

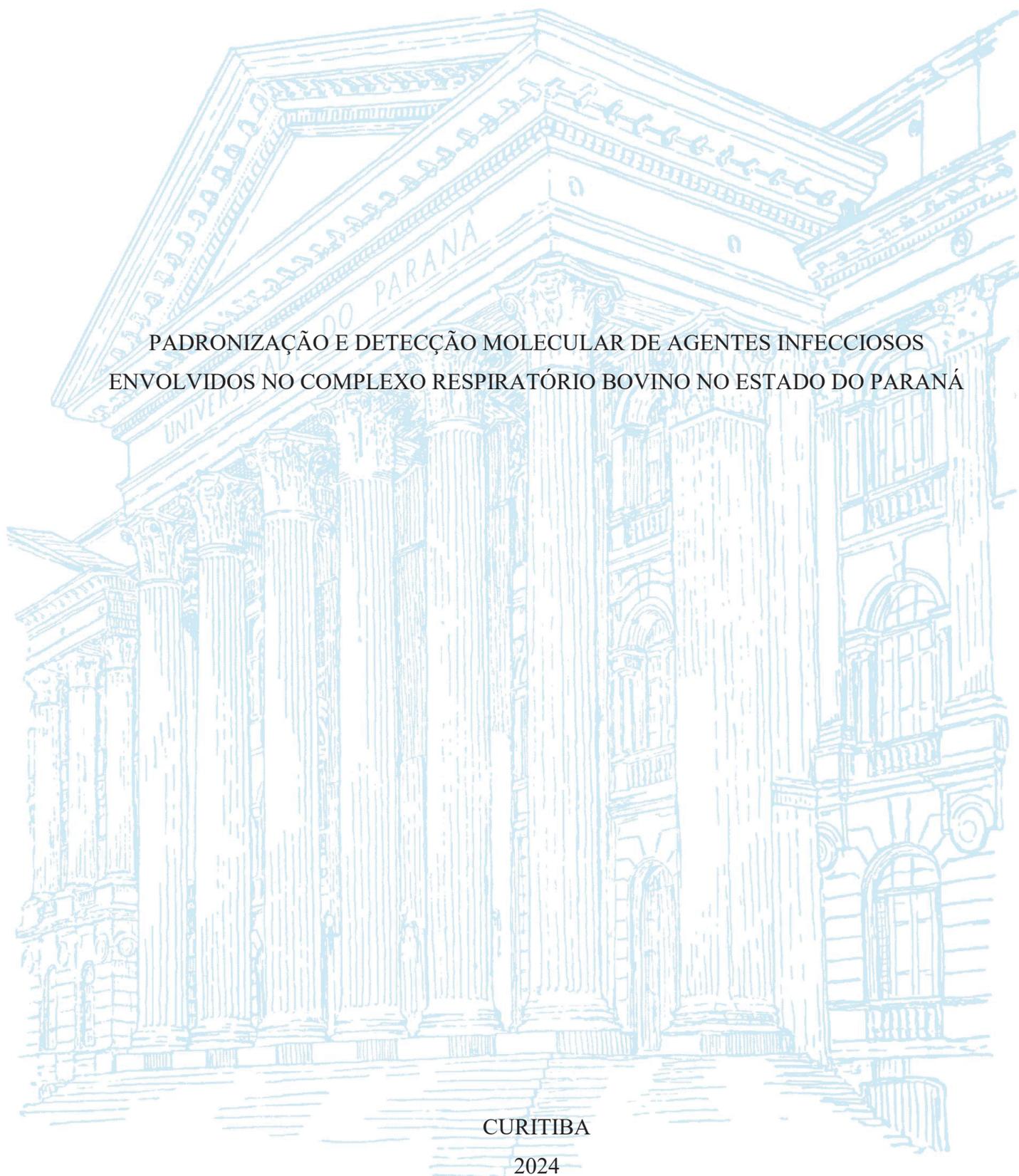
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA VAZ SILVA

PADRONIZAÇÃO E DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES INFECCIOSOS
ENVOLVIDOS NO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO NO ESTADO DO PARANÁ

CURITIBA

2024



ISABELA VAZ SILVA

PADRONIZAÇÃO E DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES INFECCIOSOS
ENVOLVIDOS NO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO NO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

Coorientadora: Dr^a. Maria Constanza Rodriguez

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Silva, Isabela Vaz

Padronização e detecção molecular de agentes infecciosos envolvidos no Complexo Respiratório Bovino no estado do Paraná / Isabela Vaz Silva. – Curitiba, 2024.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

Coorientadora: Dr^a. Maria Constanza Rodriguez

1. Complexo Respiratório Bovino. 2. Bovinos - Doenças. 3. Diagnóstico molecular. 4. Reação em cadeia da polimerase. I. Barros Filho, Ivan Roque de. II. Rodriguez, Maria Constanza. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

Bibliotecária: Elizabeth de Almeida Licke da Luz CRB-9/1434



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ISABELA VAZ SILVA** intitulada: **Padronização e detecção molecular de agentes infecciosos envolvidos no Complexo Respiratório Bovino no estado do Paraná**, sob orientação do Prof. Dr. IVAN ROQUE DE BARROS FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica

30/04/2024 09:22:40.0

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/04/2024 11:59:34.0

SELWYN ARLINGTON HEADLEY

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica

22/04/2024 11:25:47.0

ELIZABETH MOREIRA DOS SANTOS SCHMIDT

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 359635

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 359635

Dedico este trabalho à minha avó Sofia.
Obrigada por cuidar de todos nós aí de cima.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial minha mãe e meu pai, pelo apoio emocional e incentivo mesmo à distância. Eu não seria quem sou hoje sem vocês.

Ao meu companheiro Ítalo, pelo estímulo, paciência e carinho. Obrigada por sempre acreditar e instigar o melhor em mim.

Ao professor Ivan, por ter aceitado ser meu orientador e ter acreditado no potencial do projeto. Agradeço por tanto conhecimento compartilhado nas viagens a campo.

À Constanza, por me instruir tanto no mestrado quanto na residência técnica. Obrigada pela paciência, comprometimento e confiança sempre. Espero um dia ser uma profissional como você.

Ao professor João Perotta e aos residentes do Setor de Grandes Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Agradeço por todo o auxílio nas coletas.

A todos os colaboradores do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, em especial à Aniê, Cidinha, tia Dani, Mara, Pati e Sonia, que tanto me ensinaram e auxiliaram na residência técnica.

A todos da Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos da Secretaria da Saúde. Agradeço pela compreensão no final dessa jornada.

Aos meus amigos que me serviram de fonte de apoio, conforto e inspiração.

A todos os professores que colaboraram com a minha formação.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu concluísse essa etapa.

Muito obrigada!

“Quando tudo nos parece dar errado, acontecem coisas boas
que não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo”

Renato Russo

RESUMO

O Complexo Respiratório Bovino (CRB) é uma enfermidade com alta prevalência entre bovinos de todas as idades, resultando em significativas perdas econômicas. É caracterizado pela interação de vários fatores, como condições ambientais, manejo, presença de agentes patogênicos e suscetibilidade individual. A transmissão ocorre por meio do contato direto ou por fômites. Os principais vírus envolvidos são coronavírus bovino (BCoV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), alfa herpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1) e vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3). As bactérias mais encontradas são *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*. Diante disso, este trabalho objetiva avaliar, adaptar, otimizar e multiplexar protocolos de reação em cadeia da polimerase em tempo-real (qPCR) para detecção rápida dos principais agentes infecciosos envolvidos no CRB, e relatar um surto de doença respiratória que ocorreu na Mesorregião do Centro Oriental Paranaense. Até o momento, não foram identificados outros estudos que proponham protocolos semelhantes aplicáveis a esses patógenos. Foram realizadas curvas padrões de eficiência com controles positivos utilizando o método OFAT (um fator de cada vez), considerando temperatura de anelamento, concentração de primers e de material genético. A avaliação da eficiência foi realizada por meio de regressão linear, considerando os valores do ciclo de quantificação. Ainda, foi estimado um cálculo do custo de processamento dos ensaios, indicando que utilizar singleplex custa mais que o dobro do que custaria uma multiplex. Ao realizar otimização dos reagentes, estima-se economia de 70% com os custos de insumos laboratoriais. E, é aproximadamente 80% mais caro utilizar kits comerciais, quando comparado com o método multiplex *in house* proposto por este estudo. Paralelamente, foram coletadas amostras clínicas de animais provenientes de propriedades com surto de doença respiratória a fim de testar os protocolos adaptados. Foi detectado pelo menos algum agente etiológico patogênico em 57,62% das amostras coletadas a campo (121/210). Nas positivas, 71,9% (87/121) apresentaram apenas um agente, e 28,1% (34/121) com a detecção simultânea de dois ou mais agentes, o que confirma a possibilidade de coinfeções no Complexo Respiratório Bovino. Um dos surtos ocorreu em Sengés/PR (24°06'46"S 49°27'50"O), onde foi detectado BRSV (17/20) associado com *P. multocida* (16/20) e *H. somni* (10/20) em amostras de *swab* nasal e oral de animais não vacinados provenientes de uma propriedade leiteira. Por fim, conclui-se que a implementação de um painel diagnóstico pode proporcionar melhorias quanto à detecção, manejo e prevenção do CRB. É necessário monitorar os agentes etiológicos envolvidos para reduzir perdas econômicas e aumentar a sanidade e a produção.

Palavras-chave: CRB; Doença Respiratória Bovina; Diagnóstico Molecular; PCR em tempo-real; Multiplex.

ABSTRACT

Bovine Respiratory Disease Complex (BRD) is a highly prevalent disease among cattle of all ages, resulting in significant economic losses. It is characterized by the interaction of various factors, such as environmental conditions, management practices, presence of pathogenic agents, and individual susceptibility. Transmission occurs through direct contact or via fomites. The main viruses involved are bovine coronavirus (BCoV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bovine alphaherpesvirus type 1 (BoAHV1), and bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3). The most commonly found bacteria are *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, and *Pasteurella multocida*. This study aims to evaluate, adapt, optimize, and multiplex real-time polymerase chain reaction (qPCR) protocols for rapid detection of the main infectious agents involved in BRD, as well to report an outbreak of respiratory disease that occurred in the eastern central mesoregion of Paraná state, southern Brazil. No other studies have proposed similar protocols applicable to these pathogens. Efficiency standard curves were generated with positive controls using the one factor at a time (OFAT) method, considering annealing temperature, primer concentration, and genetic material concentration. Efficiency evaluation was conducted through linear regression, considering quantification cycle values. Additionally, a cost analysis of the assay processing indicated that using singleplex tests is more than twice as expensive as multiplex testing. Optimizing reagents was estimated to reduce laboratory supply costs by 70%. Moreover, commercial kits were found to be approximately 80% more expensive compared to the proposed in-house multiplex method. Simultaneously, clinical samples were collected from animals on farms experiencing outbreaks of respiratory disease to test the adapted protocols. At least one pathogenic agent was detected in 57.62% of the field-collected samples (121/210), with 71.9% (87/121) showing only one agent and 28.1% (34/121) with simultaneous detection of two or more agents, confirming the possibility of coinfections in the Bovine Respiratory Complex. One of the outbreaks occurred in Sengés/PR (24°06'46"S 49°27'50"O), where BRSV (17/20) was detected in association with *P. multocida* (16/20) and *H. somni* (10/20) in nasal and oral swab samples from non-vaccinated animals on a dairy farm. The implementation of a diagnostic panel can improve detection, management, and prevention of BRD. Monitoring the etiological agents involved is necessary to reduce economic losses and enhance health and production.

Keywords: BRD; Bovine Respiratory Disease; Molecular Diagnostics; Real-time PCR; Multiplex PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA ÁRVORE TRAQUEOBRÔNQUICA DO PULMÃO BOVINO.....	18
FIGURA 2 - GRÁFICO DE SOBREPOSIÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE FLUORÓFOROS	28
FIGURA 3 - GEOLOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS PARANAENSES VISITADOS E DE AMOSTRAS ENVIADAS AO CENTRO DE DIAGNÓSTICO “MARCOS ENRIETTI” (CDME)	30
FIGURA 4 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV).....	34
FIGURA 5 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV)	34
FIGURA 6 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3 (BPIV3).....	34
FIGURA 7 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoAHV1).....	35
FIGURA 8 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Mycoplasma bovis</i>	35
FIGURA 9 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Histophilus somni</i>	35
FIGURA 10 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Mannheimia haemolytica</i>	36
FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Pasteurella multocida</i>	36

FIGURE 12 - SENGÉS CITY OUTBREAK TIMELINE WITH INITIAL DAY OF THE CLINICAL SIGNS, SYMPTOMS AND AGENTS DETECTED.....	56
FIGURE 13 - PHYLOGENETIC TREE OF GENE F SEQUENCE FROM BRSV SENGÉS OUTBREAK	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LISTA DE <i>PRIMERS</i> E SONDAS UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DOS AGENTES INFECCIOSOS ENVOLVIDOS NO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO (CRB)	27
TABELA 2 - LISTA DE CONTROLES POSITIVOS USADOS NA PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DOS AGENTES INFECCIOSOS ENVOLVIDOS NO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO (CRB)	29
TABELA 3 - LISTA DE <i>PRIMERS</i> E SONDA UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO β -ACTINA	32
TABELA 4 - RESULTADOS DE SLOPE, R^2 (COEFICIENTE DE EXPLICAÇÃO) E EFF% (EFICIÊNCIA) DOS AGENTES ETIOLÓGICOS PADRONIZADOS NAS CURVAS DE EFICIÊNCIA REALIZADAS	33
TABELA 5 - RESULTADOS DOS C_q OBTIDOS NAS CURVAS DE EFICIÊNCIA REALIZADAS PARA PADRONIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS CONSIDERANDO AS DILUIÇÕES	33
TABELA 6 - ESTIMATIVA DO CUSTO EM DÓLARES AMERICANOS PARA 90 ENSAIOS POR DIAGNÓSTICO DE AGENTES DE DNA	36
TABELA 7 - ESTIMATIVA DO CUSTO EM DÓLARES AMERICANOS PARA 90 ENSAIOS POR DIAGNÓSTICO DE AGENTES DE RNA	37
TABELA 8 - TESTE DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO-REAL EM MULTIPLEX PARA AGENTES ETIOLÓGICOS DO CRB EM AMOSTRAS CLÍNICAS COLETADAS A CAMPO	37
TABELA 9 - FREQUÊNCIA DE AGENTES ETIOLÓGICOS DO CRB DETECTADOS EM AMOSTRAS CLÍNICAS COLETADAS A CAMPO	38
TABLE 10 - PRIMERS AND PROBES SEQUENCES USED FOR THE REAL-TIME PCR VIRAL AND BACTERIAL PANEL	53
TABLE 11 - PRIMERS USED FOR CONVENTIONAL AND SYBR GREEN PCR IN THE VIRAL PANEL	54
TABLE 12 - QUANTIFICATION CYCLE (C_q) VALUES FOR qPCR OF ENDOGENOUS CONTROL, VIRAL, AND BACTERIAL AGENTS OF ANTE AND POST MORTEM SAMPLES FROM THE TEN ANIMALS (FIVE CALVES AND FIVE COWS) TESTED	58

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BRSV	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
BCoV	Coronavírus bovino
BoAHV1	Alfaherpesvírus bovino tipo 1
BPIV3	Vírus parainfluenza bovino tipo 3
BRB	Doença Respiratória Bovina
CRB	Complexo Respiratório Bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HS	<i>Histophilus somni</i>
MB	<i>Mycoplasma bovis</i>
MH	<i>Mammheimia haemolytica</i>
nm	Nanômetro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	<i>Pasteurella multocida</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo-real
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 PARTICULARIDADES ANÁTOMO-FISIOLÓGICAS DOS BOVINOS	18
2.2 AGENTES VIRAIS ENVOLVIDOS NO CRB	19
2.3 AGENTES BACTERIANOS ENVOLVIDOS NO CRB	20
REFERÊNCIAS	21
3 PADRONIZAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E MULTIPLEXAGEM DE PCR EM TEMPO- REAL PARA DETECÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO	25
3.1 INTRODUÇÃO.....	26
3.2 METODOLOGIA.....	27
3.2.1 Padronização e otimização dos protocolos de PCR em tempo-real	27
3.2.2 Curva de eficiência	28
3.2.3 Amostras clínicas.....	29
3.2.4 Extração do ácido nucleico das amostras clínicas	31
3.2.5 Sensibilidade.....	31
3.2.6 Controle β -Actina	31
3.2.7 Custo de processamento dos ensaios	32
3.3 RESULTADOS	32
3.3.1 Curvas de eficiência.....	33
3.3.2 Custos de processamento dos ensaios	36
3.3.3 Teste em amostras clínicas coletadas a campo	37
3.4 DISCUSSÃO	38
3.5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	45
4 AN OUTBREAK OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN A DAIRY HERD FROM SOUTHERN BRAZIL	49
4.1 INTRODUCTION	49
4.2 MATERIAL AND METHODS.....	50
4.2.1 Location, herd, clinical presentation, and sampling	50
4.2.2 Virus isolation	51

4.2.3 Molecular panel	52
4.2.4 Sanger sequencing and Phylogenetic analysis	54
4.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	54
4.4 CONCLUSION	59
REFERENCES	60
ANEXO I – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande aptidão para a produção de carne e leite devido a sua ampla área geográfica e vasta quantidade de pastagens (Neto et al., 2013). Conforme o Perfil da Pecuária no Brasil de 2021 realizado pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne Bovina (ABIEC), o aumento de 8,4% para 10% da representatividade da pecuária no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro salienta o impacto do setor na economia do Brasil.

A cadeia agroindustrial do leite é uma vertente importante do agronegócio brasileiro, tanto no viés social quanto econômico, pois possui papel notório na produção alimentícia e geração de empregos (Neto et al., 2013). Durante os anos de 2002 a 2014, a produção leiteira brasileira aumentou em 62% devido às demandas do mercado interno (EMBRAPA, 2016), com a possibilidade de expandir as exportações de leite e laticínios.

Segundo a Pesquisa da Produção da Pecuária Municipal de 2022 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui um rebanho bovino efetivo composto por aproximadamente 234,5 milhões de animais e produção anual de 34,6 bilhões de litros de leite, sendo que a região Sul é responsável por 33,8% da produção total brasileira, com a maior produtividade entre as regiões do país. O Paraná ocupa a segunda colocação no *ranking* da produção de leite, com aproximadamente 4,5 bilhões de litros por ano (IBGE, 2022). Os dois municípios com maior produção leiteira do país são respectivamente, Castro e Carambeí, localizados na mesorregião centro oriental paranaense. Essa notoriedade paranaense na produção leiteira foi observada no levantamento dos 100 maiores produtores de leite do Brasil (Milkpoint, 2022). O relatório mostrou que 19 dos 100 maiores produtores de leite são do Paraná, sendo 18 destes da referida mesorregião.

O regime de confinamento de bovinos está cada vez mais presente na realidade brasileira, já que visa maior otimização de área necessária para a exploração de leite (Mota e Marçal, 2017). Desse modo, como a pecuária leiteira bovina é fortemente presente no Brasil, as doenças que afetam os bovinos são de grande importância econômica e epidemiológica.

As perdas econômicas resultantes do Complexo Respiratório Bovino (CRB) em confinamentos são estimadas no Brasil em um custo total de 11,8 milhões de dólares por ano, sendo 6,3 milhões devido à morbidade e 5,5 milhões pela mortalidade dos animais. No geral, foi estimado 0,64% de mortalidade e 7,05% de morbidade, sendo que desses animais doentes, 86,9% desenvolvem CRB (Baptista et al., 2017). Apesar dos altos custos, dados sobre perdas econômicas e prevalência dos agentes etiológicos do CRB ainda são escassos no Brasil (Oliveira et al., 2020). Dessa forma, criar suporte técnico para a detecção rápida desses

patógenos é importante para orientar medidas de prevenção e controle do Complexo Respiratório Bovino (Zhang et al., 2022).

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos da presente pesquisa foram:

- a) Padronizar, testar, avaliar, adaptar, otimizar e multiplexar protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo-real para a detecção rápida e acurada de patógenos envolvidos em infecções respiratórias bovinas;
- b) Montar um painel para diagnóstico de patógenos respiratórios de bovinos;
- c) Identificar por meio de ensaios diagnósticos moleculares os agentes infecciosos causadores de sintomatologia respiratória em bovinos a partir de amostras *ante* e *post mortem* de animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Complexo Respiratório Bovino (CRB) ou Doença Respiratória Bovina (DRB) é uma enfermidade multietiológica e multifatorial, que pode causar sintomatologia respiratória ou promover infecção assintomática em bovinos de diferentes faixas etárias (Cooper e Brodesen, 2010). A presença do CRB, especialmente em criações em confinamento, pode resultar em prejuízos financeiros significativos ligadas à morbidade, mortalidade, custo de tratamento e diminuição da produção leiteira (Buchanan et al., 2016). O confinamento em si pode causar estresse aos animais devido a alterações do comportamento natural e modificações na hierarquia do rebanho, levando a uma redução do bem-estar (Mota e Marçal, 2019). Esse estresse possui impacto significativo na incidência e gravidade do Complexo Respiratório Bovino (Hodgson et al., 2005).

Os principais fatores predisponentes para que o CRB ocorra são o estresse, mudanças na dieta, transporte por distâncias longas, criação dos bovinos em regime de confinamento, aglomeração de animais, deficiência nutricional, exposição a agentes infecciosos, mudanças bruscas de temperatura e umidade, estresse térmico, ventilação inadequada e agrupamento de animais de diferentes idades e origens (Griffin et al., 2010; Hay et al., 2017). Os sinais clínicos mais comuns apresentados pelos animais acometidos são anorexia, depressão, febre, tosse, secreção nasal e ocular, aumento da frequência respiratória e salivação. Conforme ocorre progressão dos sinais clínicos, pode ocorrer dispneia, sinais de toxemia, possível presença de secreção mucopurulenta nasal, pneumonia e morte (Wilkins, Baker, Ames, 2006).

No CRB, tanto vírus como bactérias podem atuar como agentes primários isoladamente ou em infecções mistas (Snowder et al., 2006). Alguns dos principais vírus envolvidos na sintomatologia do Complexo Respiratório Bovino são coronavírus bovino (BCoV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), alfaherpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3). Entre as bactérias pode-se citar *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* (Cooper e Brodesen, 2010). Frequentemente estes patógenos encontram-se associados em quadros mais complicados, que podem causar pneumonia e morte. Dependendo da virulência dos agentes infecciosos envolvidos e da suscetibilidade do animal, a doença pode causar infecção primária no aparelho respiratório cranial, predispondo a infecções secundárias (Gorden e Plummer, 2010).

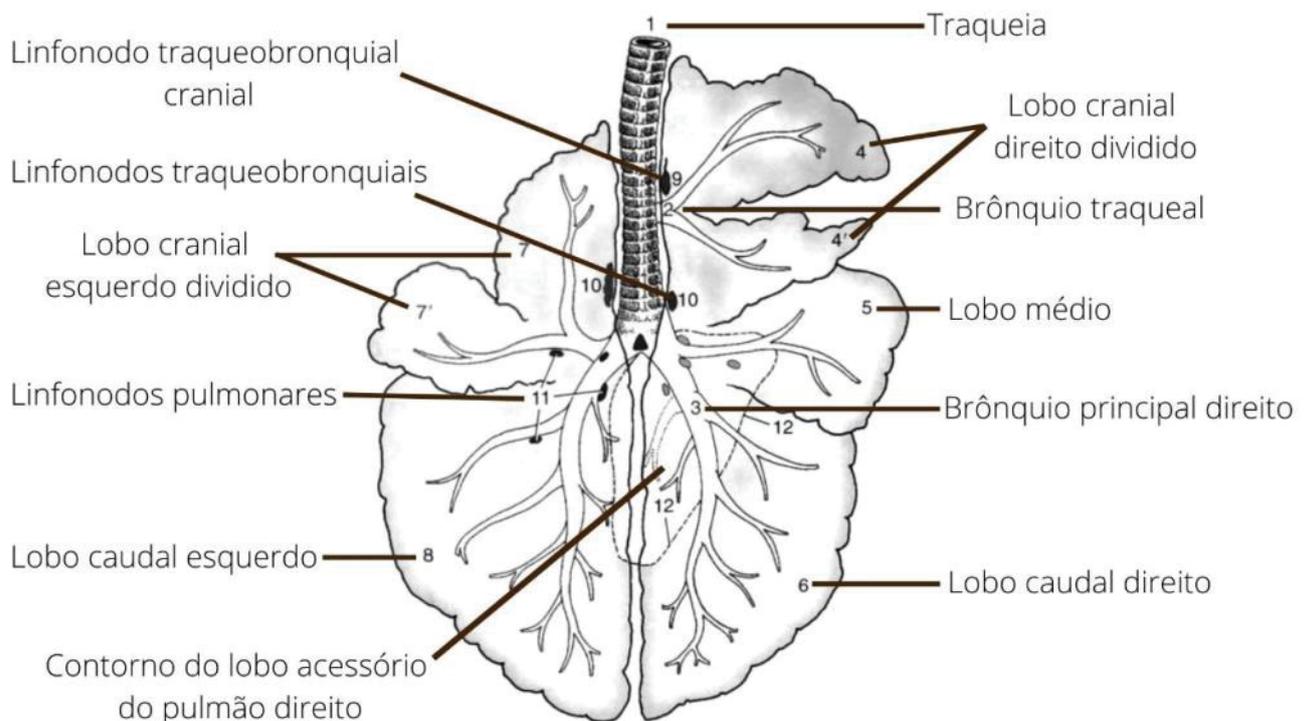
Individualmente, os custos por animal doente por DRB são em média de 26,62 dólares americanos, e em caso de óbito, 682,4 dólares americanos (Baptista et al., 2017). Os

custos diretos são ligados a mortalidade, tratamento e redução de índices zootécnicos, como redução do ganho de peso e produção leiteira. Os custos indiretos estão relacionados com a mão de obra devido ao aumento do manejo e adaptação de infraestrutura adequada (Buchanan et al., 2016).

2.1 PARTICULARIDADES ANÁTOMO-FISIOLÓGICAS DOS BOVINOS

Alguns fatores fisiológicos e particulares dos bovinos faz com que esta espécie seja mais suscetível a doenças respiratórias. Ao comparar com outras espécies, como cães, suínos e equinos, é possível notar que a árvore traqueobrônquica dos bovinos é mais longa. Isso faz com que aumente o espaço morto e promova maior lentidão no fluxo de ar, maior área para deposição de partículas e maior risco de hipoventilação (Ackerman, Derscheid, Roth, 2010). Os bovinos possuem caixa torácica mais rígida, além de menor quantidade de macrófagos alveolares, células ciliadas e caliciformes. Ainda, o pulmão bovino possui lóbulos, conforme ilustrado na Figura 1, o que faz com que haja maior risco de hipóxia nas porções distais, diminuindo ainda mais a capacidade de trocas gasosas (Coutinho, 2005; Kirschvink, 2008).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA ÁRVORE TRAQUEOBRÔNQUICA DO PULMÃO BOVINO



FONTE: Adaptado de Dyce (2010).

2.2 AGENTES VIRAIS ENVOLVIDOS NO CRB

O coronavírus bovino (BCoV) possui genoma RNA fita simples sentido positivo e em média 100 nm de diâmetro. Os vírions possuem envelope com proteínas no formato de espículas, resultando em uma aparência de coroa visualizada pela microscopia eletrônica, o que dá origem ao nome (Flores, 2012). O coronavírus é frequentemente associado a episódios de doença respiratória, diarreia em bezerros e disenteria em bovinos adultos, devido ao tropismo pelos tratos respiratório e intestinal (Boileau e Kapil, 2010).

O vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) possui genoma RNA fita simples sentido negativo e pode apresentar entre 80 a 350 nm de diâmetro. É um vírus pleomórfico e envelopado (Flores, 2012). Comumente atua como agente primário da doença respiratória, com possibilidade de replicação por todo o trato respiratório bovino. Também pode favorecer o desenvolvimento de pneumonia bacteriana por aumentar a aderência e colonização de bactérias (Larsen et al., 2000; Valarcher, Taylor, 2007).

O alfaherpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1) possui genoma DNA fita dupla linear circundado por um nucleocapsídeo icosaédrico, tendo em média 70 a 110 nm de diâmetro. Seu envelope possui um potencial imunogênico, responsável por induzir a produção de anticorpos no animal (Mettenleiter, 2004; Flores, 2012). Por tratar-se de um herpesvírus, o BoAHV1 também tem capacidade de induzir latência nos gânglios de seu hospedeiro. Nesse período, o vírus encontra-se na forma episomal circular e não possui expressão gênica. Porém, quando o bovino hospedeiro passa por fatores estressantes, o vírus pode ser reativado (Jones, 2003).

O vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3) possui genoma RNA fita simples sentido negativo, podendo variar de 80 a 350 nm de diâmetro. Na maior parte dos casos os animais infectados apresentam quadros clínicos brandos. Porém pode tornar-se grave quando associado a infecções bacterianas secundárias (Flores, 2012).

Os vírus BCoV, BRSV e BoAHV1 têm sido frequentemente associados ao CRB e isolados no Brasil (Driemeier et al., 1997; Silva et al., 2007; Dias et al., 2008, Oliveira, T. E. S. et al., 2020; Oliveira, V. H. S. et al., 2020; de Mello et al., 2024). Ao contrário dos outros vírus envolvidos no CRB, não há muitos relatos brasileiros de isolamento do BPIV3. Existe o relato de isolamento a partir de amostras de pulmão bovino no estado de São Paulo (Candeias et al., 1971) e de secreções nasais de um bezerro com infecção respiratória no estado do Rio Grande do Sul (Gonçalves et al., 2003).

2.3 AGENTES BACTERIANOS ENVOLVIDOS NO CRB

Mycoplasma bovis pertence ao gênero *Mycoplasma* e se difere por não possuir parede celular rígida (Waites et al., 2012). Bactérias desse gênero são pequenas, pleomórficas, e em sua maioria anaeróbias facultativas (Tortora, Funke, Case, 2012). Além da broncopneumonia crônica com necrose caseosa, também pode provocar mastite, artrite e outras enfermidades (González, Wilson, 2003; Manzi, et al., 2018).

Histophilus somni é uma bactéria gram-negativa, pleomórfica, comensal, que reside comumente na região nasofaríngea, e coloniza o trato respiratório caudal de bovinos. Além da broncopneumonia supurativa, *H. somni* pode causar meningoencefalite, pleurite, miocardite, mastite, septicemia e problemas reprodutivos (Apley, 2006; Headley et al., 2013)

Mannheimia haemolytica é uma bactéria pequena, gram-negativa, anaeróbia facultativa e imóvel (Griffin et al., 2010). Faz parte da microbiota natural da nasofaringe e criptas tonsilares, podendo ter acesso aos pulmões quando há imunodepressão causada por estresse ou infecção por outros patógenos (Highlander, 2001; Rice et al., 2007).

Pasteurella multocida é um cocobacilo gram-negativo encapsulado, causador principalmente de pneumonia e septicemia (Krewer et al., 2008). É uma das bactérias mais comumente associadas ao Complexo Respiratório Bovino. A infecção por *P. multocida* pode causar broncopneumonia aguda a subaguda com ou sem pleurite associada (Dabo et al., 2007), sendo mais comum em bovinos jovens (Griffin et al., 2010).

A infecção com as bactérias supracitadas em bovinos com doença respiratória é comum no Brasil (Headley et al., 2014; Baptista et al., 2017; Headley et al., 2017; Oliveira et al., 2020).

REFERÊNCIAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne Bovina. **Perfil da Pecuária no Brasil de 2021**. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/> Acesso em: 10 maio 2022.
- ACKERMANN, M.R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J.A. Innate immunology of bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 215-228, jul. 2010.
- APLEY, M. Bovine respiratory disease pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 399-411, jul. 2006.
- BAPTISTA, A. L.; REZENDE, A. L.; FONSECA, P. A.; MASSI, R. P.; NOGUEIRA, G. M.; MAGALHÃES, L. Q.; HEADLEY, S. A.; MENEZES, G. L.; ALFIERI, A. A.; SAUT, J. P. E. Bovine respiratory disease complex associated mortality and morbidity rates in feedlot cattle from southeastern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 10, p. 791-799, out. 2017.
- BOILEAU, M. J.; KAPIL, S. Bovine coronavirus associated syndromes. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 123-146, mar. 2010.
- BUCHANAN J. W.; MACNEIL M. D.; RAYMOND R.C.; MCCLAIN A. R.; VAN EENENNAAM A.R. Rapid Communication: Variance component estimates for Charolais-sired fed cattle and relative economic impact of bovine respiratory disease. **Journal of Animal Science**, v. 94, n.12, p. 5456-5460, dez. 2016.
- CANDEIAS, J. A. N.; SUGAY, W.; RIBEIRO, L. C. Isolamento de Myxovirus parainfluenza 3 de gado bovino no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, n. 2, p. 207-212, dez. 1971.
- COOPER, V. L.; BRODERSEN, B. W. Respiratory disease diagnostics of cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 409-416, jul. 2010.
- COUTINHO, A. S. **Complexo das Doenças Respiratórias de Bezerros**. In: II Simpósio Mineiro de Buiatria; n. 2. Belo Horizonte, Brasil, 2005.
- DABO, S. M.; TAYLOR, J. D.; CONFER, A. W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 129-150, dez. 2007.
- DE MELLO, J. L.; LORENCENA, D.; DELAI, R. R.; KUNZ, A. F.; POSSATTI, F.; ALFIERI, A. A.; TAKIUCHI, E. A comprehensive molecular analysis of bovine coronavirus strains isolated from Brazil and comparison of a wild-type and cell culture-adapted strain associated with respiratory disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, fev. 2024.
- DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C.; FREITAS, J. C.; FERREIRA NETO, J. S.; MULLER, E. E. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em

rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 161-168, mar. 2008.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M. J. P.; MOOJEN, V.; ARNS, C. W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U. M. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 77-81, 1997.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2016.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**, 2 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012.

GONÇALVES, D. A.; SPILKI, F. R.; CHIMINAZZO, C.; OLIVEIRA, M. A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 953-956, out. 2003.

GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 199-221, mar. 2003.

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

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M. M.; KUSZAK, J.; MCVEY, D.S. Bacterial Pathogens of the Bovine Respiratory Disease Complex. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 381-394, jul. 2010.

HAY, K. E.; MORTON, J. M.; CLEMENTS, A.; MAHONY, T. J.; BARNES, T.S. Population-level effects of risk factors for bovine respiratory disease in Australian feedlot cattle. **Preventive veterinary medicine**, v. 140, p. 78-86, 2017.

HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. F.; OLIVEIRA, V. H. S.; BEUTTENMULLER, E. A.; ALFIERI, A. A. *Histophilus somni* is a potential threat to beef cattle feedlots in Brazil. **Veterinary Record**, v. 175, n. 10, p. 249, jul. 2014.

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

HEADLEY, S. A.; BALBO, L. C.; ALFIERI, A. F.; SAUT, J. P. E.; BAPTISTA, A. L.; ALFIERI, A. A. Bovine respiratory disease associated with *Histophilus somni* and bovine respiratory syncytial virus in a beef cattle feedlot from southeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 283-294, 2017.

HIGHLANDER, S. K. Molecular genetic analysis of virulence on *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 1125-1150, set. 2001.

HODGSON, P. D.; AICH, P.; MANJUA, A. HOKAMP, K.; ROCHE, F. M.; BRINKMAN, F. S. L.; POTTER, A.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. J. Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. **Comparative and Functional Genomics**, v. 6, p. 244-250, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2022. Rio de Janeiro, v. 50, p. 1-12, 2022.

JONES, C. Herpes simplex vírus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n. 1, p.79-95, jan. 2003.

KIRSCHVINK, N. Respiratory function in cattle: impact of breed, heritability and external factors. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 115, n. 7, p. 265-270, jul. 2008.

KREWER, C. C.; MABONI, F.; WITT, N. M.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. P. C. Transmissão de *Pasteurella multocida* para humano através de mordida de gato – relato de caso. **Veterinária Notícias**, v. 14, n. 1, p. 77-80, 2008.

LARSEN, L. E.; TJØRNEHØJ, K.; VIUFF, B. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed 35 herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4222–4227, nov. 2000.

MANZI, M. P.; JOAQUIM, S. F.; GUIMARÃES, F. F.; BRUDER-NASCIMENTO, A. C. M. O.; PANTOJA, J. C. F.; LANGONI, H. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 665-669, abril 2018.

METTENLEITER, T.C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, v.106, n. 2, p.167-180, out. 2004.

MILKPOINT. **Levantamento TOP 100**. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/top100/2022/> Acesso em: 10 maio 2022.

MOTA, R. G.; MARÇAL, W. S. Comportamento e bem-estar animal de bovinos confinados: Alternativas para uma produção eficiente, rentável e de qualidade: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal.**, v. 13, n. 1, p. 125-141, mar. 2019.

NETO, J. R. M. A.; SANTOS, G. M.; ARROYO, R. J. O.; SOUSA, V. O.; FERREIRA, A. M. Sustentabilidade da pequena propriedade leiteira. **Revista Interdisciplinar do Direito - Faculdade de Direito de Valença**, v. 10, n. 2, p. 397-402, 2013.

OLIVEIRA, T. E. S.; PELAQUIM, I. F.; FLORES, E. F.; MASSI, R. P.; VALDIVIEZO, M. J. V.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; ALFIERI, A. A.; SAUT, J. P. E.; HEADLEY, S. A. *Mycoplasma bovis* and viral agentes associated with the development of bovine respiratory disease in adult dairy cows. **Transboundary and Emerging Disease**, v. 67, p. 82-93, maio 2020.

OLIVEIRA, V. H. S.; DALL AGNOL, A. M.; FRITZEN, J. T. T.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Microbial diversity involved in the etiology of a bovine respiratory disease outbreak in dairy calf rearing unit. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 71, 101494, ago. 2020.

RICE, J. A. CARRASCO-MEDINA, L.; HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 117-128, dez. 2007.

SILVA, M. S.; BRUM, M. C. S.; LORETO, E. L. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, n. 2, p. 191-199, set. 2007.

SNOWDER, G. D.; VAN VLECK, L. D. VAN; CUNDIFF, L. V.; BENNETT, G. L. 37 Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 1999-2008, ago. 2006.

TORTORA G. J.; FUNKE B. R.; CASE C. L. **Procaríotos: Domínios Bacteria e Archaea**. In: Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 319-320, 2012.

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

WAITES K. B., LYSNYANSKY I., BÉBÉAR C. M. **Emerging antimicrobial resistance in mycoplasmas of humans and animals**. In: Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis, p. 289–322, jan. 2014

WILKINS P. A.; BAKER J. C.; AMES T. R. **Doenças do sistema respiratório**. In: SMITH, B. P. Medicina Interna de Grandes Animais. 3a ed. Barueri: Manole, p. 479-592, 2006.

ZHANG, J.; WANG, W.; YANG, M.; LIN, J.; XUE, F.; ZHU, Y.; YIN, X. Development of a One-Step Multiplex Real-Time PCR Assay for the Detection of Viral Pathogens Associated With the Bovine Respiratory Disease Complex. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, n. 825257. jan. 2022.

3 PADRONIZAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E MULTIPLEXAGEM DE PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO

Resumo: O Complexo Respiratório Bovino (CRB) é uma enfermidade com alta prevalência entre bovinos de todas as idades, resultando em significativas perdas econômicas. É caracterizada pela interação de vários fatores, como condições ambientais, manejo, presença de agentes patogênicos e suscetibilidade individual. Os principais vírus envolvidos são coronavírus bovino (BCoV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), alfa herpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1) e vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3). As bactérias incluem *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*. O objetivo desta pesquisa foi testar, avaliar, adaptar, otimizar e multiplexar protocolos de reação em cadeia da polimerase em tempo-real (qPCR) para detecção rápida e acurada dos principais agentes etiológicos do CRB. Foram realizadas curvas padrões de eficiência com controles positivos utilizando o método OFAT (um fator de cada vez), considerando temperatura de anelamento, concentração de *primers* e de material genético. A avaliação da eficiência foi realizada através de regressão linear, considerando os valores do ciclo de quantificação. Foram coletadas amostras clínicas de animais provenientes de propriedades com surto de doença respiratória a fim de testar os protocolos adaptados. A implementação desse painel diagnóstico pode proporcionar melhorias quanto à detecção, manejo e prevenção da CRB. É necessário monitorar os agentes etiológicos envolvidos no Complexo Respiratório Bovino para reduzir perdas econômicas e melhorar a sanidade e a produção dos rebanhos.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; qPCR; Multiplex PCR; DRB; CRB.

Abstract: Bovine Respiratory Disease Complex (BRD) is a prevalent illness among cattle of all ages, resulting in significant economic losses. It is characterized by the interaction of several factors such as environmental conditions, management practices, presence of pathogens and individual susceptibility. The main viruses involved include bovine coronavirus (BCoV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bovine alpha herpesvirus type 1 (BoAHV1) and bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3). Bacteria such as *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* are also implicated. The aim of this research was to test, evaluate, adapt, optimize, and multiplex real-time polymerase chain reaction (qPCR) protocols for rapid and accurate detection of the main etiological agents of BRD. Standard efficiency curves were performed with positive controls using the OFAT method (one factor at a time), considering annealing temperature, primer concentration, and genetic material concentration. Efficiency assessment was conducted through linear regression. Additionally, clinical samples were collected from animals on properties experiencing outbreaks of respiratory disease to test the adapted protocols. The implementation of this diagnostic panel can provide improvements in BRD detection, management, and prevention of BRD. It is necessary to monitor the involved Bovine Respiratory Disease Complex etiological agents to reduce economic losses and improve health and production.

Keywords: Molecular diagnostics; qPCR; Multiplex PCR; BRDC; BRD.

3.1 INTRODUÇÃO

O Complexo Respiratório Bovino (CRB) é uma afecção com alta prevalência que afeta bovinos de todas as idades e gera prejuízos econômicos relevantes (Kishimoto et al., 2017). É caracterizado por uma combinação de fatores, como condições ambientais, manejo, presença de agentes etiológicos e a própria suscetibilidade individual (Pansri et al., 2020). A transmissão ocorre por meio do contato direto entre os animais e indiretamente pelo ambiente ou por fômites (Stokstad et al., 2020).

O CRB pode causar tosse, dispneia, secreção nasal e febre, podendo levar a complicações mais graves como pneumonia e morte (Wilkins et al., 2006). Esta condição ocorre como resultado da interação entre diferentes agentes infecciosos, como coronavírus bovino (BCoV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), alfaherpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1), vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3), *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* (Pansri et al., 2020). A gravidade da doença varia com a suscetibilidade do hospedeiro e a virulência do agente etiológico, podendo haver predisposição a infecções bacterianas secundárias (Gorden, Plumer, 2010).

Faz-se necessário o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico na tentativa de atenuar o impacto econômico causado na produção animal, visando assim estratégias de prevenção (Loy et al., 2018). Atualmente, observa-se uma tendência caracterizada pelo aumento das padronizações de painéis de diagnóstico do CRB empregando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo-real (Thonur et al., 2012; Kishimoto et al., 2017; Loy et al., 2018; Pansri et al., 2020; Zhang et al., 2022). Há também padronizações para doenças que afetam outros sistemas (Tsuchiaka et al., 2015) e outras espécies (Sunaga et al., 2019; Shibamura et al., 2023).

A padronização de ensaios moleculares visa estabelecer protocolos que garantam resultados confiáveis e reproduzíveis. Para tal, é necessário realizar a otimização dos ensaios, que consta com ajustes de parâmetros da PCR para maximizar a sensibilidade, especificidade e eficiência do ensaio, incluindo a concentração de *primers* e sondas, temperatura de anelamento, ciclos de amplificação e concentração de material genético. É uma etapa que pretende obter resultados precisos com a menor quantidade de reagentes e tempo possível, possibilitando maior economicidade (Bustin et al., 2009).

Desse modo, o objetivo deste estudo foi testar, avaliar, adaptar, otimizar e multiplexar protocolos de reação em cadeia da polimerase em tempo-real (qPCR) para detecção rápida, acurada e acessível financeiramente dos principais agentes etiológicos

envolvidos no Complexo Respiratório Bovino, tendo como produto um painel de diagnóstico de patógenos respiratórios.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Padronização e otimização dos protocolos de PCR em tempo-real

Os ensaios sintetizados no presente trabalho (*primer forward*, *primer reverse* e sonda) foram escolhidos conforme artigos publicados anteriormente (Decaro et al., 2008; Sachse et al., 2010; Thonur et al., 2012, Kishimoto et al., 2017). A Tabela 1 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos, as fluorescências e os protocolos de referência utilizados para cada um dos agentes infecciosos testados.

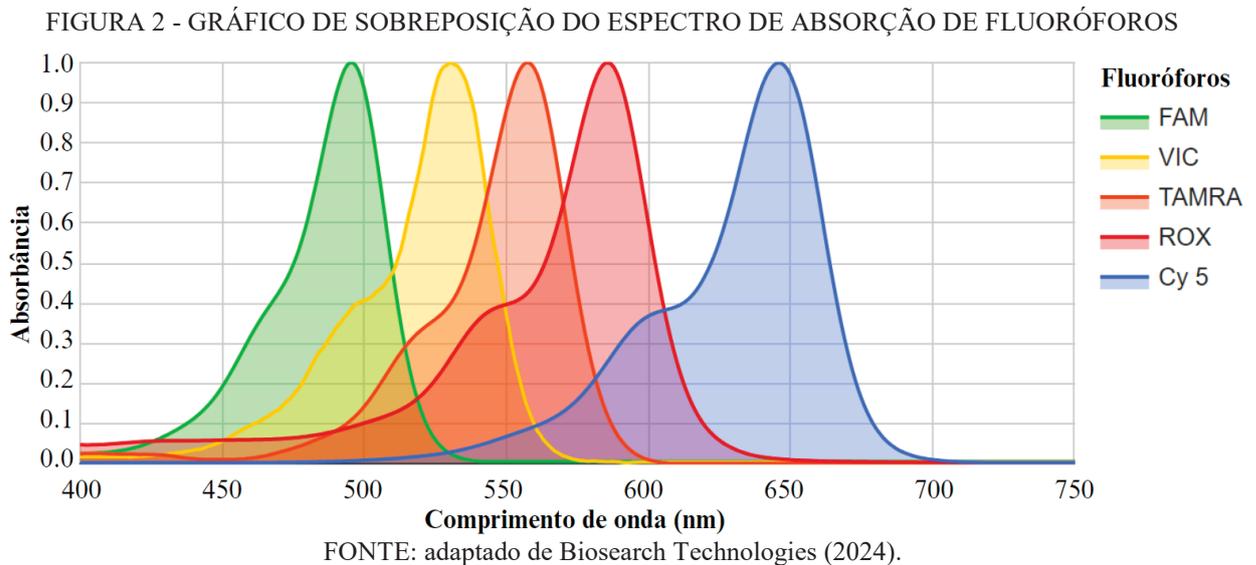
TABELA 1 - LISTA DE *PRIMERS* E SONDAS UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DOS AGENTES INFECCIOSOS ENVOLVIDOS NO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO (CRB)

Agente infeccioso	Oligonucleotídeos	Fluorescência usada	Referência
BCoV	F: CTGGAAGTTGGTGGAGTT R: ATTATCGGCCTAACATACATC S: CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT	FAM	Decaro et al. 2008
BRSV	F: GGTCAAACCTAAATGACACTTTCAACAAG R: AGCATACCACACAACCTATTGAGATG S: AGTACAGGTGACAA+CA+T +TG	TAMRA	Thonur et al. 2012
BPIV3	F: TGATTGGATGTTTCGGGAGTGA R: AGAATCCTTTTCCTCAATCCTGATATACT S: TACAATCGAGGATCTTGTTCA	FAM	Thonur et al. 2012
BoAHV1	F: TGTGGACCTAAACCTCACGGT R: GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC S: AGGACCGCGAGTTCTTGCCGC	FAM	Thonur et al. 2012
<i>M. bovis</i>	F: TCAAGGAACCCCACCAGAT R: AGGCAAAGTCATTTCTAGGTGCAA S: TGGCAAACCTTACCTATCGGTGACCCT	CY5	Sachse et al. 2010
<i>H. somni</i>	F: AAGGCCTTCGGGTTGTAAAG R: CCGGTGCTTCTTCTGTGATTAT S: CGGTGATGAGGAAGGCGATTAG	TAMRA	Kishimoto et al. 2017
<i>M. haemolytica</i>	F: ATTAGTGGGTTGTCCTGGTTAG R: GCGTGATTTTCGGTTCAGTTG S: CTGAACCAACACGAGTAGTCGCTGC	FAM	Kishimoto et al. 2017
<i>P. multocida</i>	F: GGGCTTGTCGGTAGTCTTT R: CGGCAAATAACAATAAGCTGAGTA S: CGGCGCAACTGATTGGACGTTATT	VIC	Kishimoto et al. 2017

FONTE: Os Autores (2024). LEGENDA: F = *Primer Forward*; R = *Primer Reverse* e S = Sonda.

Para a padronização da multiplex qPCR, os vírus com material genético RNA (BCoV, BPIV3 e BRSV) foram processados com o kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fischer Scientific) e otimizados com as mesmas concentrações de reagentes e temperaturas de ciclagem. Para as bactérias e BoAHV1, que possuem DNA como material genético, foi utilizado o kit TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fischer

Scientific). O equipamento usado foi o termociclador 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA), que possui cinco filtros de fluorescência e capacidade de leitura de quatro fluorescências, levando em consideração o uso do ROX como referência passiva, conforme Figura 2.



3.2.2 Curva de eficiência

As curvas padrões de eficiência foram estabelecidas para todos os diagnósticos usando diluições em série de 10 vezes de 1 a 10^{-7} em tampão TE (Tris-EDTA) com controles positivos previamente testados, conforme disposto na Tabela 2.

O controle positivo inicialmente usado para coronavírus bovino (BCoV) foi a amostra registrada GenBank MT346358.1, porém, posteriormente utilizou-se nova alíquota de cepa de campo fresca. O controle positivo usado para vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) e alfaherpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1) foi a extração por TRIzol (Invitrogen TM, Waltham, MA, USA) de vacina comercial (Inforce 3, Zoetis). O controle positivo para vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3) foi SF4/32 (Prototype Strain). Foi sintetizado controle positivo artificial para as bactérias *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni* e *Mannheimia haemolytica*, conforme sequência de nucleotídeos disponibilizada na Tabela 2. E para controle positivo de *Pasteurella multocida*, usou-se amostra confirmada por isolamento bacteriológico.

TABELA 2 - LISTA DE CONTROLES POSITIVOS USADOS NA PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DOS AGENTES INFECCIOSOS ENVOLVIDOS NO COMPLEXO RESPIRATÓRIO BOVINO (CRB)

Agente infeccioso	Controle positivo	Matriz
BCoV	GenBank MT346358.1 e Cepa de campo	Swab nasal
BRSV	Inforce 3 (Zoetis) - Cepa RLB 106	Vacina comercial
BPIV3	SF4/32	Prototype Strain
BoAHV1	Inforce 3 (Zoetis) - Cepa BRSV/375	Vacina comercial
<i>M. bovis</i>	TCAAGGAACCCACCAGATATGGCAAACCTTACCTATCGGTGACCCTTT TGCACCTAGAAATGACTTTGCCT	Controle artificial
<i>H. somni</i>	AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTTTCGGTGATGAGGAAGGCGATTAG TTTAAGAGATTAATTGATTGACGATAATCACAGAAGAAGCACCGG GCGTGATTTTCGGTTCAGTTGAAGCTTTCCAATCAGAATTTGAAAAAGC	Controle artificial
<i>M. haemolytica</i>	AGCGACTACTCGTGTGGTTCAGGCTGGGCGTGGTTAGTATTAGAAGA GGGTAAATTAGCCGTTGTTCAACCGCTAACCCAGGACAACCCACTAAT	Controle artificial
<i>P. multocida</i>	Cepa confirmada por isolamento bacteriano	Pulmão

FONTE: Os Autores (2024).

Os pontos considerados para otimização das reações foram: temperatura de anelamento, concentração de primers e de material genético. Para isso foi usado o método OFAT (um fator a cada vez), modificando um deles enquanto mantinha os demais fixos. As temperaturas de anelamento testadas foram de 55, 58 e 60°C. A quantidade de *primers* e sondas testadas foram 0,2 e 0,4 µL, com concentrações fixas de *primers* a 20 pmol/µL e de sondas a 10 pmol/µL. Por fim, foi testado 1,5, 3 e 3,7 µL de material genético.

A avaliação da eficiência foi realizada com a análise dos padrões disponibilizados pelo próprio *software* v2.3 do equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA), através dos valores de “slope”, “R²” (coeficiente de explicação) e “Eff%” (eficiência). O *software* realiza análise de regressão linear traçando os valores do ciclo de quantificação com o logaritmo do número de cópias dos genes alvos. Os valores ideais desejados são: slope de -3,32, coeficiente de explicação maior que 0,99 e eficiência entre 0,90 e 1,10 (Brasil, 2015).

Todos os agentes foram padronizados em singleplex com as concentrações e ciclos ideais para a PCR em tempo-real e, posteriormente, testados em multiplex com combinações de fluorescências detectáveis em canais diferentes.

3.2.3 Amostras clínicas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA-UFPR número 31/2023).

Foram realizadas visitas técnicas em 14 propriedades rurais localizadas nos municípios paranaenses pertencentes à Mesorregião do Centro Oriental Paranaense (Arapoti, Castro, Sengés e Tibagi) e em seis propriedades localizadas na Mesorregião Metropolitana de

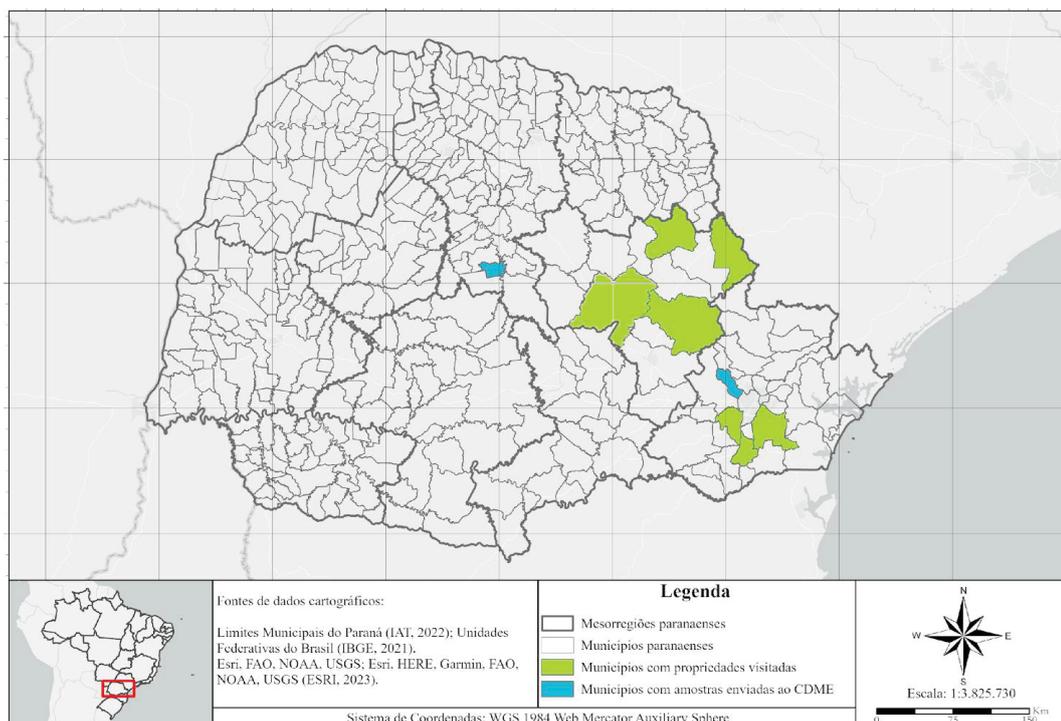
Curitiba (Araucária e São José dos Pinhais). Foram coletadas 196 amostras *ante mortem* (104 *swabs* nasais e 92 orais) de bovinos com sinais clínicos respiratórios. E de amostra *post mortem* (uma de pulmão, traqueia, coração, rim e fígado) de um animal que foi a óbito durante uma das visitas técnicas.

Após a coleta por esfregaço, *swabs* de nylon flocado, algodão e rayon foram acondicionados em microtubos contendo 500 µL de tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1X pH 7,2. Os órgãos foram armazenados em sacos plásticos estéreis. As amostras foram encaminhadas refrigeradas ao Laboratório de Virologia Animal do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” (CDME), onde foram armazenadas a -80°C até seu processamento.

Também ocorreu o encaminhamento por médicos veterinários de seis amostras de *swabs* nasais de bovinos com sintomatologia oriundos uma propriedade localizada na Mesorregião do Norte Central Paranaense (Ariranha do Ivaí) e de três amostras de animais de uma propriedade da Mesorregião Metropolitana de Curitiba (Campo Magro) ao Laboratório de Virologia Animal do CDME. Estes também foram incluídos no presente trabalho.

A geolocalização dos municípios com propriedades visitadas para coleta de amostras e de amostras encaminhadas ao CDME por médicos veterinários está ilustrada no mapa temático representado pela Figura 3.

FIGURA 3 - GEOLOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS PARANAENSES VISITADOS E DE AMOSTRAS ENVIADAS AO CENTRO DE DIAGNÓSTICO “MARCOS ENRIETTI” (CDME)



FONTE: Os Autores (2024).

3.2.4 Extração do ácido nucleico das amostras clínicas

A extração do ácido nucleico dos *swabs* foi realizada pela técnica *in house* de sílica/tiocianato de guanidina, adaptado de Boom et al. (1990). O material genético foi eluído em 90 µL de Tampão Tris-EDTA 1X e armazenado a -80°C. Foram utilizadas alíquotas de água ultrapura estéril como controle negativo durante a extração do ácido nucleico e nos procedimentos subsequentes.

3.2.5 Sensibilidade

As amostras clínicas coletadas nas visitas técnicas e as amostras encaminhadas ao Laboratório de Virologia Animal do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” (CDME) foram utilizadas para determinação da sensibilidade dos protocolos desenvolvidos fora do Brasil frente a amostras nacionais. Esses testes foram realizados a fim de detectar a presença dos agentes em multiplex para confirmar a alta sensibilidade dos ensaios padronizados.

3.2.6 Controle β-Actina

A β-Actina é um controle endógeno usado para garantir a presença de RNA na amostra extraída, já que possui como alvo o mRNA da β-Actina da espécie hospedeira, isto é, do próprio bovino. Quando não há a amplificação da β-Actina, há indícios de baixa qualidade da amostra, degradação do RNA, falha na extração do ácido nucleico ou inibição da própria PCR (Gigante et al., 2018).

Os oligonucleotídeos utilizados para o ensaio (*primer forward*, *primer reverse* e sonda) foram sintetizados conforme Gigante et al. (2018), representados na Tabela 3. Foram usados por reação: 1,8 µL de *Nuclease-free water*, 5 µL de 2X RT-PCR Buffer (kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR), 0,4 µL de *primer forward* e *reverse* (concentração 10 pmol/µL), 0,4 µL de sonda (concentração 5 pmol/µL), 0,4 µL de 25X RT-PCR Enzyme Link e 1,6 µL de RNA, totalizando 10 µL. A amplificação foi realizada no termociclador 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA), com 1 ciclo de 50°C por 30 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 56°C por 30 segundos, com fluorescência obtida na temperatura de 56°C.

TABELA 3 - LISTA DE *PRIMERS* E SONDA UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO β -ACTINA

Alvo	Oligonucleotídeos	Fluorescência usada	Referência
β -Actina	F: CGATGAAGATCAAGATCATTGC	VIC	Gigante et al. 2018
	R: AAGCATTTGCGGTGGAC		
	S: TCCACCTTCCAGCAGATG TGGATCA		

FONTE: Os Autores (2024). LEGENDA: F = *Primer Forward*; R = *Primer Reverse* e S = Sonda.

3.2.7 Custo de processamento dos ensaios

O cálculo do custo aproximado de processamento dos ensaios foi dividido em “custo de extração de ácido nucleico” e em “custo de ensaio molecular”. O custo de extração foi realizado através da cotação em dólares americanos dos reagentes utilizados por amostra na técnica *in house* de sílica/tiocianato de guanidina, adaptada de Boom et al. (1990), incluindo no valor final os plásticos, como ponteiras e microtubos.

O custo de ensaio molecular foi baseado na cotação em dólares americanos dos reagentes utilizados, sendo padronizado o valor para 90 ensaios, visto que a placa utilizada é de 96 poços, e seis poços são utilizados para controles positivos e negativos. O kit RNA cotado foi o AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fischer Scientific) e o kit DNA foi o TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fischer Scientific), de forma separada. Foram considerados valores do “ensaio”, composto pelos oligonucleotídeos (*primers* e sondas). E “plástico”, que é composto pela placa de 96 poços (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate) e o adesivo (MicroAmp™ Optical Adhesive Film).

Como forma de comparação, o kit comercial Pneumo4 (Pneumo 4B e Pneumo 4V) foi cotado em dólares americanos com uma empresa brasileira importadora e distribuidora do produto.

3.3 RESULTADOS

Para os agentes etiológicos com material genético de DNA, foi padronizado por reação: 0,8 μ L de *Nuclease-free water*, 5 μ L de TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, 0,4 μ L de *primer forward* e *reverse* (concentração 20 pmol/ μ L), 0,4 μ L de sonda (concentração 10 pmol/ μ L) e 3 μ L de DNA, totalizando 10 μ L. A amplificação foi padronizada com 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 3 segundos e 58°C por 30 segundos, com fluorescência obtida na temperatura de 58°C. A multiplexagem nas amostras clínicas foi realizada apenas para conjuntos de agentes de DNA.

Para a reação dos vírus de RNA foram utilizados na padronização: 0,6 µL de *Nuclease-free water*, 5 µL de 2X RT-PCR Buffer (kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR), 0,1 µL de *primer forward* e *reverse* (concentração 20 pmol/µL), 0,1 µL de sonda (concentração 10 pmol/µL), 0,4 µL de 25X RT-PCR Enzyme Link e 3,7 µL de RNA, totalizando 10 µL. A amplificação foi realizada com 1 ciclo de 50°C por 20 minutos, 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto, com fluorescência obtida na temperatura de 58°C. A multiplexagem nas amostras clínicas foi realizada levando em conta a fluorescência de marcação da sonda independentemente do tipo de ácido nucléico do agente, este podendo ser tanto de DNA quanto de RNA.

3.3.1 Curvas de eficiência

As curvas de eficiência apresentaram valores desejados de slope (próximo de -3,32), coeficiente de explicação (maior que 0,99) e eficiência (entre 0,90 e 1,10), conforme demonstrado na Tabela 4. Os valores médios dos *C_q* (ciclos de quantificação) de cada patógeno testado e suas respectivas diluições estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 4 - RESULTADOS DE SLOPE, R² (COEFICIENTE DE EXPLICAÇÃO) E EFF% (EFICIÊNCIA) DOS AGENTES ETIOLÓGICOS PADRONIZADOS NAS CURVAS DE EFICIÊNCIA REALIZADAS

Agentes padronizados	Slope	R ²	Eff%
Coronavírus Bovino (BCoV)	-3,226	0,992	104,161
Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV)	-3,176	0,999	106,482
Parainfluenza bovina tipo 3 (BPIV3)	-3,553	0,991	91,191
Herpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1)	-3,294	0,996	101,196
<i>Mycoplasma bovis</i>	-3,486	0,997	93,57
<i>Histophilus somni</i>	-3,202	0,997	105,246
<i>Mannheimia haemolytica</i>	-3,29	0,999	101,354
<i>Pasteurella multocida</i>	-3,354	0,991	98,695

FONTE: Os Autores (2024).

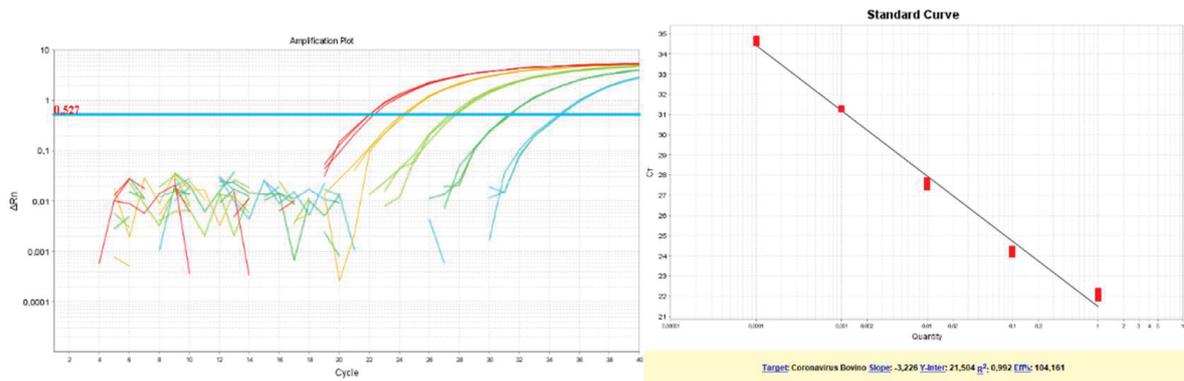
TABELA 5 - RESULTADOS DOS *C_q* OBTIDOS NAS CURVAS DE EFICIÊNCIA REALIZADAS PARA PADRONIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS CONSIDERANDO AS DILUIÇÕES

Diluições	Média dos <i>C_q</i> (ciclos de quantificação)							
	BCoV	BRSV	BPIV3	BoAHV1	<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>
Puro	22,04	18,03	16,65	NC	15,2	15,85	15,44	22,99
01:10	24,23	21,43	18,94	24,38	18,69	18,63	18,53	26,75
1:100	27,58	24,76	22,33	27,92	21,78	21,85	21,94	29,86
1:1.000	31,28	26,57	26,48	31,31	25,58	25,08	25,1	33,25
1:10.000	34,65	30,84	30,16	34,67	29,64	28,23	28,62	36,93
1:100.000	Ind.	Ind.	33,96	37,48	32,27	31,86	31,78	Ind.

FONTE: Os Autores (2024). LEGENDA: Ind. = Indeterminado; NC = Não Considerado.

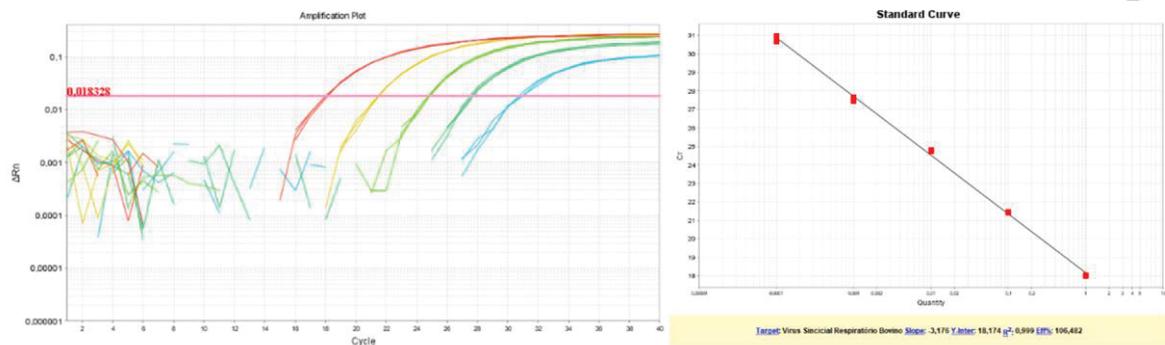
As Figuras de 4 a 11 ilustram os gráficos de amplificação e as curvas padrão das curvas de eficiência realizadas, obtidas pelo *software* v2.3 do termociclador 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA).

FIGURA 4 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV)



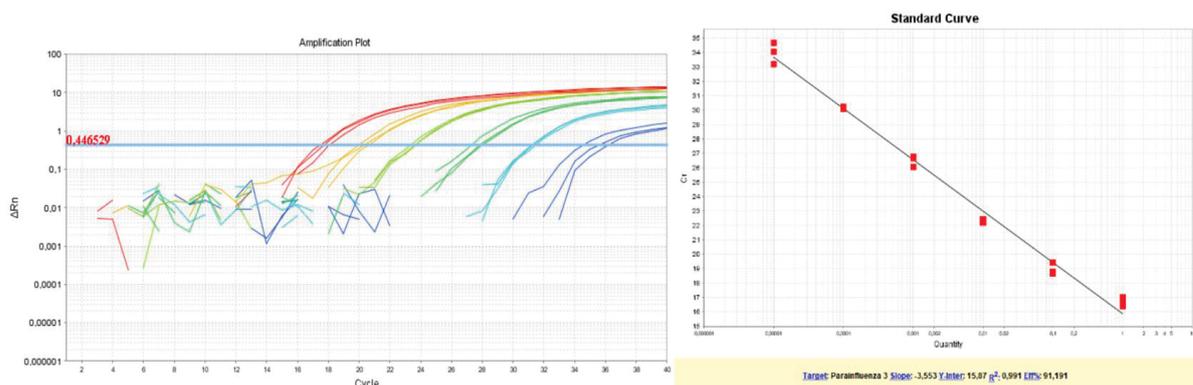
FONTE: Os Autores (2024).

FIGURA 5 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV)



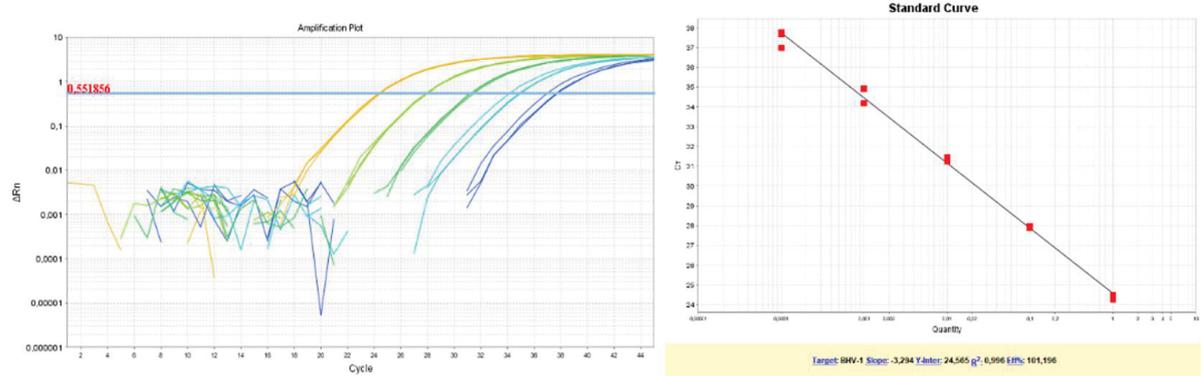
FONTE: Os Autores (2024).

FIGURA 6 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3 (BPIV3)



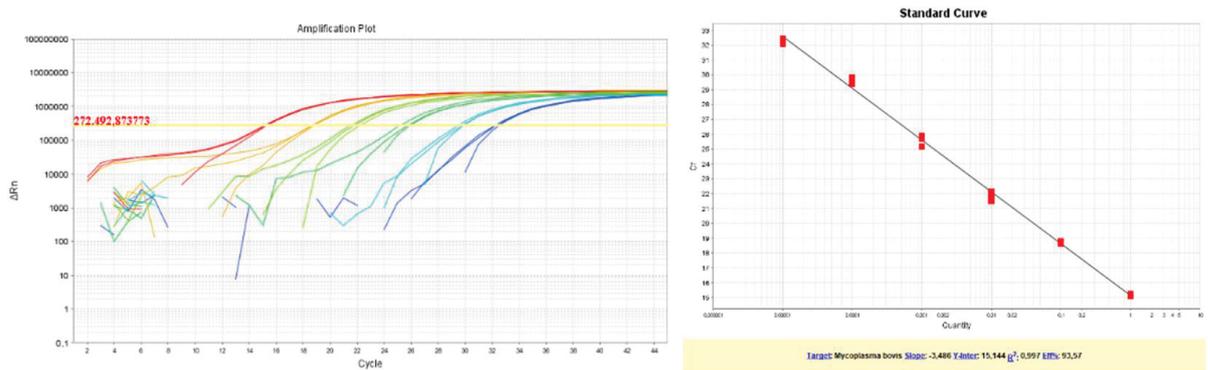
FONTE: Os Autores (2024).

FIGURA 7 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoAHV1)



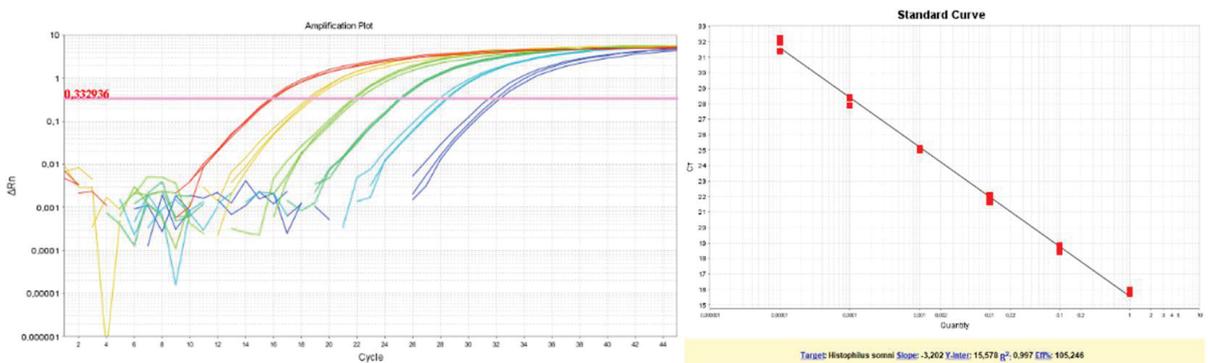
FONTE: Os Autores (2024).

FIGURA 8 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Mycoplasma bovis*



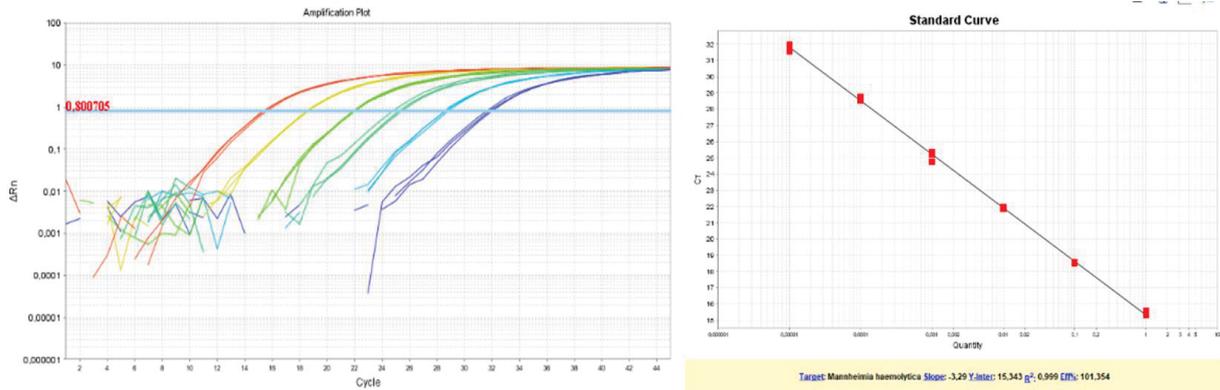
FONTE: Os Autores (2024).

FIGURA 9 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Histophilus somni*



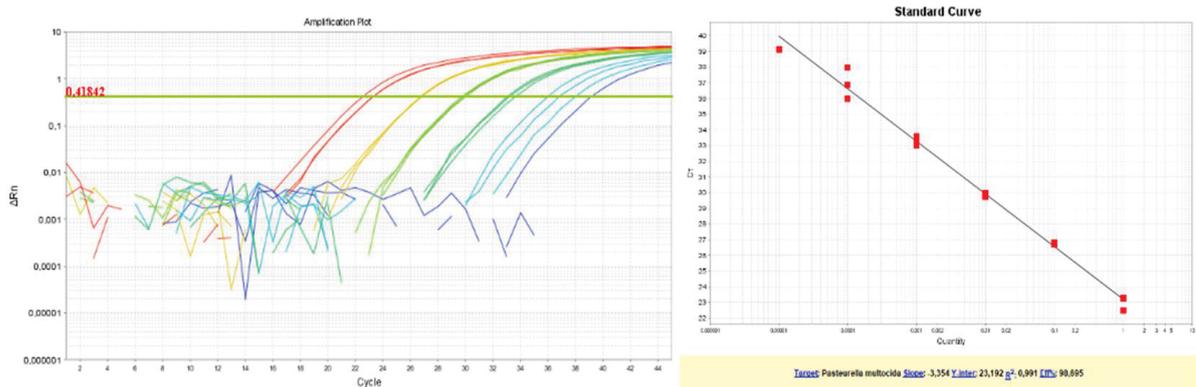
FONTE: Os Autores (2024).

FIGURA 10 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Mannheimia haemolytica*



FONTE: Os Autores (2024).

FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO E CURVA PADRÃO DA CURVA DE EFICIÊNCIA PARA A PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Pasteurella multocida*



FONTE: Os Autores (2024).

3.3.2 Custos de processamento dos ensaios

O custo aproximado cotado em dólares para o processamento de 90 ensaios em singleplex, em multiplex e em comparação com o kit comercial para agentes de DNA encontra-se na Tabela 6. A Tabela 7 dispõe os custos para diagnóstico de agentes de RNA.

TABELA 6 - ESTIMATIVA DO CUSTO EM DÓLARES AMERICANOS PARA 90 ENSAIOS POR DIAGNÓSTICO DE AGENTES DE DNA

Itens utilizados	CUSTO EM DÓLARES A CADA 90 ENSAIOS POR DIAGNÓSTICO DE AGENTES COM DNA			
	Singleplex (1 agente)	Singleplex (4 agentes)	Multiplex (4 agentes)	Kit Comercial (4 agentes)
Extração ácido nucleico	US\$ 90	US\$ 90	US\$ 90	Incluso no kit
Kit Agentes DNA	US\$ 110	US\$ 410	US\$ 110	US\$ 1280
Ensaio	US\$ 12	US\$ 48	US\$ 48	Incluso no kit
Plástico	US\$ 9	US\$ 36	US\$ 9	US\$ 9
TOTAL	US\$ 221	US\$ 584	US\$ 257	US\$ 1289

FONTE: Os Autores (2024).

TABELA 7 - ESTIMATIVA DO CUSTO EM DÓLARES AMERICANOS PARA 90 ENSAIOS POR DIAGNÓSTICO DE AGENTES DE RNA

Itens utilizados	CUSTO EM DÓLARES A CADA 90 ENSAIOS POR DIAGNÓSTICO DE AGENTES COM RNA			
	Singleplex (1 agente)	Singleplex (4 agentes)	Multiplex (4 agentes)	Kit Comercial (4 agentes)
Extração ácido nucleico	US\$ 90	US\$ 90	US\$ 90	Incluso no kit
Kit Agentes RNA	US\$ 215	US\$ 860	US\$ 215	US\$ 1890
Ensaio	US\$ 12	US\$ 48	US\$ 48	Incluso no kit
Plástico	US\$ 9	US\$ 36	US\$ 9	US\$ 9
TOTAL	US\$ 326	US\$ 1034	US\$ 362	US\$ 1900

FONTE: Os Autores (2024).

3.3.3 Teste em amostras clínicas coletadas a campo

Foram testadas 113 amostras de *swab* nasal, 92 de *swab* oral, uma de pulmão, uma de traqueia, uma de coração, uma de rim e uma de fígado, totalizando 210 amostras clínicas em 22 propriedades rurais situadas nos municípios de Arapoti, Araucária, Ariranha do Ivaí, Campo Magro, Castro, São José dos Pinhais, Sengés e Tibagi. Todos os agentes foram detectados, conforme disposto na Tabela 8.

TABELA 8 - TESTE DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO-REAL EM MULTIPLEX PARA AGENTES ETIOLÓGICOS DO CRB EM AMOSTRAS CLÍNICAS COLETADAS A CAMPO

Propriedade	Município	BCoV	BRSV	BPI	BoAHV	MB	HS	MH	PM	Número de amostras coletadas	Matriz Positiva
Fazenda 1	Castro	0	0	0	0	0	3	0	1	8	Swab nasal e oral
Fazenda 2	Campo Magro	3	0	0	2	0	0	0	3	3	Swab nasal
Fazenda 3	Ariranha do Ivaí	0	0	0	0	0	0	0	1	6	Swab nasal
Fazenda 4	Arapoti	0	0	0	0	0	0	0	3	3	Swab nasal
Fazenda 5	Arapoti	2	0	0	0	0	0	0	2	5	Swab nasal
Fazenda 6	Arapoti	1	0	0	0	0	0	0	1	4	Swab nasal
Fazenda 7	São José dos Pinhais	0	0	1	0	0	2	0	4	10	Swab nasal e oral
Fazenda 8	São José dos Pinhais	0	0	0	0	0	0	0	0	4	Não houve
Fazenda 9	São José dos Pinhais	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Não houve
Fazenda 10	São José dos Pinhais	0	0	0	0	0	0	0	1	6	Swab oral
Fazenda 11	São José dos Pinhais	0	0	0	0	0	1	0	0	8	Swab oral
Fazenda 12	Sengés	0	19	0	0	0	15	0	9	25	Swab nasal e oral, pulmão e traqueia
Fazenda 13	Araucária	0	0	0	0	0	0	1	7	8	Swab nasal e oral
Fazenda 14	Arapoti	0	0	0	0	2	4	0	4	8	Swab nasal e oral
Fazenda 15	Arapoti	8	0	0	0	0	4	0	8	40	Swab nasal e oral
Fazenda 16	Arapoti	0	0	0	0	0	10	3	0	14	Swab nasal e oral
Fazenda 17	Arapoti	0	0	0	0	0	2	0	1	4	Swab nasal e oral
Fazenda 18	Arapoti	0	0	0	0	0	2	0	0	8	Swab oral
Fazenda 19	Arapoti	0	0	0	0	0	1	0	0	8	Swab oral
Fazenda 20	Tibagi	3	0	0	0	0	12	1	0	16	Swab nasal e oral
Fazenda 21	Arapoti	0	0	0	0	0	1	0	5	8	Swab nasal e oral
Fazenda 22	Arapoti	0	2	0	0	3	4	4	6	12	Swab nasal e oral
TOTAL		17	21	1	2	5	61	9	56	210	

FONTE: Os Autores (2024). LEGENDA: MB = *Mycoplasma bovis*; HS = *Histophilus somni*; MH = *Mannheimia haemolytica* e PM = *Pasteurella multocida*.

Em relação à frequência de detecção e existência de coinfeções, em 121 das amostras foi possível detectar pelo menos um agente etiológico (57,62%). Das 121 amostras positivas, 87 apresentaram apenas um agente (71,9%), 21 apresentaram a associação de dois agentes etiológicos (17,35%), em quatro foram detectados três agentes (3,3%), em duas foram detectados quatro agentes (1,65%) e em uma houve a detecção simultânea de cinco agentes (0,83%), conforme Tabela 9.

TABELA 9 - FREQUÊNCIA DE AGENTES ETIOLÓGICOS DO CRB DETECTADOS EM AMOSTRAS CLÍNICAS COLETADAS A CAMPO

Agentes etiológicos	Número de detecções
HS	46
PM	25
BCoV	10
BRSV	5
BPIV3	1
BRSV + HS	6
MH + HS	5
BCoV + PM	3
BRSV + PM	2
PM + HS	2
BCoV + HS	1
PM + MB	1
MB + HS	1
BRSV + PM + HS	6
BCoV + BoAHV1 + PM	2
BCoV + MH + HS	1
PM + MB + HS	1
PM + MB + MH + HS	1
BRSV + PM + MH + HS	1
BRSV + PM + MB + MH + HS	1
TOTAL	121

FONTE: Os Autores (2024). LEGENDA: MB = *Mycoplasma bovis*; HS = *Histophilus somni*; MH = *Mannheimia haemolytica* e PM = *Pasteurella multocida*.

3.4 DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce dos agentes etiológicos envolvidos nos surtos de Complexo Respiratório Bovino é de grande importância econômica e clínica (Zhang et al., 2022). No entanto, a identificação desses patógenos no Brasil está em fase inicial (Baptista et al., 2017). Para isso, a técnica de PCR convencional pode não ser o método mais adequado, visto que o CRB é uma afecção multietiológica (Pansri et al., 2020) e a PCR convencional é mais indicada para infecções causadas por um único patógeno, além de ser mais demorada, menos sensível e com maior risco de contaminação cruzada no caso da PCR *nested* (Mackay, 2004).

Portanto, o desenvolvimento de uma solução rápida, específica e com alta sensibilidade para a detecção simultânea de patógenos causadores de DRB é considerado uma pauta necessária (Zhang et al., 2022).

Atualmente, observa-se uma tendência no desenvolvimento de painéis de diagnóstico de agentes etiológicos envolvidos no Complexo Respiratório Bovino utilizando a técnica de PCR em tempo-real, sendo estes single ou multiplex. Um estudo de 2012 descreveu o desenvolvimento de um protocolo de multiplex qPCR para a detecção simultânea do vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), alfa herpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1) e vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3). A padronização em multiplex foi comparada com os testes de imunofluorescência indireta e isolamento viral, sendo que a multiplex qPCR foi considerada mais sensível para a detecção desses vírus (Thonur et al., 2012).

Zhang et al. (2022) padronizaram protocolos de multiplex qPCR para diagnóstico alfa herpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV1), vírus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV3), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e vírus da influenza D, sendo que este último vírus teve sua primeira detecção molecular no Brasil em 2022 (Silva et al., 2022).

Em relação às bactérias causadoras do CRB, houve desenvolvimento de protocolo multiplex para a detecção das mesmas quatro bactérias investigadas neste trabalho (Loy et al., 2018). A padronização foi realizada utilizando ácido nucleico de tecido pulmonar e *swabs* nasais e nasofaríngeos. Os resultados obtidos com a qPCR foram comparados com cultivo bacteriano. No trabalho supracitado houve redução no tempo do ensaio e dos resultados, quando comparado com o isolamento, sendo também um método muito útil em coinfeções com vários agentes bacterianos.

Por tratar-se de uma metodologia que dispõe de facilidade e eficiência, há *kits* comerciais idealizados exclusivamente para detecção multiplex de patógenos causadores do Complexo Respiratório Bovino. No entanto, por tratar-se de *kit* comercial, não há a divulgação das sequências de *primers* e sondas por parte da empresa produtora (Pansri et al., 2020). Além disso, *kits* como o mencionado não são comercializados no mercado nacional, demandando importação, o que acarretam custos mais elevados quando comparados com diagnósticos *in house*. Outro problema é que os reagentes desses *kits* comerciais costumam possuir a validade de um ano, porém o tempo para importação leva em torno de três meses. Dessa forma, há considerável redução no tempo de uso, que pode acarretar desperdícios.

Em relação aos protocolos singleplex, em 2016 houve a descrição de protocolo Dembo-PCR, relacionado a detecção de microrganismos responsáveis por doenças em bovinos (*Detection of microbes from bovine diseases*), sendo caracterizado por ser um ensaio

singleplex e com a possibilidade de testar uma vasta quantidade de patógenos na mesma corrida de qPCR (Tsuchiaka et al., 2016). Para tal, são utilizadas as mesmas concentrações de *primers* e sondas, número de ciclos e temperaturas de ciclagem. Neste estudo foi desenvolvido um protocolo para detecção em menos de três horas de 19 patógenos causadores de sintomatologia entérica em bovinos, sendo 11 vírus, seis bactérias e dois protozoários.

Da mesma forma, também foi desenvolvido protocolo Dembo-PCR para sintomatologia respiratória com o diagnóstico singleplex de 16 patógenos respiratórios, sendo abrangido 10 vírus e seis bactérias (Kishimoto et al., 2017). Este grupo de pesquisadores também desenvolveu protocolo Dempo-PCR, para a detecção de microrganismos responsáveis por doenças em suínos (*Detection of microbes from porcine diseases*), visto que os suínos também possuem afecções multietiológicas. A pesquisa em questão abordou a padronização de diagnóstico para doenças respiratórias, sendo nove bactérias e oito vírus (Sunaga et al., 2019). Há também um estudo com a padronização de ensaios para a detecção molecular singleplex de nove vírus e três bactérias causadores de doenças respiratórias em aves (Shibanuma et al., 2023).

Em relação ao presente trabalho, as curvas de eficiência foram realizadas para todos os agentes etiológicos em singleplex. No entanto, ensaios de PCR com um único alvo proporcionam alto custo para seu processamento, pois requerem que a reação ocorra de forma separada para cada alvo (Thonur et al., 2012). Equipamentos como o termociclador 7500 Fast Real-time PCR System possuem cinco filtros de fluorescência e são capazes de leitura de quatro fluorescências levando em consideração o uso do ROX. Desta forma, é possível testar até quatro agentes por reação e reduzir custos, uma vez que utiliza os mesmos reagentes necessários para uma reação.

Para as estimativas de custos de processamento de ensaios, dividiu-se em custos por ensaios de agentes etiológicos que possuem DNA e agentes com RNA. Ao comparar o custo de realizar quatro singleplex para quatro agentes DNA com uma multiplex de quatro agentes DNA, estima-se que utilizar multiplex traga 56% de economia, ou seja, utilizar singleplex custa mais do que o dobro do que custaria uma multiplex. Fato que também se confirma quando se comparam os valores para RNA, onde estima-se 65% de economia.

Ao comparar os valores de uma singleplex para um agente DNA ou RNA com uma multiplex para quatro agentes DNA ou RNA, é ponderado que com aproximadamente 36 dólares a mais é possível realizar o ensaio de testagem de quatro ao invés de apenas um agente. Estima-se economia de aproximadamente 70% com os custos de insumos laboratoriais. Ou seja, é quase 2,5 vezes mais caro fazer os ensaios sem otimizar os reagentes.

Por fim, ao comparar os custos da multiplexagem *in house* com kit comercial disponível no mercado para importação, a diferença foi ainda mais marcante. É aproximadamente 80% mais caro utilizar kits comerciais do que o método multiplex *in house* proposto, ou seja, custa quatro vezes mais.

Existe a possibilidade de combinar os fluoróforos conforme a demanda necessária na rotina laboratorial, dado que muitas vezes não é solicitada a realização de todos os agentes etiológicos por conta do alto custo no processamento das amostras. No presente trabalho, sugerimos duas PCR tempo-real em multiplex para testagem dos oito agentes envolvidos no Complexo Respiratório Bovino, porém é possível recorrer apenas a uma delas. Com o painel de diagnóstico proposto é possível realizar as corridas em multiplex para triagem, e repetir em singleplex caso seja necessário algum tipo de confirmação. Essa estratégia visa diminuir o tempo para o processamento das análises, reduzir os custos do diagnóstico com insumos materiais, promover menor uso de plásticos não reutilizáveis, contribuir com a sustentabilidade e aumentar a identificação dos agentes etiológicos que circulam no Brasil. Muitos testes diagnósticos deixam de ser requisitados por médicos veterinários pelo alto custo que a testagem por agente implica.

Em relação à frequência de detecção molecular dos agentes etiológicos nas amostras clínicas, observou-se taxa de positividade de 57,62% (121/210). Destas, 71,9% apresentaram apenas um agente etiológico (87/121), sendo que em 28,1% (34/121) houve a detecção simultânea de dois, três, quatro ou cinco agentes em uma mesma amostra, sendo uma taxa de coinfeção menor que outro estudo realizado no Paraná, apesar deste de utilizar a técnica PCR convencional (Oliveira, V. H. S. et al., 2020).

Dentre as 121 amostras positivas, foi possível detectar *Histophilus somni* de forma isolada em 46 delas (38,02%), sendo que em 26 (21,49%) foi detectado *H. somni* em coinfeções, totalizando 72 amostras positivas para *H. somni* (59,5%). Headley et al. (2014) citaram a possibilidade de subdiagnóstico de histofilose nos rebanhos brasileiros por não ser um patógeno rotineiramente testado como um dos diferenciais para o CRB.

Em relação a detecção de *Pasteurella multocida*, 25 amostras (20,66%) foram positivas apenas para *P. multocida*, totalizando 45 amostras (33,88%), ao se considerar também as coinfeções. De acordo com Dabo, Taylor e Confer (2008), apenas encontrar a bactéria no trato respiratório superior do animal não é considerado um diagnóstico definitivo. Para elucidar a responsabilidade de *P. multocida* no desenvolvimento de sinais clínicos, e consequente pneumonia mais grave, para os pesquisadores, é necessária a realização de

cultura e isolamento bacteriano de amostras *post mortem* ou lavado broncoalveolar e transtraqueal, o que acaba se tornando inviável em rebanhos numerosos.

Em relação ao Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), identificado isoladamente em cinco amostras (4,13%) e em 16 (13,22%) com outros agentes, totalizando 21 amostras (17,35%). Spilki e Arns (2008) afirmam que há poucos relatos de BRSV no Brasil, provavelmente devido a ocorrência esporádica da doença por conta do clima da maior parte do território brasileiro; pouco conhecimento de produtores rurais e médicos veterinários sobre achados relevantes da doença viral; dificuldade e envio inadequado das amostras ao laboratório, já que se trata de um vírus lábil, e a reduzida quantidade de laboratórios capazes de realizar o diagnóstico de BRSV. O último fator apresentado por Spilki e Arns (2008) provavelmente continua válido, ao levar em consideração a escassez de trabalhos (Domingues et al., 2011; Brasil et al., 2013; Affonso et al., 2014; Headley et al., 2017; Oliveira, T. E. S. et al., 2020; Oliveira, V. H. S. et al., 2020). Bem como o primeiro fator, já que os trabalhos abordam apenas as regiões sudeste e sul brasileiras.

Os estudos de Domingues et al. (2011), Brasil et al. (2013) e Affonso et al. (2014) relataram infecções por BRSV nas regiões sul e sudeste, diagnosticados por PCR convencional. Headley et al. (2017) abordam um relato de coinfeção por BRSV e *Histophilus somni* no sudeste do Brasil, confirmados por PCR convencional. Há um relato de infecção por BVDV, BoAHV1, BPIV3, BRSV e *Mycoplasma bovis* em uma propriedade paranaense com grande produção leiteira diária, porém a metodologia usada foi imunohistoquímica, e não técnicas moleculares (Oliveira, T. E. S. et al., 2020). Já no estudo de Oliveira, V. H. S. et al. (2020) houve a detecção de BVDV, BRSV, BCoV, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* e *Histophilus somni* em 18 bezerras, sendo que 55,5% delas apresentaram coinfeção.

Em relação ao Coronavírus Bovino, Ellis (2019) sugeriu que o aumento da sensibilidade de técnicas moleculares mais modernas, como a PCR em tempo-real pode levar a resultados positivos de BCoV sem significado clínico, já que a presença do agente etiológico em um animal doente não significa obrigatoriamente que se trata do patógeno causador dos sinais clínicos. O autor sugere maior ênfase no estudo de BCoV com infecções mistas, como observado no presente estudo, visto que sete amostras testadas demonstraram infecções mistas com outros agentes etiológicos.

No presente trabalho foram utilizados 205 *swabs*, sendo que em 184 destes (89,76%) foram coletados *swab* nasal e oral do mesmo animal a fim de comparação. Em todas as amostras, o *swab* nasal obteve maior amplificação da β -Actina, o que pode ser explicado pelas

limitações da saliva, decorrentes de sua consistência e viscosidade, além da presença de inibidores de PCR (Ursic et al., 2022).

Em relação à natureza do material componente do *swab*, é conhecido que as composições mais adequadas para ensaios moleculares são nylon flocado, espuma de poliuretano, poliéster não flocado e rayon (Brasil, 2016). Das 113 amostras de *swab* nasal utilizadas no presente trabalho, 59 foram de rayon (52,21%), 42 de nylon flocado (37,17%) e 12 de algodão (10,62%). Ao testar a amplificação da β -Actina, todos os *swabs* de nylon flocado tiveram amplificação, porém 13 *swabs* de rayon e oito de algodão não apresentaram amplificação, o que indicaria falha na extração do ácido nucleico, degradação do RNA ou inibição da PCR (Gigante et al., 2018). Isso poderia ser explicado pela natureza do material dos *swabs* utilizados, já que Brownlow, Dagnall e Ames (2011) afirmaram em seu trabalho que o *swab* de nylon flocado rende mais DNA do que os outros tipos de *swabs*. Porém, ao testar para os agentes etiológicos causadores do CRB, dos 21 *swabs* que não tiveram amplificação para β -Actina, nove destes tiveram amplificação, sendo cinco amostras com material genético detectável para *Pasteurella multocida* e quatro para Coronavírus Bovino.

Como comentado anteriormente, os dados sobre prevalência e perdas causadas pela Complexo Respiratório Bovino ainda são escassos no Brasil (Oliveira, V. H. S. et al., 2020), sendo a maioria realizados nas regiões sul e sudeste do país apesar da distribuição dos animais ocorrer em todas as regiões geográficas brasileiras (Castro et al., 2021). Desse modo, a utilização de painéis de diagnóstico como este poderiam servir de suporte técnico para promover maior mapeamento do CRB, esperando-se atenuar o impacto econômico causado na pecuária, visto que um diagnóstico rápido e preciso é importante para decidir e adotar medidas apropriadas de tratamento, prevenção (Loy et al., 2018), manejo sanitário e vacinação (Kishimoto, et al., 2017).

Avaliar adequadamente a interação entre os agentes etiológicos, incluindo a determinação se são provenientes ou não da flora normal do animal, é de significativa importância para compreender as particularidades do Complexo Respiratório Bovino. Faz-se necessário uma análise mais profunda que permita identificar quais agentes estão atuando em conjunto e como suas interações podem afetar a gravidade e a progressão da doença.

3.5 CONCLUSÃO

Os protocolos padronizados, otimizados e multiplexados neste estudo apresentaram sensibilidade para detecção dos agentes do Complexo Respiratório Bovino circulantes no

Paraná, o que viabiliza um diagnóstico mais rápido, específico e econômico, com a possibilidade de ampliar a investigação epidemiológica. Os protocolos podem ser uma ferramenta valiosa para a detecção precisa dos vírus e bactérias envolvidos na sintomatologia da doença, que é importante para diagnóstico precoce, manejo adequado e estratégia eficaz de prevenção do CRB.

O monitoramento contínuo dos agentes etiológicos associados ao Complexo Respiratório Bovino, assim como realizado no presente estudo, é fundamental para reduzir as perdas econômicas associadas ao CRB, elucidar quais cepas estão em circulação no território brasileiro e promover a saúde e a produtividade dos rebanhos. Considerar a utilização de métodos multiplex *in house*, assim como o proposto no presente trabalho, pode ser uma estratégia para viabilizar maior monitoramento das cepas circulantes no Brasil, dada a economia com insumos laboratoriais.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, I. B.; SOUZA, A.; MARTINI, M. C.; SANTOS, M. M. A. B.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W.; SAMARA, S. I. Detection of an untyped strain of bovine respiratory syncycial virus in a dairy herd. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2539-2550, 2014.
- BAPTISTA, A. L.; REZENDE, A. L.; FONSECA, P. A.; MASSI, R. P.; NOGUEIRA, G. M.; MAGALHÃES, L. Q.; HEADLEY, S. A.; MENEZES, G. L.; ALFIERI, A. A.; SAUT, J. P. E. Bovine respiratory disease complex associated mortality and morbidity rates in feedlot cattle from southeastern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 10, p. 791-799, out. 2017.
- BIOSEARCH TECHNOLOGIES. **Spectral Overlay Tool for Multiplexed qPCR**. Disponível em: <https://www.biosearchtech.com/qpcr-multiplex-spectral-overlay-tool>. Acesso em: 10 fev. 2014.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, mar. 1990.
- BRASIL, N. D. A.; HINNAH, F. L.; FISS, L.; SALLIS, E. S. V.; GRECCO, F. B.; LADEIRA, S. R. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SCHILD, A. L. Doenças respiratórias em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 33 surtos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 745-751, jun. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Memorando nº 258/2016/DSA-SDA/SDA/MAPA**. Brasília, DF, 14 nov. 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários**. 1. ed. Brasília, DF: Mapa, 2015.
- BROWNLOW, R. J.; DAGNALL, K. E.; AMES, C. E. A Comparison of DNA Collection and Retrieval from Two Swab Types (Cotton and Nylon Flocked Swab) when Processed Using Three QIAGEN Extraction Methods. **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 3, 713-717, dez. 2011.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGET, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PLAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, abr. 2009.
- CASTRO, M. M.; OLIVEIRA, T. E. S.; HEADLEY, S. A. Bovine respiratory disease in Brazil: a short review. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 2081-2110, 2021.
- DABO, S. M.; TAYLOR, J. D.; CONFER, A. W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, n. 2, p. 129-150, dez. 2007.

DECARO, N.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; MARI, V.; RADOGNA, A.; COLAIANNI, M. L.; CIRONE, F.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 2, p. 167-171, jun. 2008.

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

ELLIS, J. What is the evidence that bovine coronavirus is a biologically significant respiratory pathogen in cattle? **Canadian Veterinary Journal**, v. 60, n. 2, p. 147-152, fev. 2019.

GIGANTE, C.M.; DETTINGER, L.; POWELL, J. W.; SEIDERS, M.; CONDORI, R. E. C.; GRIESSER, R.; OKOGI, K.; CARLOS, M.; PESKO, K.; BRECKENRIDGE, M.; SIMON, E. M. M.; CHU, M. Y.J .V.; DAVIS, A. D.; BRUNT, S. J.; ORCIARI, L.; YAGER, P.; CARSON, W. C.; HARTLOGE, C.; SALIKI, J. T.; SANCHEZ, S.; DELDARI, M.; HSIEH, K.; WADHWA, A.; WILKINS, K.; PEREDO, V. Y.; RABIDEAU, P.; GRUHN, N.; CADET, R.; ISLOOR, S.; NATH, S. S.; JOSEPH, T.; GAO, J.; WALLACE, R.; REYNOLDS, M.; OLSON, V. A.; LI, Y. Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. 1-25, maio 2018.

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

HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. F.; OLIVEIRA, V. H. S; BEUTTEMMÜLER, E. A.; ALFIERI, A. A. *Histophilus somni* is a potential threat to beef cattle feedlots in Brazil. **Veterinary Record**, v. 175, n. 10, p. 249, jul. 2014.

HEADLEY, S. A.; BALBO, L. C.; ALFIERI, A. F.; SAUT, J. P. E.; BAPTISTA, A. L.; ALFIERI, A. A. Bovine respiratory disease associated with *Histophilus somni* and bovine respiratory syncytial virus in a beef cattle feedlot from Southeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 283-294, 2017.

KISHIMOTO, M.; TSUCHIAKA, S.; RAHPAYA, S. S.; HASEBE, A.; OTSU, K.; SUGIMURA, S.; KOBAYASHI, S.; KOMATSU, N.; NAGAI, M.; OMATSU, T.; NAOI, Y.; SANO, K.; OKAZAKI-TERASHIMA, S.; OBA, M.; KATAYAMA, Y.; SATO, R.; ASAI, T.; MIZUTANI, T. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 3, p. 517-523, jan. 2017.

LOY, J. D.; LEGER, L.; WORKMAN, A. M.; CLAWSON, M. L.; BULUT, E.; WANG, B. Development of a multiplex real-time PCR assay using two thermocycling platforms for detection of major bacterial pathogens associated with bovine respiratory disease complex from clinical samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 6, p. 837-847, nov. 2018.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190-212, mar. 2004.

OLIVEIRA, T. E. S.; PELAQUIM, I. F.; FLORES, E. F.; MASSI, R. P.; VALDIVIEZO, M. J. V.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; ALFIERI, A. A.; SAUT, J. P. E.; HEADLEY, S. A. *Mycoplasma bovis* and viral agentes associated with the development of bovine respiratory disease in adult dairy cows. **Transboundary and Emerging Disease**, v. 67, p. 82-93, maio 2020.

OLIVEIRA, V. H. S.; DALL AGNOL, A. M.; FRITZEN, J. T. T.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Microbial diversity involved in the etiology of a bovine respiratory disease outbreak in dairy calf rearing unid. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 71, 101494, ago. 2020.

PANSRI, P.; KATHOLM, J.; KROGH, K. M.; AAGAARD, A. K.; SCHMIDT, L. M. B.; KUDIRKIENE, E.; LARSEN, L. E.; OLSEN, J. E. Evaluation of novel multiplex qPCR assays for diagnosis of pathogens associated with the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Journal**, v. 256, n. 105425, fev. 2020.

SACHSE, K.; SALAM, H. S. H.; DILLER, R.; SCHUBERT, E.; HOFFMANN, B.; HOTZEL, H. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. **The Veterinary Journal**, v. 186, n.3, p. 299-303, dez. 2010.

SHIBANUMA, T.; NUNOMURA, Y.; OBA, M.; KAWAHARA, F.; MIZUTANI, T.; TAKEMAE, H. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with poultry infectious diseases. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 85, n. 4, p. 407-411, fev. 2023.

SILVA, M. S.; MOSENA, A. C. S.; BAUMBACH, L.; DEMOLINER, M.; GULARTE, J. S.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D.; WEBER, M. N.; SPILKI, F. R.; CANAL, C. W. Cattle influenza D virus in Brazil is divergent from established lineages. **Archives of Virology**, v. 167, n. 4, p. 1181-1184, abril 2022.

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

STOKSTAD, M.; KLEM, T. B.; MYRMEL, M.; OMA, V. S.; TOFTAKER, I.; OSTERAS, O.; NODTVEDT, A. Using Biosecurity Measures to Combat Respiratory Disease in Cattle: The Norwegian Control Program for Bovine Respiratory Syncytial Virus and Bovine Coronavirus. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. 167, abril 2020.

SUNAGA, F.; TSUCHIAKA, S.; KISHIMOTO, M.; AOKI, H.; KAKINOKI, M.; KURE, K.; OKUMURA, H.; OKUMURA, M.; OKUMURA, A.; NAGAI, M.; OMATSU, T.; MIZUTANI, T. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 82, n. 2, p. 217-223, fev. 2020.

THONUR, L.; MALEY, M.; GILRAY, J.; CROOK, T.; LAMING, E.; TURNBULL, D.; NATH, M.; WILLOUGHBY, K. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 37, p. 1-9, mar. 2012.

TSUCHIAKA, S.; MASUDA, T.; SUGIMURA, S.; KOBAYASHI, S.; KOMATSU, N.; NAGAI, M.; OMATSU, T.; FURUYA, T.; OBA, M.; KATAYAMA, Y.; KANDA, S.; YOKOYAMA, T.; MIZUTANI, T. Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 3, p. 383-389, mar. 2016.

URSIC, T.; KOGOJ, R.; SIKONJA, J.; ROSKARIC, D.; JEVSNIK VIRANT, M.; BOGOVIC, P.; PETROVEC, M. Performance of nasopharyngeal swab and saliva in detecting Delta and Omicron SARS-CoV-2 variants. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 10, p. 4704-4711, jun. 2022.

WILKINS P. A.; BAKER J. C.; AMES T. R. **Doenças do sistema respiratório**. In: SMITH, B. P. *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3a ed. Barueri: Manole; 2006. p. 479-592.

ZHANG, J.; WANG, W.; YANG, M.; LIN, J.; XUE, F.; ZHU, Y.; YIN, X. Development of a One-Step Multiplex Real-Time PCR Assay for the Detection of Viral Pathogens Associated With the Bovine Respiratory Disease Complex. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, n. 825257. jan. 2022.

4 AN OUTBREAK OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN A DAIRY HERD FROM SOUTHERN BRAZIL

Abstract: Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), one of the pathogens of Bovine Respiratory Disease (BRD) complex, causes upper and lower respiratory infections in young and adult cattle. Data of the occurrence of BRSV in Brazil is sparse. A precise diagnostic needs laboratory confirmation once BRSV cannot be clinically differentiated from other pathogens. Secondary bacterial infections are commonly associated with positive cases and worsen the severity of lung injury. Conventional and multiplex real-time PCR for a bovine respiratory panel were performed and detected BRSV associated with *Histophilus somni* and *Pasteurella multocida* in animals of a non-vaccinated dairy farm in Southern Brazil. Clinical signs included nasal discharge, cough, dehydration, and dyspnea. Apathy, diarrhea, and ocular discharge were observed only in calves and abnormal tracheal/heart sounds, bruxism, enophthalmos, melena, pale membranes, sialorrhea, and subcutaneous emphysema were observed solely in cows. Results of gene F sequence analysis confirmed BRSV and phylogenetic analysis classified the virus in a new subgroup previously characterized in Brazil. Testing and reporting positive cases could help the identification of disease trends, prevention, and control measures for outbreaks mitigation.

Keywords: Respiratory disease; Molecular diagnostics; Non-Vaccinated Dairy Cattle; BRSV; rRT-PCR.

4.1 INTRODUCTION

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) has caused respiratory diseases in cattle since 1970's (Sarmiento-Silva et al., 2012), being responsible for more than 60% of respiratory outbreaks in dairy herds (Valarcher, Taylor, 2007). In Brazil, the virus was detected for the first time in 1993 (Peixoto et al., 2000) and the seroprevalence reaches up to 80% in dairy cows (Hoppe et al., 2018), depending on the geographic region and herd density (Sacco et al., 2014).

The risk of infection is influenced by temperature fluctuation, stress events (Padalino et al., 2021), dusty environments, and crowding (Sacco et al., 2014; Ince et al., 2022), and outbreaks are more prevalent during cold seasons (Bidokhti et al., 2012; Hoppe et al., 2018). Calves under one year are more susceptible to infection due immunity, and the occurrence of infection in cows is difficult to evaluate due to the high seroprevalence in these animals (Valarcher, Taylor, 2007; Ince et al., 2022). However, a study in Brazil showed that adult cattle have a great risk factor for infection (Hoppe et al., 2018).

Clinical signs are observed in animals of all ages when the virus is introduced in naive herds and can vary from minimal to severe, including tachypnea, fever, subcutaneous

emphysema, dyspnea, and death (Valarcher, Taylor, 2007; Sacco et al., 2014). Cows affected frequently showed lung lesions, characterized by bronchiolitis, interstitial pneumonia, and areas of parenchymal consolidation, usually on the cranioventral pulmonary lobes. Affected animals are susceptible to secondary bacterial infections which is a common complication with fibrinosuppurative bronchopneumonia (Zhou et al., 2023).

The source of the virus is predominantly an infected animal, and the transmission can be directly, via aerosol or close contact, or indirectly, via contaminated surfaces (Sacco et al., 2014). Additionally, contaminated personnel and fomites can spread the virus among herds passively (Oma et al., 2018). Eight virus subgroups have been described worldwide and in Brazil, the subgroup III is more prevalent, but recently new untyped subgroups were identified (Affonso et al., 2014; Leme et al., 2020). Few studies have described BRSV distribution in Brazil, and little is known about the genetic features of the circulating BRSV strains, thus further molecular characterization studies are needed (Giammarioli et al., 2020; Leme et al., 2020). It is important to detect the emergence of new viral variants once they may escape vaccination protection (Giammarioli et al., 2020).

Despite the descriptions of occurrence of BRSV infections in dairy and feedlot cattle (Giammarioli et al., 2020; Farella et al., 2023), the reports are mainly of infections in calves (Peixoto et al., 2000; Larsen et al., 2001), and the reports about outbreaks and adult infections are scarce (Driemeier et al., 1997; Liu et al., 2014; Giammarioli et al., 2020). This manuscript aims to describe the clinical and virological findings in unvaccinated animals experiencing an outbreak of respiratory disease in a dairy herd from Southern Brazil.

4.2 MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Agricultural Sciences Department of Federal University of Paraná (CEUA-UFPR number 31/2023).

4.2.1 Location, herd, clinical presentation, and sampling

A dairy farm, located in the municipality of Sengés (24°06'46"S 49°27'50"O), Northern of Paraná State, Southern Brazil, experienced an outbreak of respiratory disease in July 2023. The herd consisted of 48 Holstein lactating cows, seven dry cows, 37 heifers and 13 calves. The lactating cows were housed in a compost barn system, the heifers in a free-stall

system and the calves in individual house system. The average milk yield was 31 L/cow/ 305 days. Cows were fed a mixed ration of corn silage, commercial feed, and oat grass, which was introduced 15 days before the onset of the respiratory signs. Limestone was pulverized on a neighbor farm two days before the first clinical signs appeared. The cows and heifers were vaccinated against clostridial diseases, and the calves against Brucellosis. The herd was treated with Levamisole subcutaneously 6 months ago. The herd was not vaccinated against agents of bovine respiratory diseases.

On June 2nd, 2023, the farmer noted the first animals with signs of respiratory disease and contacted the veterinarian. Animals of all ages had signs of respiratory disease such as cough, nasal discharge, dyspnea, and fever. The milk yield dropped drastically in all lactating cows and one cow had died eight days before the visit. Two cows (number 24 and 25) showed subcutaneous emphysema. The farm's veterinarian treated the affected animals with gentamicin and diclofenac, but without improvement. Then, the farm's veterinarian contacted the Large Animal Internal Medicine Service of Veterinary Hospital - Paraná State Federal University to assist in the outbreak.

On June 16th, 2023, a team of five veterinarians went to the farm to examine the animals and collect respiratory secretion samples for diagnosis. Nasal and oral flocced swabs were collected from five cows and five calves (from two to five-month-old) with signs of respiratory disease. During clinical examination, a 41-month-old Holstein dairy cow, with signs of severe dyspnea, died during the clinical examination. The animal was inappetent and developed severe respiratory distress with a stretched neck, a grunting expiration and labor breathing with an open mouth and tongue out. On auscultation, crackles and wheezes were detected bilaterally and subcutaneous emphysema was observed. After death, a necropsy was performed and two aliquots of lung, trachea, mediastinal lymph nodes, kidneys and liver samples were collected and maintained refrigerated.

Flocced swabs were kept in viral transport medium, refrigerated at $< 8^{\circ}\text{C}$ until analysis. The swabs and fresh organ samples were sent to the Marcos Enrietti Diagnostic Center, located in Curitiba, Paraná, Brazil for a viral and bacterial molecular panel and *in situ* virus isolation.

4.2.2 Virus isolation

For virus isolation, the tissue samples of cow number 21 (lung, kidneys and heart) were thawed at room temperature, macerated separately and then incubated with Eagle's

minimum essential medium (MEM), antibiotics and antimycotic (pH of 7.2) for 30 minutes at room temperature. Tissue homogenates were centrifuged at 6,000 RCF for 15 minutes. Supernatant was used immediately for virus isolation (OIE, 2021) in quadruplicates diluted 10x and 100x, the homogenates were frozen at -80°C until use in PCR. Viral transport media from animals numbers 16, 22, 23, 24 and 25 nasal swabs were also inoculated in cells in the same way. The nasal secretions were frozen-thawed, homogenized and 0.2 mL of viral transport media separated for cell inoculation. Cytopathic effect (CPE) was observed daily for 7 days after the inoculation in Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) and VERO cells monolayers in Minimum Essential Medium Eagle (MEM) with 10% of fetal bovine serum incubated at 37°C and CO₂ 2,5%. Plates were then frozen for the next passages, which were performed three times with the previous passage media. Cell cultures were observed daily for cellular effect development and considered negative if no CPE was noticed or positive otherwise.

4.2.3 Molecular panel

Molecular analysis was performed as follows. Nasal swabs, organs and media from virus isolation passages 1, 2 and 3 were submitted to nucleic acids purification by the Boom method (Boom et al., 1990). Real-time and conventional PCR were used to investigate the presence of viruses and bacteria: bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bovine herpesvirus 1 (BoAHV1), bovine parainfluenza-3 virus (BPIV3), bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine coronavirus (BCoV), ovine herpesvirus 2 (OvHV-2), bovine ephemeral fever virus (BEFV), *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and *Mycoplasma bovis*, and also the hostspecies control β -actin, applying previously validated assays (Tables 10 and 11) (Weinstock et al., 2001; Decaro et al, 2008; Cunha et al., 2009; Thonur et al, 2012; Kishimoto et al, 2017; Gigante et al., 2018; Gao et al., 2020).

Multiplex real-time reactions were carried out using 3.7 μ L of the samples' nucleic acids with AgPath-ID One-Step RT-PCR (Life Technologies): 1.68 μ L RNase-free water, 4 μ L 2 x RT-PCR Buffer, 0.32 μ L 25 x RT-PCR enzyme mix, 0.3 uM of primer forward, 0.3 uM of primer reverse and 0.3 uM of hydrolysis probe. For each run, ultrapure DNase-RNase-free distilled water (Thermo Fisher Scientific) was included as a No Template Control (NTC) and a positive control (CP). The cycling conditions consisted of 50°C for 20 min followed by denaturation at 95°C for 2 min, and 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, and annealing, amplification, and detection at 58°C for 1 min. Samples were considered negative in the

absence of amplification and positive at maximum threshold cycle, cut-off 37. The real-time PCR reactions were performed in a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) in 0.2 mL thin-wall strips or 96 well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

TABLE 10 - PRIMERS AND PROBES SEQUENCES USED FOR THE REAL-TIME PCR VIRAL AND BACTERIAL PANEL

Agent	Primer/ Probe	DNA Sequence (5'-3') Probe Labels	References
BRSV ¹	F	GGTCAAATAAATGACACTTTCAACAAG	Thonur et al, 2012
	R	AGCATACCACACAACCTATTGAGATG	
	P	TGATACAGGTGACAA	
BoAHV1 ²	F	TGTGGACCTAAACCTCACGGT	Thonur et al, 2012
	R	GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC	
	P	AGGACCGCGAGTTCTTGCCGC	
BPIV3 ³	F	TGATTGGATGTTTCGGGAGTGA	Thonur et al, 2012
	R	AGAATCCTTCTCAATCCTGATATACT	
	P	TACAATCGAGGATCTTGTTCA	
BCoV ⁴	F	CTGGAAGTTGGTGGAGTT	Decaro et al, 2008
	R	ATTATCGGCCTAACATACATC	
	P	CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT	
OvHV-2 ⁵	F	CACACCCAACCTGGAGTATGAC	Cunha et al, 2009
	R	ATGTTGTAGTGGGGCCAGTC	
	P	ATGTGCGCTTCGACCCTC	
<i>Histophilus somni</i>	F	AAGGCCTTCGGGTTGTAAAG	Kishimoto et al, 2017
	R	CCGGTGCTTCTTCTGTGATTAT	
	P	CGGTGATGAGGAAGGCGATTAG	
<i>Pasteurella multocida</i>	F	GGGCTTGTCGGTAGTCTTT	Kishimoto et al, 2017
	R	CGGCAAATAACAATAAGCTGAGTA	
	P	CGGCGCAACTGATTGGACGTTATT	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	F	ATTAGTGGGTTGTCTTGTTAG	Kishimoto et al, 2017
	R	GCGTGATTTCCGGTTCAGTTG	
	P	CTGAACCAACACGAGTAGTCGCTGC	
<i>Mycoplasma bovis</i>	F	TCAAGGAACCCACCAGAT	Kishimoto et al, 2017
	R	AGGCAAAGTCATTTCTAGGTGCAA	
	P	TGGCAAACCTTACCTATCGGTGACCCT	
β-Actin	F	CGATGAAGATCAAGATCATTGC	Gigante et al., 2018
	R	AAGCATTGCGGTGGAC	
	P	TCCACCTCCAGCAGATG TGGATCA	

PCR: Polymerase Chain Reaction; ¹ BRSV: Bovine Respiratory Syncytial Virus; ² BoAHV1: Bovine herpesvirus 1; ³ BPIV3: Bovine Parainfluenza 3; ⁴ BCoV: Bovine coronavirus; ⁵ OvHV-2: Ovine herpesvirus 2; F: primer forward, R: primer reverse, P: probe.

Sybr Green real-time PCR 10 µL reaction was prepared with 1 µL of extracted DNA, 5 µL of Fast SYBR[®] Green Master Mix, ROX added as a passive reference dye (Applied Biosystems, San Diego, CA, USA), 0.4 µM of upstream and downstream primers (Table 11).

Conventional PCR amplifications were carried out in a Mastercycler gradient Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with a step of 50°C for 30 minutes,

denaturation step at 95°C for 10 minutes followed by 45 cycles of 95°C for 15 seconds, 57°C for 45 seconds, 72°C for 30 seconds and finally one cycle of 72°C for 3 minutes. Reactions were prepared using 3 µL of RNA with AgPath-ID One-Step RT-PCR (Life Technologies): 0.8 µL RNase-free water, 5 µL 2 x RT-PCR Buffer, 0.4 µL 25 x RT-PCR enzyme mix, 0.4 uM of primer forward and 0.4 uM of primer reverse.

Amplicons were analyzed by electrophoresis at a constant voltage of 95 V for 1 hour through a 1.5% agarose gel prepared in TBE 1 X buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid and 2 mM EDTA pH 8). The amplicons were visualized with ultraviolet light after Gel Red® staining (Biotium, Freemont, CA, USA). The DNA fragment size was compared with a standard molecular mass marker, 100 bp DNA Ladder - Ludwig Biotec® (Ludwig Biotechnology, Porto Alegre, RS, BR).

TABLE 11 - PRIMERS USED FOR CONVENTIONAL AND SYBR GREEN PCR IN THE VIRAL PANEL

Agent	Primer	DNA Sequence (5'-3') Probe Labels	Amplicon Size (bp ⁶)	References
BVDV ^{1*}	F	TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC	290	Weinstock et al., 2001
	R ³	ACTCCATGTGCCATGTACAGC		
BEFV ^{2**}	F	GGAATTCACACCGCCCGTCACTAT	201	Gao et al., 2020
	R1 ⁴	CCAAGCTTATGCTTAAGTCCAAGGGGT		
	R2 ⁵	CCAAGCTTATGCTTAAGTCCAAGGGAG		

PCR: Polymerase Chain Reaction; ¹ BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus; ² BEFV: Bovine Ephemeral Fever Virus; *conventional RT-PCR; **Sybr Green real-time PCR; F: primer forward, ³ R: primer reverse; ⁴ R1: primer reverse 1; ⁵ R2: primer reverse 2; ⁶ bp: base pair.

4.2.4 Sanger sequencing and Phylogenetic analysis

A fragment of 481 bp region encoding protein F was amplified by nRT- PCR (Vilcek, 1994) and sequenced in both directions to confirm an alignment with reference sequences from GenBank. The sequence alignment editor software BioEdit v7.7 was used for editing. The visualization of the phylogenetic tree was constructed with the software FigTree v1.4.3.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

Generally, the spread of BRSV is linked to environmental and stress factors, with outbreaks appearing after a drop in ambient temperature, common in cold weather, fact observed in this study, due to the winter season. All categories of animals showed signs of

respiratory disease, varying from asymptomatic to severely affected. The calves were prostrated and presented dyspnea, cough, diarrhea, dehydration, nasal and ocular discharge (Table 12 and Figure 12). Peixoto et al. (2000) also reported cough, dyspnea, and ocular discharge as clinical signs in dairy calves in a natural outbreak in Alagoas, Brazil. Those calves in Northern Brazil also presented fever, abnormal lung sounds and death, which was not observed in the present outbreak. On the other hand, they did not have nasal discharge as a clinical sign as observed in Sengés.

The cows were more severely affected and had dyspnea, cough, enophthalmos, sialorrhea, dehydration, teeth grinding, and abnormal lung sounds. Two cows presented subcutaneous emphysema (Table 12 and Figure 12). The heifers were less severely affected, with some animals showing cough. A calf with secondary bacterial infections by *Pasteurella multocida* (*Pm*) and *Histophilus somni* (*Hs*) showed bilateral nasal discharge and ocular discharge, in the other four calves the only bacteria detected was *Pasteurella multocida* and clinical signs did not include any kind of discharge. Bacterial secondary infections caused either by *Histophilus somni* (*Hs*) or *Pasteurella multocida* (*Pm*) were detected in adult and young animals, being more prevalent in cows. The mean threshold cycle found for *Hs* in nasal swabs positive samples was 29,96 and in oral swabs 32,51. For *Pm*, nasal swabs positive samples average was 34,62 compared to 30,93 for oral swabs.

There are few reports of BRSV in Brazil, due to the sporadic occurrence of the disease, the characteristic of being a labile virus, and the reduced number of laboratories capable of diagnosing BRSV (Spilki and Arns, 2008). All animals sampled (10/10) were positive for Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) when nasal swabs were tested. However, when oral swabs were tested the virus could be detected in seventy percent of the cattle (7/10). Nasal swabs positive samples presented lower real-time PCR threshold cycles than oral swabs (average Ct 27,42 while oral swabs Ct 32) a fact that could be explained because saliva has limitations due to its consistency and viscosity, in addition to having PCR inhibitors (Ursic et al., 2022).

Attempts to isolate BRSV virus into cultures of bovine cells and Vero cells were unsuccessful, as the sensitivity of virus isolation is strongly reduced by transport of clinical specimens from the field to the laboratory, although it has minimal effects on RT-qPCR results (West et al., 1998). The supernatant from cow 21, after three passages, was submitted to PCR, and only the first inoculation tested positive, which indicated remaining viral RNA in the inoculum. The second and third passages resulted negative for PCR, indicating viral RNA subsequent dilution. Nasal and oral swabs from live animals and organs from the respiratory

system were positive for BRSV by real-time PCR (Table 12). The virus was confirmed through sanger sequencing.

The cow number 21 organs, lung, trachea and a pool of heart and kidney were positive for BRSV. The nasal swab, trachea and lung, were sequenced for gene F (Figure 13). The 453 base pair sequence shared 98% nucleotide identity with BRSV-UnespJab-1 (MF153477) which was classified into a new subgroup (Affonso et al, 2014). The phylogenetic tree placed gene F sequence from Senges virus close to the one reported by Lerch et al. 1991 (M58350.1) which is used in commercial vaccines such as Bovi-shield® (Zoetis) and Bayovac® (Bayer). The severe outbreak on this farm occurred among two- to six-month-old calves and three- to four-year-old cows. BRSV causes disease in calves from one to 12 months and younger calves 1-3 months are more severely affected (Kimman et al., 1988), even though it is not common, this outbreak caused disease in adult cows. Animals were non-vaccinated, thus infection could be to naturally occurring viruses. It could be suggested that commercial vaccines could confer some protection against viral circulating strains.

FIGURE 12 - SENGÉS CITY OUTBREAK TIMELINE WITH INITIAL DAY OF THE CLINICAL SIGNS, SYMPTOMS AND AGENTS DETECTED

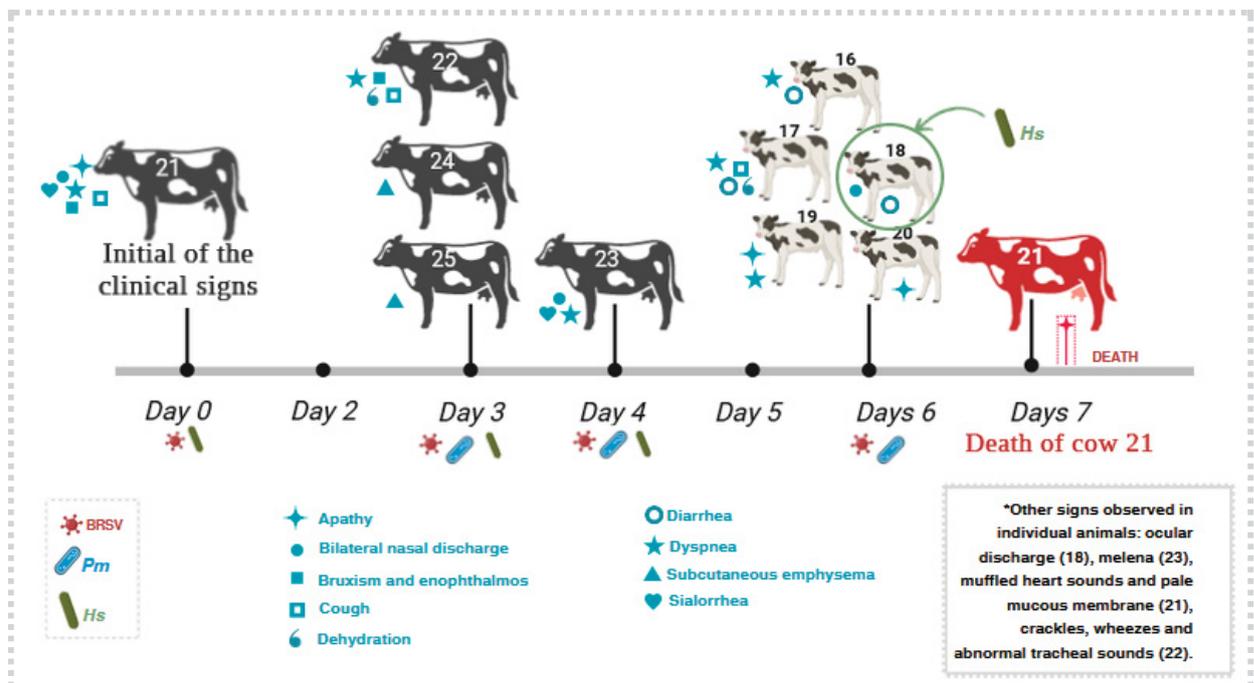


FIGURE 13 - PHYLOGENETIC TREE OF GENE F SEQUENCE FROM BRVS SENGES OUTBREAK

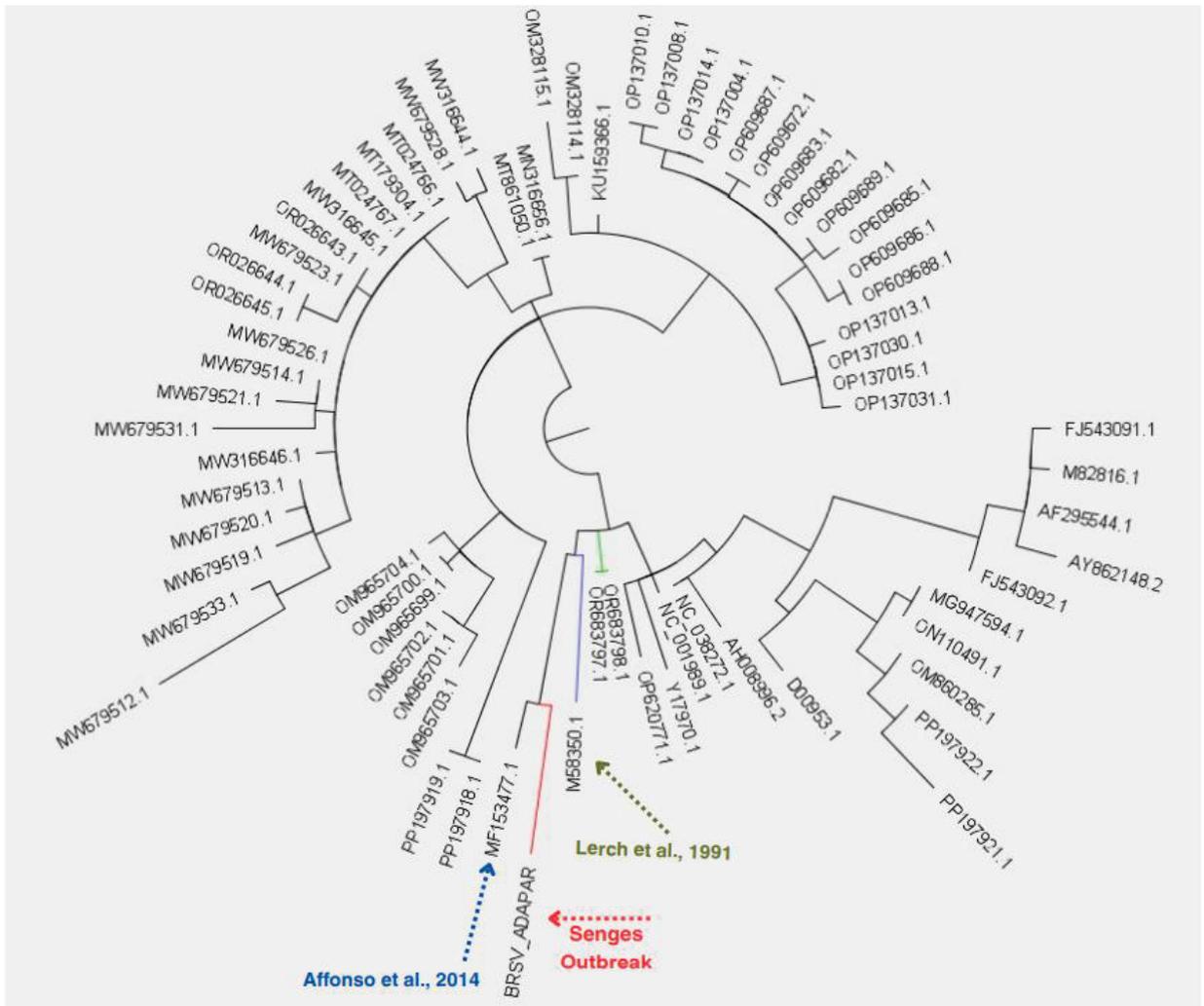


TABLE 12 - QUANTIFICATION CYCLE (C_q) VALUES FOR qPCR OF ENDOGENOUS CONTROL, VIRAL, AND BACTERIAL AGENTS OF ANTE AND POST MORTEM SAMPLES FROM THE TEN ANIMALS (FIVE CALVES AND FIVE COWS) TESTED

General Information				Real-time PCR threshold cycle (C _q) by sample					
Animal	Age	Clinical signs	Rectal temperature	Days with signs of respiratory disease	Matrix	β-Actin ¹	BRSV ²	Hs ³	Pm ⁴
16	93 days	Dyspnea and diarrhea	38.6°C	1	nasal swab oral swab	21.74 32.42	26,61 31,4	ND ND	ND 30,26
17	66 days	Dyspnea, cough, diarrhea, and dehydration	37.9°C	1	nasal swab oral swab	22.92 29.67	29,96 36,23	ND ND	ND 31,67
18	75 days	Cough, bilateral nasal discharge, ocular discharge, and diarrhea	38.8°C	1	nasal swab oral swab	23.09 26.18	31,64 ND	30,72 28,89	37,83 31,24
19	166 days	Apathy and dyspnea	38.4°C	1	nasal swab oral swab	20.84 36.33	33,46 ND	ND ND	32,53 35,77
20	80 days	Apathy	38.8°C	1	nasal swab oral swab	16.29 32.79	32,34 ND	ND ND	34,79 27,99
21	41 months	Extreme dyspnea, cough, teeth grinding, sialorrhoea, bilateral nasal discharge, enophthalmos, pale mucous membrane, and muffled heart sounds (death)	37.7°C	7	nasal swab oral swab lung trachea heart, kidney	18.49 33.21 25,07 24,99 25	28,42 35,17 27,03 30,24 ND	37,15 36,89 ND ND ND	ND ND ND ND ND
22	50 months	Dyspnea, cough, teeth grinding, enophthalmos, dehydration, crackles and wheezes, and abnormal tracheal sounds	37.2°C	5	nasal swab oral swab	21,04 31,07	24,31 26,49	25,97 34,41	32,88 28,95
23	48 months	Dyspnea, sialorrhoea, bilateral nasal discharge, and melena	37.8°C	4	nasal swab oral swab	20,02 27,69	22,93 26,66	27,07 29,85	33,31 26,3
24	52 months	Subcutaneous emphysema	37.1°C	5	nasal swab oral swab	18,97 30,77	22,03 35,46	27 ND	37,29 34,25
25	49 months	Subcutaneous emphysema	41.0°C	5	nasal swab oral swab	22,26 32,90	22,55 36,07	31,88 ND	33,75 31,95

PCR: Polymerase Chain Reaction; ¹ β-Actin: endogenous control; ND: Undetected; ² BRSV: Bovine Respiratory Syncytial Virus; ³ Hs: *Histophilus somni*; ⁴ Pm: *Pasteurella multocida*.

4.4 CONCLUSION

Characterizing the strains responsible for bovine respiratory disease circulating in Brazil is an urgent necessity. The lack of comprehensive and up-to-date data poses a significant obstacle to the development of effective prevention, control, and treatment strategies for the disease. The genetic diversity of the strains and their ability to evolve rapidly demand constant surveillance and detailed studies to understand their epidemiology and impact on animal health and livestock production. Therefore, further studies need to be conducted to characterize these strains, providing crucial insights for the implementation of appropriate management and control measures aimed at the health and well-being of bovine herds in Brazil. Such an approach will not only benefit the livestock industry but also contribute to food security and the sustainability of the Brazilian agricultural sector.

REFERENCES

- AFFONSO, I. B.; SOUZA, A.; MARTINI, M. C.; SANTOS, M. M. A. B.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W.; SAMARA, S. I. Detection of an untyped strain of bovine respiratory syncycial virus in a dairy herd. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2539-2550, 2014.
- BIDOKHTI, M. R. M.; TRAVEN, M.; OHLSON, A.; ZARNEGAR, B.; BAULE, C.; BELAK, S.; ALENIUS, S.; LIU, L. Phylogenetic Analysis of Bovine Respiratory Syncycial Viruses from Recent Outbreaks in Feedlot and Dairy Cattle Herds. **Archives of Virology**, v. 157, n. 4, p. 601-607, 2012.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- CUNHA, C. W.; OTTO, L.; TAUS, N. S.; KNOWLES, D. P.; LI, H. Development of a multiplex real-time PCR for detection and differentiation of malignant catarrhal fever viruses in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2586-2589, 2009.
- DECARO, N.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; MARI, V.; RADOGNA, A.; COLAIANNI, M. L.; CIRONE, F.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 2, p. 167-171, 2008.
- DRIEMEIER, D.; GOMES, M. J. P.; MOOJEN, V.; ARNS, C. W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; DA CLOSTA, U. M. manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 77-81, 1997.
- FERELLA, A.; STREITENBERGER, N.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M. S.; DUS SANTOS, M. J.; FAZZIO, L. E.; QUIROGA, M. A.; ZANUZZI, C. N.; ASIN, J.; CARVALLO, F.; MOZGOVOJ, M. V.; UZAL, F. A. Bovine Respiratory Syncycial Virus Infection in Feedlot Cattle Cases in Argentina. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 35, n. 5, p. 535-542, 2023.
- GAO, S.; DU, J.; TIAN, Z.; NIU, Q.; HUANG, D.; WANG, J.; LUO, J.; LIU, G.; YIN, H. A SYBR green I-based quantitative RT-PCR assay for bovine ephemeral fever virus and its utility for evaluating viral kinetics in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 1, p. 44-50, 2020.
- GIAMMARIOLI, M.; MANGILI, P.; NANNI, A.; PIERINI, I.; PETRINI, S.; PIRANI, S.; GOBBI, P.; DE MIA, G. M. Highly Pathogenic Bovine Respiratory Syncycial Virus Variant in a Dairy Herd in Italy. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 4, p. 740-745, 2020.
- GIGANTE, C.M.; DETTINGER, L.; POWELL, J. W.; SEIDERS, M.; CONDORI, R. E. C.; GRIESSER, R.; OKOGI, K.; CARLOS, M.; PESKO, K.; BRECKENRIDGE, M.; SIMON, E. M. M.; CHU, M. Y.J .V.; DAVIS, A. D.; BRUNT, S. J.; ORCIARI, L.; YAGER, P.; CARSON, W. C.; HARTLOGE, C.; SALIKI, J. T.; SANCHEZ, S.; DELDARI, M.; HSIEH, K.; WADHWA, A.; WILKINS, K.; PEREDO, V. Y.; RABIDEAU, P.; GRUHN, N.; CADET, R.; ISLOOR, S.; NATH, S. S.; JOSEPH, T.; GAO, J.; WALLACE, R.; REYNOLDS, M.;

OLSON, V. A.; LI, Y. Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. 1-25, maio 2018.

HOPPE, I. B. A. L.; MEDEIROS, A. S. R.; ARNS, C. W.; SAMARA, S. I. Bovine Respiratory Syncytial Virus Seroprevalence and Risk Factors in Non-Vaccinated Dairy Cattle Herds in Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 208, p. 1-6, 2018.

INCE, O. B.; SEVIK, M.; OZGUR, E. G.; SAIT, A. Risk Factors and Genetic Characterization of Bovine Respiratory Syncytial Virus in the Inner Aegean Region, Turkey. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54, n. 4, 2022.

KIMMAN, T. G.; ZIMMER, G. M.; WESTENBRINK, F.; MARS, J.; LEEUWEN, E. Epidemiological study bovine respiratory syncytial virus infections in calves: Influence of maternal antibodies on the outcome of disease. **Veterinary Record**, v. 123, p. 104-109, 1988.

KISHIMOTO, M.; TSUCHIAKA, S.; RAHPAYA, S. S.; HASEBE, A.; OTSU, K.; SUGIMURA, S.; KOBAYASHI, S.; KOMATSU, N.; NAGAI, M.; OMATSU, T.; NAOI, Y.; SANO, K.; OKAZAKI-TERASHIMA, S.; OBA, M.; KATAYAMA, Y.; SATO, R.; ASAI, T.; MIZUTANI, T. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 3, p. 517-523, 2017.

LARSEN, L. E.; TEGTMEIER, C.; PEDERSEN, E. Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) Pneumonia in Beef Calf Herds Despite Vaccination. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, p. 113-121, 2001.

LEME, R. A.; DALL AGNOL, A. M.; BALBO, L. C.; PEREIRA, F. L.; POSSATTI, F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular Characterization of Brazilian Wild-Type Strains of Bovine Respiratory Syncytial Virus Reveals Genetic Diversity and a Putative New Subgroup of the Virus. **Veterinary Quarterly**, v. 40, n.1, p. 83-96, 2020.

LIU, S. S.; SHEN, H. Y.; LEE, J. W.; LIN, S. W.; CHEN, H.; YANG, C. D.; CHU, C. Y. Case report: a disease outbreak of bovine respiratory syncytial virus in Taiwan. **Taiwan Veterinary Journal**, v. 40, n. 3, p. 123-130, 2014.

OIE. Office International des Epizooties. **Manual of Diagnostic test and Vaccine for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)**. 5th ed. Paris: OIE; 2004. p. 169. 2010.

OMA, V. S.; KLEM, T.; TRAVEN, M.; ALENIUS, S.; GJERSET, B.; MYRMEL, M.; STOKSTAD, M. Temporary Carriage of Bovine Coronavirus and Bovine Respiratory Syncytial Virus by Fomites and Human Nasal Mucosa after Exposure to Infected Calves. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 22, p. 1-8, 2018.

PADALINO, B.; CIRONE, F.; ZAPPATERA, M.; TULLIO, D.; FICCO, G.; GIUSTINO, A.; NDIANA, L. A.; PRATELLI, A. Factors Affecting the Development of Bovine Respiratory Disease: A Cross-Sectional Study in Beef Steers Shipped From France to Italy. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. 627894, p. 1-16, 2021.

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

Respiratory Syncytial Virus Infection in Cattle. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 427-436, 2014.

SACCO, R. E.; MCGILL, J.L.; PILLATZKI, A. E.; PALMER, M. V.; ACKERMANN, M. R. SARMIENTO-SILVA, R. E.; NAKAMURA-LOPEZ, Y.; VAUGHAN, G. Epidemiology, Molecular Epidemiology and Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus. **Viruses**, v. 4, n.12, p. 3452-3467, 2012.

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

THONUR, L.; MALEY, M.; GILRAY, J.; CROOK, T.; LAMING, E.; TURNBULL, D.; NATH, M.; WILLOUGHBY, K. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 37, p. 1-9, 2012.

URSIC, T.; KOGOJ, R.; SIKONJA, J.; ROSKARIC, D.; JEVSNIK VIRANT, M.; BOGOVIC, P.; PETROVEC, M. Performance of nasopharyngeal swab and saliva in detecting Delta and Omicron SARS-CoV-2 variants. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 10, p. 4704-4711, jun. 2022.

VALARCHER, J. F.; TAYLOR, G. Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection. **Veterinary Research**, v. 38, n.2, p. 153-180, 2007.

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

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A.E. Single-Tube-Enzyme Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Pooled Bovine Serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 343-346. 2001.

WEST, K.; BODGAN, J.; HAMEL, A.; NAYAR, G.; MORLEY, P.S.; HAINES, D. M.; ELLIS, J. A. A comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 245-250, 1998.

ZHOU, Y.; SHAO, Z.; DAI, G.; LI, X.; XIANG, Y.; JIANG, S.; ZHANG, Z.; REN, Y.; ZHU, Z.; FAN, C.; ZHANG, G. Pathogenic Infection Characteristics and Risk Factors for Bovine Respiratory Disease Complex Based on the Detection of Lung Pathogens in Dead Cattle in Northeast China. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 1, p. 589-606, 2023.

ANEXO I – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 031/2023, referente ao projeto de pesquisa “**Monitoramento dos principais agentes infecciosos envolvidos no Complexo Respiratório Bovino no Estado do Paraná**”, sob a responsabilidade de **Ivan Roque de Barros Filho** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em 10/10/2023.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	Outubro/2023 até Julho/2026
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> (bovino)
Número de animais	210
Peso/Idade	500kg/Até 2 anos
Sexo	Fêmea
Origem	Fazendas privadas no Paraná, Brasil

*A autorização para início da aula se torna válida a partir da data de emissão deste certificado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 031/2023, regarding the research program “**Monitoring of the main infectious agents involved in Bovine Respiratory Complex in the State of Paraná**” under **Ivan Roque de Barros Filho** – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, on 2023, October 10th.

Purpose	Research
Validity	2023 October until 2026 July
Specie/Line	<i>Bos taurus</i> (bovine)
Number of animals	210
Weight/Age	1.102,31lb/Until 2 years old
Sex	Female
Origin	Private farms in Paraná, Brazil

*The authorization to start the research becomes valid from the date of issue of this certificate.

Curitiba, 10 de Outubro de 2023

Alex Maiorka
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
AG - UFPR