DRIEMEIER, D.; SCHUCH, L. F.; MORAES, M. S. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 135-139, 2000.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FULTON, R. W.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; PERINO, L. J.; D'OFFAY, J. M.; PAYTON, M. E.; MOCK, R. E. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine hespesvirus-1, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. **Vaccine**, Kidlinton, v.13, n.8, p.725-733, 1995.

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

FURZE, J.; WERTZ, G.; LERCH, R.; TAYLOR, G. Antigenic Heterogeneity of the Attachment Protein of Bovine Respiratory Syncytial Virus. **Journal of General Virology**, London, v. 75, n. 2, p. 363-370, 1994.

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 enhance respiratory syncytial virus patophysiology. **Vaccine**, Kidliton, v. 16, n. 11-12, p. 1225-1236, 1998.

GONÇALVES, I. P. D.; SIMANKE, A. T.; JOST, H. C.; HÖTZEL, I.; DAL SOGLIO, A.; MOOJEN, V. Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 3, p. 389-390, 1993.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GREEN, P. **PHRAD documentation**. 1996. Disponível em: <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>. Acesso em: 20 jan 2013.

HALL, C. B.; DOUGLAS, R. G. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 99, n. 1, p. 100-103, 1981.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HIMES, R. S.; GERSHWIN, L. J. Bovine respiratory syncytial virus fusion protein gene: sequence analysis of cDNA and expression using a baculovirus vector. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 6, p. 1563-1567, 1992.

INABA, Y.; TANAKA, Y.; OMORI, T.; MATUMOTO, M. Isolation of Bovine Respiratory Syncytial Virus. **Japanese Journal of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 40, n. 6, p. 473-474, 1970.

KIMMAN, T. G.; WESTENBRINK, F.; STRAVER, P. J. Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 145-160, 1989.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LARSEN L. E.; TJORNERHOJ, K.; VIUFF, B.; JENSEN, N. E.; UTTENTHAL, A. Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 11, n. 5, p. 416-422, 1999.

LARSEN, L. E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, 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**, Washington, v. 38, n. 11, p. 4222-4227, 2000.

LARSEN, L. E.; UTTENTHAL, A.; ARCTANDER, P.; TJORNEHOJ, K.; VIUFF, B.; RONTVED, C.; RONSHOLT, L.; ALEXANDERSEN, S.; BLIXENKRONE-MOLLER, M. Serological and genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) indicates that Danish isolates belong to the intermediate subgroup: no evidence of a selective effect on the variability of G protein nucleotide sequence by prior cell culture adaption and passages in cell culture or calves. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 4, p. 265-279, 1998.

LERCH, R. A.; ANDERSON, K.; AMANN, L.; WERTZ, G. W. Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus. **Virology**, New York, v. 181, n. 1, p. 118-131, 1991.

LERCH, R. A.; ANDERSON, K.; WERTZ, G. W. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that human respiratory syncytial virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 5559-5569, 1990.

LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P. R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, London, v. 68, n. 9, p. 2521-2524, 1987.

LUZZAGO, C.; BRONZO, V.; SALVETTI, S.; FRIGERIO, M.; FERRARI, N. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 19-24, 2010.

MAHIN, L.; SHIMI, A. Weather and BRSV infection. **Veterinary Record**, London, v. 111, n. 4, p. 87, 1982.

MAHONY, J. B. Multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of sexually transmitted diseases. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 16, n. 1, p. 61-71, 1996.

MARTIN, H. T. Indirect hemagglutination test for the detection and assay of antibody to bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Record**, London, v. 113, n. 13, p. 290-293, 1983.

MOHANTY, S. B.; INGLING, A. L.; LILLIE, M. G. Experimentally induced respiratory syncytial viral infection in calves**. American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 36, n. 4, p. 417-419, 1975.

MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 92, n. 3, p. 544-549, 1956.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus taxonomy. **Archives of Virology**, New York, Suppl. 10, p. 268-274, 1995.

NETTLETON, P. F.; GILRAY, J. A.; CALDOW, G.; GIDLOW, J. R.; DURKOVIC, B.; VILCEK, S. Recent isolates of Bovine respiratory syncytial virus from Britain are more closely related to isolates from USA than to earlier British and current mainland European isolates. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Berlin, v. 50, n. 4, p. 196-199, 2003.

NORSTRÖM, M.; SKJERVE, E.; JARP, J. Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 87-96, 2000.

OBANDO, R. C.; HIDALGO, M.; MERZA, M.; MONTOYA, A.; KLINGEBORN, B.; MORENO-LÓPEZ, J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 271-278, 1999.

OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; HENNESSY, K. J.; STINE, L. C.; EVERMANN, J. F.; KELLING, C. L. Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridizations. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 5, p. 1237-1240, 1993.

ODEGAARD, Q. A.; KROGSRUD, J. A field outbreak caused by bovine respiratory syncytial virus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 429-431, 1977.

OHLSON, A.; HEUER, C.; LOCKHART, C.; TRAVÉN, M.; EMANUELSON, U.; ALENIUS, S. Risk factors for seropositivity to bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus in dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 167, n. 6, p. 201-206, 2010.

PACCAUD, M. F.; JACQUIER, C. L. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Archiv fuer die Gesamte Virusforschung**, Vienna, v. 30, n. 4, p. 327-342, 1970.

PASTEY, M. K.; SAMAL, S. K. Analyses of bovine respiratory syncytial virus envelop glycoproteins in cell fusion. **Journal of General Virology**, London, v. 78, n. 8, p. 193-197, 1997.

PEIXOTO, P. V.; MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; SOUZA, M. I. Infecção natural pelo vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 171-175, 2000.

PERRIN, B.; DANNACHER, G.; SOLSONA, M. Mise en evidence des anticorps contra le virus respiratoire syncytial chex les bovins francais. **Recueil de Medecine Veterinaire**, Paris, v. 155, n. 5, p. 465-471, 1979.

PIRIE, H. M.; PETRIE, L.; PRINGLE, C. R.; ALLEN, E. M.; KENNEDY, G. J. Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus. **Veterinary Record**, London, v. 108, n. 19, p. 411-416, 1981.

POTGIETER N. D.; ALDRIDGE, P. L. Use of indirect fluorescent antibody test in the detection of bovine respiratory syncytial virus antibodies in bovine serum. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 38, n. 9, p. 1153-1162, 1977.

PROZZI, D.; WALRAVENS, K.; LANGEDIJK, J. P.; 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**, London, v. 78, n. 2, p. 359-366, 1997.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple 10 method of estimating 50 per cent end point**.** **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

ROSENQUIST, B. D. Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory diseases. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 130, n. 2, p. 177-182, 1974.

ROSSI, C. R.; KIESEL, G. K. Serological evidence for the association of bovine respiratory syncytial virus with respiratory tract disease in Alabama cattle. **Infection and Immunity**, Washington, v. 10, n. 2, p. 293-298, 1974.

SAA, L. R.; PEREA, A.; JARA, D. V.; ARENAS, A. J.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; BORGE, C.; CARBONERO, A. Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 7, p. 1423-1427, 2012.

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

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**, Washington, v. 77, n. 8, p. 4609-4616, 2003.

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

SCHRIJVER, R. S.; LANGEDIJK, J. P. M.; MIDDEL, W. G. J.; KRAMPS, J. A.; RIJSEWIJK, F. A. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. A bovine respiratory syncytial virus strain with mutations in subgroup-specific antigenic domains of the G protein induces partial heterologous protection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 2-4, p. 159-175, 1998.

SCHRIJVER, R. S.; LANGEDIJK, J. P. M.; VAN DER POEL, W. H. M.; MIDDEL, W. G. J.; KRAMPS, J. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 3, n. 5, p. 500-506, 1996b.

SMITH, M. H.; FREY, M. L.; DIERKS, R. E. Isolation, characterization and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. **Archives of Virology**, New York, v. 47, n. 3, p. 237-247, 1975.

SOLÍS-CALDERÓN, J. J.; SEGURA-CORREA, J. C.; AGUILAR-ROMERO, F.; SEGURA-CORREA, V. M. Detection of antibodies and risk factors for infections with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 102-110, 2007.

SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S.; DOMINGUES, H. G.; D'ARCE, R. C. F.; FERREIRA, H. L.; CAMPALANS, J.; COSTA, S. C. B.; ARNS, C. W. Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncyctial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. **Virus Research**, Amsterdam, v. 116, n. 1-2, p. 161-168, 2006.

SPILKI, F. R.; ARNS, C. W. Vírus respiratório sincicial bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 3, p. 197-214, 2008.

STINE, L. C; HOPPE, D. K.; CLAYTON, L. K. Sequence conservation in attachment glycoproteins and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 54, n. 3-4, p. 201-221, 1997.

STOTT, E. J.; TAYLOR, G. Respiratory syncytial virus: brief review. **Archives of Virology**, New York, v. 84, n. 1-2, p. 1-52, 1985.

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**, Cambridge, v. 85, n. 2, p. 257-270, 1980.

SULLENDER, W. M.; EDWARDS, K. G. Mutations of respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G associated with resistance to neutralization by primate polyclonal antibodies. **Virology**, London, v. 264, n. 1, p. 230-236, 1999.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, n. 4, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

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**, London, v. 73, n. 9, p. 2217-2223, 1992.

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

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**, London, v. 78, n. 12, p. 3195-3206, 1997.

THOMAS, L. H.; COOK, R. S.; WYLD, S. G.; FURZE, J. M.; TAYLOR, G. Passive protection of gnotobiotic calves using monoclonal antibodies directed at different epitopes on the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 177, n. 4, p. 874-880, 1998.

THOMAS, L. H.; STOTT, E. J. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in the bovine respiratory tract by immunofluorescence. **Veterinary Record**, London, v. 108, n. 20, p. 432-435, 1981.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gag penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRUDEL, M.; NADON, F.; SIMARD, C.; BELANGER, F.; ALAIN, R.; SEGUIN, C.; LUSSIER, G. Comparision of Caprine, Human and Bovine Strains of Respiratory Syncytial Virus. **Archives of Virology**, New York, v. 107, n. 1-2, p. 141-149, 1989.

VALARCHER, J. F.; BOURHY, H.; GELFI, J.; SCHELCHER, F. Evaluation of nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1858-1862, 1999.

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

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

VAN DER POEL, W. H.; KRAMPS, J. A.; MIDDEL, W. G.; VAN OIRSCHOT, J. T.; BRAND, A. Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. **Archives of Virology**, New York, v. 133, n. 3-4, p. 309-321, 1993.

VAN DER POEL**,** W. H.; SCHRIJVER, R. S.; MIDDEL, W. G.; KRAMPS, J. A.; BRAND, A.; VAN OIRSCHOTVAN, J. T. Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 18, n. 3, p. 81-86, 1996.

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

WEST, K.; ELLIS, J. Functional analysis of antibody responses of feedlot cattle to bovine respiratory syncytial virus following vaccination with mixed vaccines. **Canadian Journal of Veterinary Research***,* Ottawa, v. 61, n. 1, p. 28-33, 1997.

WESTENBRINK, F.; BRINKHOF, J. M. A.; STAVER, P. J.; QUAK, J.; DE LEEUW, P. W. Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralization tests for serology of bovine respiratory virus infections. **Research on Veterinary Science**, v. 38, n. 3, p. 334-340, 1985.

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**, Tokyo, v. 67, n. 2, p. 145-150, 2005.

YESILBAG, K.; GÜNGÖR, B. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-western Turkey. **Tropical Animal Health Production**, Edinburgh, v. 40, n. 4, p. 55-60, 2008.

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**, Norwell, v. 23, n. 2, p. 157-164, 2001.

ZIMMER, G.; ROHN, M.; MCGREGOR, G. P.; SCHEMANN, M.; CONZELMANN, K. K.; HERRLER, G. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 47, p. 46854-46861, 2003.

APÊNDICE

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO - BRSV

Dados gerais:
Nome proprietário: _____
Nome da propriedade: _____
Telefone: _____
Endereço:_____
Cidade:_____
Coordenada geográfica:_____
Médico Veterinário responsável: _____
Email ou endereço: _____
Telefone: _____

Caracterização da propriedade:
Área total da propriedade: _____ ha
Área destinada aos animais (densidade):_____ ha
Sistema de produção utilizado:
( ) Confinamento ( ) Semi-confinado ( ) No pasto
Tipo de exploração:
( ) Leite ( ) Corte ( ) Leite/Corte
Quantidade de piquetes: _____

Tamanho do rebanho: _____
Raça predominante:_____
Animais adultos (acima de 12 meses):_____
Animais jovens (até 12 meses): _____
Reprodutores:_____

Qual a procedência dos animais que compõe o rebanho?
( ) leilão ( ) fazendas vizinhas ( ) fazendas de grandes produtores
Cidades:_____

Alimentação:
Fornece mineral ao rebanho? ( ) Sim ( ) Não Qual? _____

Utiliza concentrado na alimentação animal? ( ) Sim ( ) Não
Tipo de concentrado utilizado: _____

Utiliza volumoso na alimentação animal? ( ) Sim ( ) Não
Qual? _____

Sanidade:
Ocorrência de doenças nos últimos seis meses:
- ✓ Se afirmativo: Quais em bezerros

_____
Quais em adultos_____

Que frequência? _____

Como foi feito diagnóstico?_____

Tipo de vacinação que realiza:_____

Anti-helmínticos:_____

Testes para controle de enfermidades: _____

Laboratório: _____

Realiza quarentena? ( ) Não ( ) Sim
Animais introduzidos nos últimos 12 meses: _____
Possui bezerreiro? tipo: _____
( ) Individual ( ) Coletivo ( ) Outros

Cuidados com os bezerros recém-nascidos
( ) Administração de colostro ( ) Cura de umbigo
( ) Utilização de bezerreiros ( ) outros: _____

Como é feito o aleitamento dos bezerros:
( ) natural
( ) artificial com leite - quantos litros/dia? _____
( ) artificial com sucedâneo - qual? _____

Ocorrência de diarréias:
( ) Freqüentemente ( ) Raramente ( ) Ausente
Em que categoria animal? _____

Em caso de animais doentes, é feito seu isolamento? ( ) Sim ( ) Não

Tipo de limpeza realizada nas instalações: _____
Frequência de limpeza das instalações:
( ) diária ( ) semanal ( ) esporádica

Possui outras espécies animais na propriedade? ( ) Sim ( ) Não
Quais?
( ) Eqüino ( ) Ovino ( ) Suíno ( ) Aves ( )Cães/Gatos
Existe contato dos bovinos com esses animais? _____

Ocorrência de animais silvestres. Quais? _____