

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE RT-PCR PARA
SEQÜENCIAMENTO DO GENE DA HEMAGLUTININA-
NEURAMINIDASE (HN) E DETECÇÃO DO VÍRUS
PARAINFLUENZA BOVINO TIPO 3**

Dissertação de Mestrado

Rodrigo de Almeida Vaucher

Porto Alegre, 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE RT-PCR PARA
SEQÜENCIAMENTO DO GENE DA HEMAGLUTININA-
NEURAMINIDASE (HN) E DETECÇÃO DO VÍRUS
PARAINFLUENZA BOVINO TIPO 3**

Rodrigo de Almeida Vaucher

Farmacêutico – Bioquímico / PUCRS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre (RS), Brasil

Abril, 2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) da FEPAGRO Saúde Animal com apoio do Laboratório ATCGene do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Laboratório Weinmann Ltda. O financiamento foi promovido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Amauri B. Simonetti, pela oportunidade e confiança depositada no meu trabalho e, acima de tudo, pela amizade e estímulo nos momentos de dificuldade.
- Ao Prof. Dr. Paulo M. Roehe, pela oportunidade de trabalhar em seu Laboratório, pelo ensinamento transmitido, pela amizade, pelo estímulo moral e financeiro e, principalmente, pelo grande exemplo profissional que devemos seguir.
- Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia do IPVDF, Ana Paula, Cíntia, Alessandra, Michel, Marco, Helena, Thais, Mauro, Diógenes e demais colegas pela troca de informações e ajuda no decorrer desta caminhada. Um agradecimento especial ao Paulo Esteves e Ana Franco pelo incentivo nos momentos complicados e pela troca de informações preciosas para realização dos experimentos.
- Ao IPVDF, pela estrutura utilizada, e seus funcionários, em especial ao Samuel pelo fornecimento das células.
- Ao LACEN-RS pelo fornecimento de parte das amostras utilizadas no estudo, especialmente a Dr(a). Selir M. Straliozzo responsável pelo Laboratório de Virologia.
- A Dr(a). Marilda Siqueira e seu grupo, pela oportunidade de estágio no Laboratório de Virologia da FIOCRUZ/RJ.
- Ao Laboratório Weinmann Ltda, especialmente para a minha colega Fabi pelo empenho na realização do seqüenciamento.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e seus Professores.
- A CAPES pelo fornecimento da bolsa de Mestrado.
- Para as pessoas que me deram suporte para chegar até aqui, minha família, especialmente a minha mãe Nilza pela dedicação, carinho, ajuda e incentivo, mesmo sem entender o que faço, as minhas irmãs Sibebe, Luciane e Ana Valéria pelo incentivo constante para o meu aperfeiçoamento profissional.
- E a minha namorada Janice pelo seu companheirismo, compreensão, carinho e amor. Esta vitória também é sua. A sua família pelo incentivo e compreensão.

**Desenvolvimento de técnicas de RT-PCR para seqüenciamento
do gene da hemaglutinina-neuraminidase (HN) e detecção do vírus
Parainfluenza bovino tipo 3**

Autor: Rodrigo de Almeida Vaucher

Orientador: Dr. Amauri Braga Simonetti

RESUMO

Existem diversos trabalhos publicados sobre a utilização de diferentes métodos imunológicos para diagnosticar infecções do trato respiratório causadas por vírus parainfluenza bovino tipo 3 (bPIV-3). Entretanto, é escassa a literatura sobre a utilização da técnica de isolamento viral. Até o presente momento não havia sido relatada a utilização da Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), na detecção de bPIV-3. O objetivo deste estudo foi contribuir para uma melhor caracterização dos bPIV-3 através do desenvolvimento de técnicas de RT-PCR para a sua detecção. Utilizando-se uma amostra referência de bPIV-3 (SF-4) e uma amostra de bPIV-3 isolada no Rio Grande do Sul (amostra DIO) foram desenvolvidas técnicas de RT-PCR para a amplificação de diferentes regiões do gene da hemaglutinina-neuraminidase (HN). Após seqüenciamento parcial do gene HN e alinhamento das seqüências da amostra DIO, os resultados revelaram homologia de 99% em relação à amostra referência, 98% a 91% quando comparada com outras amostras de bPIV-3 previamente publicadas na rede e 79% a 80% quando comparada com as amostras de hPIV-3. Foi desenvolvida, também, uma técnica de RT-PCR para amplificação de parte do gene da HN do bPIV-3 e do hPIV-3. Nos experimentos de otimização, a técnica de RT-PCR, comparada com o isolamento viral, apresentou sensibilidade de 140 DICC₅₀, boa especificidade e reprodutibilidade. Os resultados, após seqüenciamento da amostra de vírus bPIV-3 isolada no RS, apresentaram, grande homologia com os das amostras de bPIV-3 comparadas, especialmente a amostra referência. Os dados obtidos neste estudo mostraram que a RT-PCR desenvolvida para a detecção de PIV-3 foi capaz de amplificar um fragmento de 1009 bp do gene da HN de amostras de PIV-3 isoladas de bovinos e humanos, possibilitando a sua utilização em diagnóstico e em estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: vírus da parainfluenza bovina tipo-3 (bPIV-3), RT-PCR, seqüenciamento, diagnóstico, genotipagem

1Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (153 p.) Abril, 2005.

Development of RT-PCR techniques for hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene sequencing and detection of bovine type 3 Parainfluenza virus

Author: Rodrigo de Almeida Vaucher

Supervisor: Dr. Amauri Braga Simonetti

Abstract

There are several published studies on the application of different immunological methods for diagnosis of respiratory infections caused by bovine type 3 Parainfluenza virus (bPIV-3). However, the literature on viral isolation procedure is very scarce. At present there is no report about the utilization of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for bPIV-3 detection. The aim of this study was to contribute to a better characterization of bovine type 3 Parainfluenza virus by developing RT-PCR techniques to its detection. A reference sample (SF-4) and a sample of bPIV-3 isolated in Rio Grande do Sul (DIO sample) were used to develop RT-PCR techniques by amplification of different regions of hemagglutinin-neuraminidase gene (HN). After HN gene partial sequencing of DIO sample and sequence alignment, the results revealed 99% homology when compared to reference sample, 98% the 91% homology in relation to bPIV-3 samples previously published and 79% the 80% if compared to hPIV-3 samples. It was also developed a RT-PCR for amplification of a part of bPIV-3 and hPIV-3 NH gene. In optimization experiments, compared to viral isolation procedure, the RT-PCR displayed a sensitivity of 140 DICC₅₀, good specificity and reproductibility. Results after sequencing of bPIV-3 sample isolated in RS displayed strong homology with those of bPIV-3 tested samples, specially the reference sample. Data obtained in this study showed that the RT-PCR technique developed for PIV-3 detection was able to amplify an 1009 bp HN gene fragment of bovine and human PIV-3 samples which enables its utilization in diagnostic and epidemiological studies.

Key words: bovine parainfluenza virus type 3 (bPIV-3), RT-PCR, sequencing, diagnostic, genotipagem.

1Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (153 p.) April, 2005.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Vírus da parainfluenza (PIVs)	4
2.2. Sorotipos de PIVs.....	6
2.3. Vírus da parainfluenza tipo 3.....	8
2.4. Propriedades físico-químicas.....	9
2.5 Organização estrutural.....	10
2.5.1. Virions e envelope.....	10
2.5.2. Nucleocapsídeo.....	11
2.5.3. Genoma e genes.....	11
2.5.4. Proteínas virais.....	13
2.5.5. Relações antigênicas.....	17
2.6. Replicação viral dos PIV-3.....	17
2.7. Epidemiologia dos PIV-3.....	21
2.8. Transmissão dos PIV-3.....	23
2.9. Patogenia e manifestações clínicas dos PIV-3.....	25
2.10. Síndromes clínicas dos PIV-3.....	27
2.10.1. Laringotraqueobronquite aguda (Tosse).....	28
2.10.2. Bronquiolite.....	28
2.10.3. Pneumonia.....	29
2.10.4. Traqueobronquite.....	30

2.10.5. Febre dos transportes, bronquiolite, broncopneumonia e abortos.....	30
2.11. Imunidade contra os PIV-3.....	32
2.12. Detecção laboratorial dos PIV-3.....	34
2.12.1. Coleta e espécimes clínicas.....	34
2.12.2. Diagnóstico virológico.....	35
2.12.3. Diagnóstico sorológico.....	37
2.12.3.1. Ensaio imunoenzimático.....	38
2.12.3.2. Inibição da hemaglutinação.....	38
2.12.3.3. Soroneutralização.....	39
2.12.4. Diagnóstico molecular.....	39
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Gerais.....	42
3.2. Específicos.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Local.....	43
4.2. Células.....	43
4.3. Amostras virais.....	44
4.3.1. Amostra referência.....	44
4.3.2. Amostras virais humanas.....	44
4.3.3. Amostras virais bovinas.....	44
4.3.4. Amostras virais de outros animais.....	44

4.4. Isolamento viral.....	45
4.5. Estoques virais.....	47
4.6. Titulação viral.....	47
4.7. Hemácias de cobaio.....	48
4.8. Teste de Hemaglutinação (HA).....	48
4.9. Estabilidade do bPIV-3.....	49
4.10. Teste de Imunoperoxidase (IPX).....	49
4.11. Teste de Imunofluorescência direta (IFD).....	51
4.12. Técnica de Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase	52
4.12.1. Seleção e síntese de oligonucleotídeos.....	52
4.12.2. Estratégia de amplificação.....	54
4.12.3. Extração e precipitação de DNA viral.....	57
4.12.4. Extração do RNA viral.....	58
4.12.5. Síntese de cDNA.....	59
4.12.6. Amplificação.....	60
4.12.6.1. RT-PCR para o seqüenciamento do gene da HN do bPIV-3 (amostra DIO).....	60
4.12.7. Otimização da RT-PCR.....	61
4.12.7.1. Sensibilidade.....	61
4.12.7.2. Especificidade.....	63
4.12.7.3. Reprodutibilidade.....	64
4.12.8. RT-PCR para o diagnóstico do bPIV-3 e hPIV-3.....	64
4.12.9. Eletroforese em gel de agarose.....	65
4.12.10. Purificação dos produtos de PCR.....	65

4.12.11. Quantificação de DNA.....	66
4.12.12. Clivagem dos produtos de PCR purificados com enzima de restrição.....	67
4.13. Seqüenciamento.....	67
4.14. Análise das seqüências obtidas no seqüenciamento.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1. Isolamento e titulação viral.....	69
5.2. Reação da hemaglutinação.....	73
5.3. Estabilidade do bPIV-3.....	74
5.4. Imunoperoxidase.....	76
5.5. Imunofluorescência direta.....	78
5.6. RT-PCR.....	79
5.6.1. Seleção e síntese de oligonucleotídeos.....	79
5.6.2. Extração e precipitação de DNA viral.....	81
5.6.3. Extração do RNA viral.....	81
5.6.4. Transcrição reversa (RT).....	82
5.7. Amplificação.....	83
5.8. RT-PCR para o seqüenciamento do gene da HN do bPIV-3.....	83
5.9. Otimização da técnica de RT-PCR.....	85
5.9.1. Sensibilidade.....	85
5.9.2. Especificidade.....	88
5.9.3. Reprodutibilidade.....	92
5.10. RT-PCR para a detecção de bPIV-3 e hPIV-3.....	93

5.11. Análise dos produtos de clivagem com <i>Nco I</i>	96
5.12. Seqüenciamento.....	97
6. CONCLUSÕES.....	100
7. PERSPECTIVAS.....	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ANEXOS I e II.....	132
9.1. APÊNDICES	

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1: Relação taxonômica dos vírus pertencentes à subfamília <i>Paramyxoviridae</i>	7
TABELA 2: Características e funções das principais proteínas dos PIV-3.....	16
TABELA 3: Origem das amostras virais de bPIV-3 e hPIV-3.....	46
TABELA 4: Oligonucleotídeos iniciadores usados para o seqüenciamento do gene HN do bPIV-3.....	53
TABELA 5: Pares de oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho dos fragmentos amplificados por PCR	62
TABELA 6: Resultados obtidos na titulação das amostras isoladas em células MDBK dos bPIV-3 e hPIV-3.....	72
TABELA 7: Resultados dos testes de estabilidade.....	76

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1: Microscopia eletrônica do vírus parainfluenza tipo 3.....	10
FIGURA 2: Organização genômica do PIV-3.....	12
FIGURA 3: Representação gráfica de um vírion do gênero <i>Respirovirus</i>	14
FIGURA 4: Cristalografia de uma amostra viral de paramixovírus.....	14
FIGURA 5: Esquema de replicação dos vírus do gênero <i>Respirovirus</i>	20
FIGURA 6: Estratégia de amplificação dos fragmentos para o seqüenciamento completo do gene da hemaglutina-neuramidase (HN) do vírus bPIV-3 amostra DIO.....	55
FIGURA 7: Estratégia de amplificação do fragmento do gene da hemaglutina-neuramidase (HN) para diagnóstico do bPIV-3.....	57

FIGURA 8: Aspectos morfológicos das células MDBK PIV-3.....	70
FIGURA 9: Resultados obtidos na reação de hemaglutinação (HA) para amostras de bPIV-3.....	73
FIGURA 10: Resultado da técnica de imunoperoxidase (IPX) para a detecção do vírus bPIV-3 após cultivo celular em células MDBK.....	78
FIGURA 11: Resultado da técnica de IFD para a detecção de bPIV-3 após cultivo celular em células MDBK.....	79
FIGURA 12: Resultados das sínteses de cDNA por transcrição reversa	82
FIGURA 13: Resultados das amplificações dos fragmentos purificados do gene da HN.....	84
FIGURA 14: Resultados do teste de sensibilidade da técnica de RT-PCR obtidos através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN da amostra referência SF-4, após titulação viral.....	86

FIGURA 15: Resultados do teste de sensibilidade da técnica da RT-PCR obtidos através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN da amostra referência SF-4, após diluições do cDNA.....	87
FIGURA 16: Resultado do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P1 / P4 do gene da HN das amostras DIO.....	89
FIGURA 17: Resultado do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P3 / P4 do gene da HN da amostra DIO.....	89
FIGURA 18: Resultado do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P5 / P6 do gene da HN da amostra DIO.....	90
FIGURA 19: Resultado do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P9 / P10 do gene da HN da amostra DIO.....	90

FIGURA 20: Resultados do teste de especificidade da técnica de RT-PCR avaliada através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras de bPIV-3 e de outras amostras testadas.....	91
FIGURA 21: Resultados dos testes de reprodutibilidade da técnica de RT-PCR avaliada através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras do bPIV-3 e hPIV-3 no quinto dia de experimento.....	93
FIGURA 22: Resultados da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras isoladas de vírus bPIV-3.....	94
FIGURA 23: Resultados da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras isoladas de vírus hPIV-3.....	95
FIGURA 24: Resultados do perfil de restrição do fragmento amplificado de 1009 bp do gene da HN do vírus bPIV-3 por RT-PCR após clivagem com Nco I.....	97
FIGURA 25: Resultado do seqüenciamento do fragmento 5 (P9/P10).....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

µL.....	Microlitro
BHV.....	Herpesvírus bovino
RSV.....	Vírus respiratório síncial
IPVDF.....	Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor
D. O.....	Densidade Ótica
DICC ₅₀	Dose infectante para 50% dos cultivos celulares
ECP.....	Efeito citopático
ELISA.....	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
E-MEM.....	Meio Mínimo Essencial
FAO.....	Food and Agriculture Organization
FEPAGRO.....	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
HA.....	Hemaglutinação
HI.....	Inibição da hemaglutinação
HN.....	Hemaglutinina neuraminidase
hPIV-1.....	Vírus da parainfluenza humana tipo 1
hPIV-2.....	Vírus da parainfluenza humana tipo 2
PIV-3.....	Vírus da parainfluenza tipo 3
hPIV-3.....	Vírus da parainfluenza humana tipo 3
bPIV-3.....	Vírus da parainfluenza bovina tipo 3
hPIV-4a.....	Vírus da parainfluenza humana tipo 4a
hPIV-4b.....	Vírus da parainfluenza humana tipo 4b
IFD.....	Imunofluorescência direta

IPX.....Imunoperoxidase
Ig.....Imunoglobulina
LACEN/RS.....Laboratório Central do Rio Grande do Sul
MDBKCélulas de linhagem “Madin Darby Bovine Kidney”
mLMililitro
NDV.....Vírus da doença de Newcastle
RE.....Retículo endoplasmático
RNA.....Ácido Ribonucléico
rpmRotações por minuto
RT- PCR.....Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
SFB.....Soro fetal bovino
SF4.....“Shipping fever 4”
SN.....Soroneutralização
SV 41.....Vírus símio 41
SV5.....Vírus Sendai 5
UFBA.....Universidade Federal da Bahia
UHA.....Unidade hemaglutinante

1. INTRODUÇÃO

Os vírus da parainfluenza (PIVs) são membros da família *Paramyxoviridae* pertencentes ao gênero *Respirovirus*. Este gênero é formado pelos vírus da parainfluenza humana tipo 1 e 3 (hPIV-1 e hPIV-3), vírus Sendai (PIV-1 murino) e vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bPIV-3). São envelopados, constituídos por RNA de fita simples, de polaridade negativa, com aproximadamente 15000 nucleotídeos. O bPIV-3 e o hPIV-3 são importantes patógenos do trato respiratório, apresentando organização idêntica em nível de proteínas e uma pequena diversidade genética e antigênica. Embora apresentem características similares, estes patógenos infectam hospedeiros distintos.

O bPIV-3 está associado a infecções respiratórias em ovinos e raramente em cães, eqüinos e humanos. Está associado, também, ao quadro clínico conhecido como “shipping fever”, ou febre dos transportes. As infecções por hPIV-3 ocorrem apenas em humanos, sendo estas responsáveis pela significativa morbidade e mortalidade em crianças com menos de 1 ano de idade.

Nos rebanhos dos países do hemisfério norte, as infecções pelo vírus bPIV-3 são comuns, embora muitas vezes passem despercebidas. No

Brasil, a importância das infecções causadas pelo bPIV-3 ainda é questionável, devido à falta de estudos sobre este vírus. Embora existam evidências sorológicas da presença do vírus no país, raramente tem sido reportado o isolamento do bPIV-3. Até o presente momento, apenas dois relatos de isolamento viral do bPIV-3 foram realizados no país, o primeiro em São Paulo, a partir de amostras de pulmão bovino, e o segundo reportado no Rio Grande do Sul, a partir de secreções nasais de bovino com doença respiratória.

Atualmente, o diagnóstico da infecção por bPIV-3 é realizado por cultivo celular, que é considerado o método “gold standard”. Há diversos relatos sobre o uso deste método para a detecção do hPIV-3 e poucos para bPIV-3. Outros métodos menos específicos e sensíveis, porém mais rápidos que o cultivo celular, vêm sendo utilizados para a detecção de ambos os PIV-3. Estes são baseados na detecção de anticorpos (inibição da hemaglutinação, soroneutralização e ensaios imunoenzimáticos) e de antígenos (imunofluorescência direta e hemaglutinação), não sendo capazes de identificar sorotipos virais. Além disso, métodos imunológicos baseados na detecção de anticorpos podem apresentar resultados falso-negativos, sendo utilizados para a triagem do vírus.

Recentemente, a técnica de RT-PCR tem sido empregada como uma alternativa sensível para realizar o diagnóstico das infecções causadas pelo hPIV-3 em aspirados nasais, suabes oriundos de secreções nasais ou a partir do próprio isolamento viral. Alternativamente, têm sido utilizadas técnicas de RT-PCR capazes de identificar diferentes tipos de PIVs (hPIV-1, hPIV-2, hPIV-

3, hPIV-4a e hPIV-4b) e outros vírus em espécimes de origem humana como por exemplo, o RSV.

Embora este método venha sendo empregado para a detecção dos PIV-3 em amostras de origem humana, não foi relatada até o presente momento (que seja de conhecimento dos autores), a utilização da RT-PCR para a detecção do vírus em amostras de origem bovina. Portanto, neste estudo, foram desenvolvidas técnicas que visam contribuir para uma melhor caracterização do vírus em nosso meio através de métodos moleculares para a sua detecção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vírus parainfluenza (PIVs)

Os vírus parainfluenza (PIVs) incluem importantes patógenos do trato respiratório, que apresentam características estruturais e biológicas similares, mas que são a causa de diferentes doenças humanas e veterinárias (Henrickson & Savatski, 1997)

Pertencem à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*. Esta subfamília apresenta três gêneros: *Respirovirus*, *Rubulavirus* e *Morbillivirus*. Destes três, apenas dois apresentam PIVs como membros: o *Respirovirus* e o *Rubulavirus* que podem ser distinguidos fisicamente dos *Morbillivirus*, pois este último não apresenta a proteína neuraminidase (Collins et al., 1996).

Os PIVs que infectam humanos (hPIV-1 a hPIV-4) foram primeiramente isolados durante o período de 1956 e 1960, a partir de estudos pediátricos realizados para identificação de doenças do trato respiratório em crianças. Foram reconhecidos pelo efeito citopático provocado em cultura de células ou pela reação de hemadsorção (adsorção de eritrócitos de cobaio) (Chanock, 1956, Chanock et al., 1958; Johnson et al., 1960). Estas crianças apresentavam sintomatologia semelhante às infecções no trato respiratório causadas pelos vírus influenza, um ortomixovírus. As partículas virais dos

paramixovírus isoladas apresentavam características idênticas aos influenza possuindo também atividade hemaglutinante e mucolítica (Collins et al., 1996). Embora estes vírus apresentem certa similaridade quanto ao processamento de suas glicoproteínas, à imunidade do hospedeiro e à patogenia, são considerados geneticamente e antigenicamente distintos (Collins et al., 1996). Atualmente, os gêneros dos paramixovírus podem ser diferenciados morfológicamente dos ortomixovírus devido, principalmente, à espessura do nucleocapsídeo não segmentado que mede 17nm e 9nm, respectivamente (Chanock & McIntosh, 1985). Depois de descobertos, os diferentes subtipos de PIVs humanos foram associados a diversas síndrome severas provocadas no trato respiratório de recém-nascidos, crianças e adultos, tais como tosse (hPIV-1, hPIV-2 e hPIV-3) e como pneumonia e/ou bronquiolite (hPIV-3). Ao contrário dos demais PIVs, o hPIV-4 vem sendo associado a doenças brandas do trato respiratório superior em crianças e adultos (Morimoto et al., 1970, Brandt et al., 1986, Brady et al., 1990, Fryer, 1991; Bose et al., 2001).

Outros vírus pertencentes à família *Paramyxoviridae* descobertos em animais foram relacionados morfológica e antigenicamente com os PIVs humanos. Estudos com estes vírus relataram fortes evidências antigênicas sugerindo que bPIV-3 esteja intimamente relacionado com o hPIV-3 (Abinanti et al., 1961, Chanock et al., 1961, Cook et al., 1963; Goswami et al., 1982). O vírus Sendai, um vírus originário de camundongos que é atualmente classificado como PIV-1, foi considerado, por muitos anos, um patógeno humano devido à sua relação antigênica com hPIV-1 (Fukumi et al., 1959). O vírus simio 5 (SV5) e o vírus simio 41 (SV41), considerados contaminantes de

cultivo celulares e isolados de cultivo primário de rim de macaco, são antigenicamente semelhantes entre si e altamente relacionados com o hPIV-2 (Collins et al., 1996). Por fim, os PIVs aviários que são constituídos por nove sorotipos distintos, apresentam como seu representante mais conhecido o vírus da doença de Newcastle (NDV) associado ao sorotipo do PIV-1 (Alexander, 1991).

Muitos vírus dessa família têm sido utilizados extensivamente em estudos para definir as propriedades bioquímicas e moleculares, que em grande parte ainda não foram desvendadas pelos pesquisadores (Collins et al., 1996). Devido à baixa prevalência e incidência na população humana comparada com as de outros vírus, por exemplo, adenovírus e vírus respiratório sincicial (RSV), poucos estudos epidemiológicos desses vírus têm sido realizados no mundo. Este fato deve ser reavaliado, pois os PIVs são apenas alguns entre tantos vírus que podem causar patologias em diversas espécies, mas que também podem ser responsáveis por epidemias tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos, provocando prejuízo e impacto econômico.

2.2. Sorotipos de PIVs

Estudos sorológicos e análises antigênicas de todas as espécies pertencentes à subfamília *Paramyxovirinae* demonstraram três gêneros básicos, que são apresentados na **Tabela 1**. Todos os PIVs induzem a formação de níveis variados de anticorpos heterófilos durante infecções e possuem antígenos comuns. Estes, muitas vezes, tornam impossível a

determinação da positividade sorológica, devido à produção de respostas inespecíficas ou reação cruzada com antígenos similares ou diferentes dos PIVs. Entretanto, soros hiperimunes de animais como hamster ou cobaio têm sido utilizados para diferenciar esses vírus e servem como padrão em testes como inibição da hemaglutinação (HI), soroneutralização (SN) e ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (Canchola et al., 1965; Carballal et al., 2001).

Estudos realizados por análise molecular envolvendo os quatro tipos de PIVs humanos têm demonstrado elevada antigenicidade e heterogeneidade genética entre eles (van Wyke Coelingh et al., 1985, Tsurudome et al., 1989; Henrickson & Savatski, 1996).

Tabela 1: Relação taxonômica dos vírus pertencentes à subfamília *Paramyxovirinae*.

Subfamília	Gênero	Espécie	
		Humana	Animal
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	hPIV-1 hPIV-3	Sendai (camundongo PIV-1) bPIV-3, simian SV-10 NDV (1), aPIV-3, aPIV-4, aPIV6, aPIV-9
	<i>Rubulavirus</i>	hPIV-2 hPIV-4A e hPIV-4B Vírus da Caxumba	Vírus Yucaipa (2) Vírus Kunitachi (5) Vírus suíno do México Simian PIV-5 e PIV-41
	<i>Morbillivirus</i>	Vírus do Sarampo	Vírus da cinomose canina Vírus da cinomose de golfinhos Vírus rinderpest (bovino)

A variabilidade populacional e as mudanças antigênicas e genéticas observadas nos PIVs sugerem uma evolução similar ao modelo dos vírus influenza B (Komada et al., 1990). Reações utilizando anticorpos policlonais

podem detectar muitas cepas de PIVs com antígenos comuns, mas gêneros como o hPIV-1 e hPIV-3 têm apresentado mudanças progressivas na antigenicidade (Henrickson & Savatski, 1992, Komada et al., 1992; Henrickson & Savatski, 1997).

Alguns estudos demonstraram que cepas isoladas de hPIV-1 nos últimos anos apresentaram diferenças antigênicas e genéticas quando comparadas com cepas do mesmo tipo isoladas em 1957 (Henrickson & Savatski, 1996), comprovando a diversidade antigênica dos subgrupos dos PIVs.

2.3 Vírus parainfluenza tipo 3 (PIV-3)

Os PIV-3 pertencem ao gênero *Respirovirus*, apresentando como principais representantes os hPIV-3 e bPIV-3 que estão antigenicamente relacionados (Bailly et al., 2000). O hPIV-3 é responsável por significativa morbidade e mortalidade em crianças, especialmente aquelas com menos de um ano de idade (Collins et al., 1996), sendo a causa comum de doenças no trato respiratório inferior (pneumonia, bronquiolites e tosse) em crianças e adolescentes (Arghedas et al., 1990). Podem infectar diferentes espécies de forma natural ou experimental. Infecções assintomáticas podem ser induzidas em hamsters, cobaias e furões adultos (Johnson et al., 1973). Até o presente momento não foi relatada a presença do hPIV-3 em infecções de bovinos, embora se saiba que o vírus bPIV-3 pode ser potencialmente infeccioso para humanos (Woods et al., 1967). Evidências sorológicas apontam que o vírus bPIV-3 pode infectar células diferentes das do seu hospedeiro natural, nesse

caso células humanas (Mo et al., 1995; Nichol et al., 2000). Este vem sendo identificado como causador de infecções em humanos e, assim como o próprio hPIV-3, produz infecções assintomáticas (Karron et al., 1996).

O bPIV-3 é um patógeno respiratório associado a broncopneumonia no bovino, sendo um forte candidato para a produção de vacinas atenuadas vivas (Bailly et al., 2000). Tem sido associado com a febre dos transportes e foi, primeiramente, isolado por Andrews et al. (1955), a partir de secreção nasal de bovinos que apresentavam sinais clínicos da doença. O isolamento do bPIV-3 no Brasil, foi registrado pela primeira vez por Candeias et al. (1971), a partir de pulmões de bovinos abatidos em São Paulo. Recentemente, o vírus foi isolado pela primeira vez no Rio Grande do Sul, por Gonçalves et al. (2001), a partir de uma terneira apresentando sinais clínicos de infecção respiratória. Esta amostra foi isolada em cultivo celular e havia sido utilizada em reações sorológicas em um trabalho anterior. Entretanto, a caracterização molecular da amostra ainda não foi realizada, sendo esta de suma importância para a confirmação da origem animal dessa amostra.

2.4. Propriedades físico-químicas dos PIV-3

As condições ambientais, como temperatura, umidade, pH e composição dos meios para estocagem viral, afetam a infectividade dos PIV-3. Seus virions são instáveis à temperatura de 37 °C, sendo inativados em temperaturas superiores a 50 °C por 15 minutos (Zielinska-Jencytyk, 1972). A estabilidade ótima ocorre em pH fisiológico (pH 7,4 a 8,0), perdendo a infectividade rapidamente no pH 3,0 a 3,4 (Hamparian et al., 1963; Hambling,

1964). Quando expostos ao éter 20% por 18h a 4 °C perdem completamente a infectividade (Chanock & Parrot, 1965). A adição de vários reagentes (por exemplo 0,5% de soro fetal bovino (SFB), 5% de DMSO ou 2% soro de galinha) ao meio e estocagem a -70°C garantem a infectividade viral por muitos anos (Hurrell, 1967; Chanock, 1979).

2.5. Organização estrutural dos PIV-3

2.5.1. Virions e envelope

Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que os virions do hPIV-3 e do bPIV-3 são pleomórficos (formas globulares ou filamentosas) e envelopados (**Figura 1**). Seu diâmetro pode variar entre 150 a 250 nm, sendo que virions maiores já foram descritos (Howe et al., 1967). Seu envelope é coberto por peplômeros de 8 a 20 nm de comprimento, sendo sua composição lipídica originária da membrana plasmática das células do hospedeiro (Murphy et al., 1999).

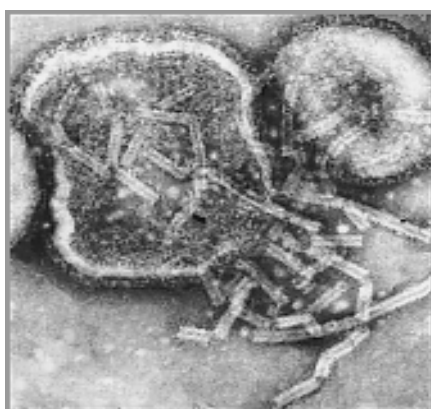


FIGURA 1: Microscopia eletrônica do vírus parainfluenza tipo 3. A forma do vírion é facilmente visualizada.

Fonte: <http://www.tulane.edu> (acesso em fevereiro de 2005).

2.5.2. Nucleocapsídeo

Dentro do envelope, encontra-se um nucleocapsídeo que apresenta simetria helicoidal, com 18 nm de diâmetro e aproximadamente 600 a 800 nm de comprimento. A simetria helicoidal ocorre devido à rigorosa associação do genoma com, aproximadamente, 2600 moléculas de RNA, e a proteína maior do nucleocapsídeo (Lamb et al., 1976). Também contém, aproximadamente, 300 cópias da proteína P (Fosfoproteína) e 40 cópias da proteína L (grande proteína) (Egelman et al., 1989). O nucleocapsídeo tem sido observado em várias formas, podendo apresentar conformação linear e flexível após rompimento do vírion (Compans et al., 1967).

2.5.3 Genoma e genes

O genoma é formado por uma única molécula de RNA de fita simples com aproximadamente 15000 nucleotídeos, de polaridade negativa (Storey et al., 1984). Alguns virions possuem RNA de polaridade positiva e RNA replicativo intermediário, sendo considerados não infecciosos (Collins et al., 1996). O genoma apresenta uma região 3' extra-cistrônica de aproximadamente 55 nucleotídeos denominada líder e uma região 5' extra-cistrônica de aproximadamente 44 nucleotídeos denominada "trailer". A região líder apresenta a maioria dos promotores virais com aproximadamente 13 a 14 nucleotídeos que são altamente conservados entre os vírus da família *Paramyxoviridae*. Estas regiões-controle flanqueiam 6 genes: NP, P/C/D, L, M, F e HN (Lamb & Kolakfosky, 1996), sendo separadas por regiões conservadas e não codificantes, as quais contém sinais de iniciação, terminação e

poliadenilação do processo de transcrição viral (Murphy et al., 1999). Destes, apenas cinco genes (NP, M, F,HN e L) são responsáveis pela síntese de proteínas estruturais do vírion, sendo controlados diretamente nessas regiões. O gene (P) contém uma segunda região controle 5' proximal conhecida como “fase de leitura aberta” (ORF), sobreposta ao gene que codifica a proteína C (Wechster et al., 1985). A organização genômica do PIV-3 é mostrada na **Figura 2**.

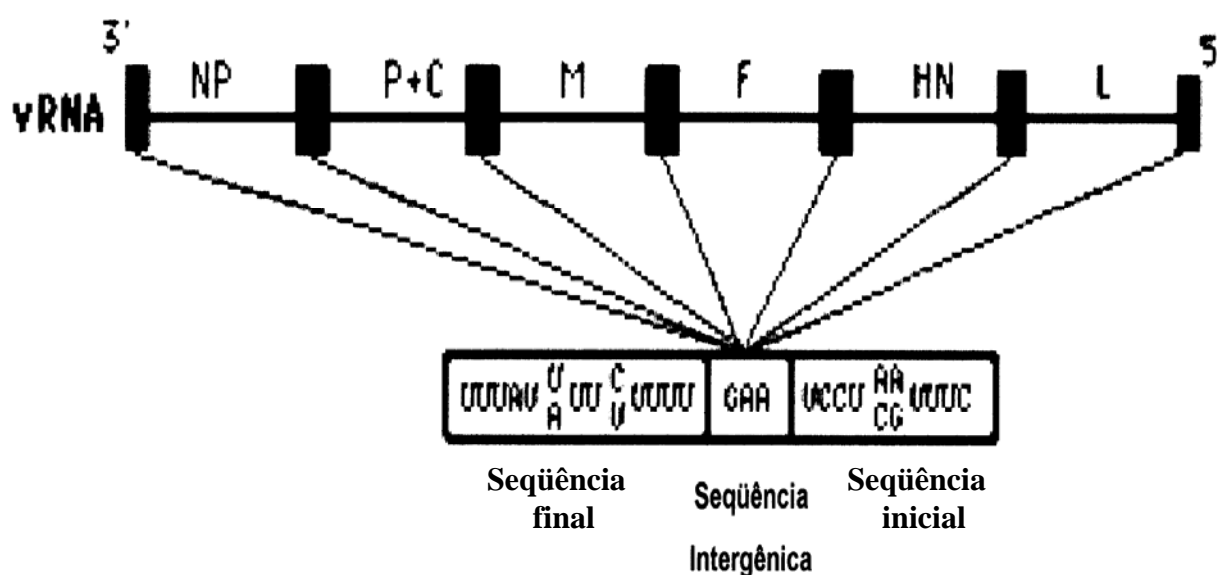


FIGURA 2: Organização genômica do PIV-3. NP: gene do nucleocapsídeo; P e C: gene da fosfoproteína e gene C; M: gene da matriz; F: gene de fusão; HN: gene da hemaglutinina-neuraminidase e L: gene L (adaptado de Collins et al., 1996).

2.5.4. Proteínas

De todas as proteínas que desempenham funções nos PIV-3, as que têm provocado maior interesse e vêm sendo amplamente estudadas são as glicoproteínas estruturais de superfície “HN” (hemaglutinina-neuraminidase) e “F” (proteína de fusão). O interesse pode ser explicado, em parte, devido ao papel central exercido por essas glicoproteínas durante os processos de infecção viral e, no caso da HN, ao seu estado de conservação antigênica (Takimoto et al., 2000). A glicoproteína HN é multifuncional sendo responsável pela ligação dos vírus a receptores de ácido siálico das células hospedeiras (Markwell, 1991), com a neuraminidase (sialidase) exercendo a função de hidrólise dos resíduos de ácido siálico, além de ajudar na prevenção da auto-agregação dos virions (Palese et al., 1974). A HN também é requisitada nos processos de fusão das membranas que são induzidos por outra glicoproteína de membrana, a proteína F (Morrison et al., 1991; Sakai & Shibuta, 1989). Importantes fusões entre as membranas celulares somente são observadas quando as proteínas HN e F do mesmo vírus são expressas nas mesmas células, sugerindo que ocorra uma interação vírus-específica, sendo este processo necessário para induzir a fusão da membrana com a proteína F (Hu et al., 1992). Além disso, a interação física entre HN e F é requerida para uma eficiente fusão (Yao et al., 1997; Stone-Hulslander & Morrison, 1997).

As glicoproteínas HN e F, bem como as outras proteínas constituintes do virion dos PIV-3 podem ser visualizadas de forma esquemática na **Figura 3**.

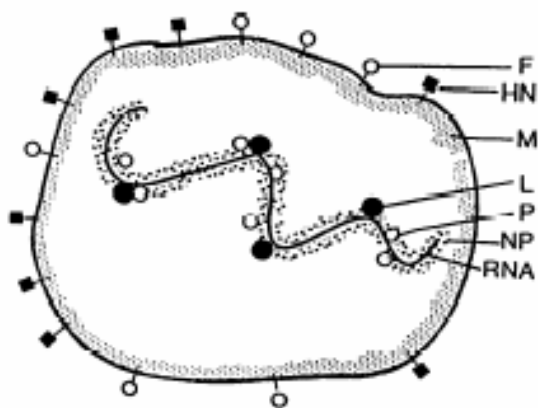


FIGURA 3: Representação gráfica de um virion do gênero *Respirovirus*. F: proteína de fusão; HN: proteína hemaglutinina-neuraminidase; F: proteína de fusão; M: proteína da matriz; NP: proteína do nucleocapsídeo; P: fosfoproteína; L: proteína L ou proteína grande e RNA) genoma fita simples com polaridade negativa (Vainionpää & Hyypiä., 1994).

Estudos de cristalografia têm revelado conformações vesiculares das glicoproteínas virais (**Figura 4**), sendo estas diferentes das conformações que existem quando estão presentes nas membranas celulares (Citovsky et al., 1986).

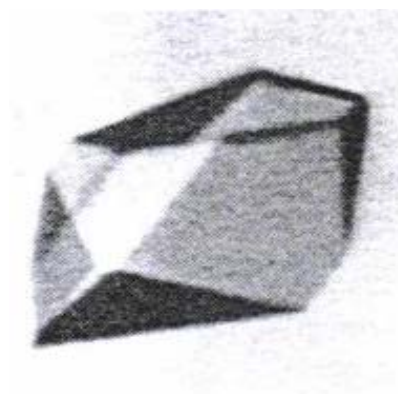


FIGURA 4: Cristalografia da proteína HN em forma de cristal de uma amostra viral de paramixovírus (Takimoto et al., 2000).

Além dessas duas glicoproteínas, HN e F, existem mais quatro proteínas estruturais que, apesar de não serem inteiramente estudadas, são importantes na estruturação dos PIV-3: três proteínas do nucleocapsídeo “NP” (proteína do nucleocapsídeo), “P” (fosfoproteína), “L” (grande proteína) e uma proteína interna não glicosilada “M” (proteína da matriz) (Lamb & Kolakofsky, 1996). Cada proteína apresenta características próprias e desempenha determinada função durante a morfogênese do virion. Um resumo das propriedades dessas proteínas é apresentado na **Tabela 2**.

Outras proteínas, como a V, W, I e X, não são encontradas em todos os gêneros da família *Paramyxoviridae*. A proteína V, que interfere especificamente com a encapsidação do RNA, é um produto do gene P no gênero *Respirovirus*. As proteínas W, I e X têm função ainda desconhecida, sendo a proteína W encontrada somente em algumas espécies dos gêneros *Respirovirus* e *Rubullavirus* (Lamb & Kolakofsky, 1996).

Tabela 2: Características e funções das principais proteínas dos PIV-3

Nome	Resíduos de aa	Características e funções
HN	565 a 582	Componente do vírion (proteína hemaglutinina-neuraminidase). Mediar a ligação do vírus à célula, facilitar a liberação dos virions após o processo de replicação e prevenção da autoagregação do virions; principal antígeno viral capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes; neuraminidase remove o ácido sialico.
F	529 a 565	Componente do vírion (proteína de fusão). Mediar a internalização do vírus na célula, na formação de sincícios é responsável pela atividade hemolítica “in vitro”.
NP	509 a 557	Proteína estrutural do vírion (proteína do nucleocapsídeo). Possui várias funções no ciclo de replicação viral e proteção do RNA.
P	568 a 603	Proteína estrutural do vírion (fosfoproteína). Componente viral do complexo da polimerase, prevenção na agregação de proteínas, interação proteína-proteína durante formação nucleocapsídeo e síntese de RNA.
C	199 a 204	Proteína não estrutural (proteína C). Relacionada ao empacotamento de pequenas quantidades de proteínas associadas ao nucleocapsídeo.
D		Proteína não estrutural (proteína D). Função desconhecida, encontrada apenas no hPIV-3 e bPIV-3.
L	2204 a 2269	Proteína estrutural do vírion (Grande proteína). Proteína multifuncional, executa todos os estágios catalíticos da síntese de RNA e metilação.
M	341 a 377	Proteína estrutural do vírion. (proteína matriz). Possui a função de tornar a transcrição inativa e mediar o empacotamento do nucleocapsídeo e envelope viral.

aa: aminoácidos

2.5.5. Relações antigênicas

Os PIV-3 são antigenicamente e morfológicamente semelhantes. Através da análise de DNA complementar de clones construídos a partir de RNA do bPIV-3 e hPIV-3, foi determinada uma homologia de 89,7% para a proteína M em 5 diferentes cepas virais (Bailey et al., 2000). Em estudos comparativos para a análise da seqüência de aminoácidos da proteína HN de algumas cepas virais, foi comprovado que existiam regiões moderadamente conservadas entre os PIV-3, sendo que a seqüência do bPIV-3 apresentava 77% de homologia com a seqüência da mesma proteína do hPIV-3 (Collins et al., 1996).

2.6. Replicação viral dos PIV-3

A replicação viral dos PIV-3 (**Figura 5**) ocorre no citoplasma das células hospedeiras infectadas, sendo os vírus capazes de multiplicar-se em células anucleadas (Murphy et al., 1999). Os eventos moleculares da replicação dos vírus pertencentes ao gênero *Respirovirus* são regulados por fatores virais e celulares que são determinantes da infecção lítica observada em cultivos celulares, embora esse efeito, em alguns tipos celulares, possa não ser observado. Assim, estes eventos podem ser divididos conforme o modelo proposto por Neumann et al. (2002): 1) Adsorção (ligação do vírus a receptores específicos da membrana celular do hospedeiro); 2) Fusão e penetração; 3) Transcrição, replicação e síntese de RNA e proteínas, respectivamente; 4) Montagem dos nucleocapsídeos e 5) Liberação dos virions.

1) Adsorção

No gênero *Respirovirus*, a fase inicial do processo de infecção ocorre no momento em que a glicoproteína do envelope viral reconhece e liga-se a receptores específicos da membrana celular. Este processo depende exclusivamente da ação de uma glicoproteína presente no envelope viral, a proteína HN, que se liga às moléculas de ácido siálico presentes na superfície das células hospedeiras (Lamb, 1992). O ácido siálico, encontrado na membrana celular, é um derivado do ácido neuramínico encontrado nas proteínas e nos lipídios (Lamb & Kolakofsky, 1996).

2) Fusão e penetração

Após a adsorção do vírus à superfície das células do hospedeiro, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana celular, mediada pela glicoproteína F. Um aumento da eficiência da ativação promotora da fusão do envelope viral com a membrana celular ocorre quando as duas glicoproteínas HN e F agem em cooperação durante esses processos. Após a fusão, o nucleocapsídeo do vírus é liberado diretamente no citoplasma celular (Kingsbury, 1991).

3) Transcrição, replicação e síntese

Os processos de transcrição, replicação e síntese ocorrem no citoplasma das células infectadas (Lamb & Kolakofsky, 1996). Após a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma, as proteínas associadas a ele (NP, P, L)

são ativadas e ocorre sua transcrição pela RNA polimerase RNA-dependente (transcriptase viral) no citoplasma celular (Murphy et al., 1999).

A síntese de mRNAs começa imediatamente após o encontro do genoma viral e os ribonucleosídeos trifosfatados no citoplasma, sendo primeiramente transcritos seis mRNA oriundos dos genes estruturais do vírus com posterior tradução dos mesmos pelos ribossomos da célula. As proteínas virais, acumuladas no citoplasma, são sintetizadas e começa a síntese das fitas de polaridade positiva no citoplasma celular. A RNA-polimerase, previamente presente na síntese do mRNA, copia a fita positiva ignorando todos os códons de parada presente entre os genes, sintetizando uma cópia complementar de RNA idêntica ao RNA genômico (intermediário replicativo). A partir desse instante, ocorre a encapsidação do genoma, simultaneamente com a síntese do genoma. Quando a quantidade de proteína NP diminui, a polimerase troca de função e começa a sintetizar uma quantidade maior de mRNA aumentando, assim, os níveis intracelulares de proteína NP que é essencial durante esse processo (Neumann et al., 2002).

4) Montagem dos nucleocapsídeos:

O RNA viral sintetizado é processado e empacotado primeiramente pelas proteínas do nucleocapsídeo. Posteriormente, as proteínas P e L presentes no citoplasma celular associam-se ao complexo produzindo uma grande quantidade de nucleocapsídeos, que estão prontos para sair das células infectadas. A grande quantidade de nucleocapsídeos forma os corpúsculos de inclusão citoplasmáticos característicos (Lamb, 1992).

5) Liberação dos virions

Os nucleocapsídeos complexados acumulam-se no citoplasma celular até que seja realizada a montagem dos envelopes virais. As proteínas HN e F são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e, após maturação, são transportadas até a membrana plasmática. A proteína M auxilia na condução dos nucleocapsídeos complexados para a formação e liberação dos virions maduros, o que ocorre por brotamento na membrana celular do hospedeiro (Lamb, 1992).

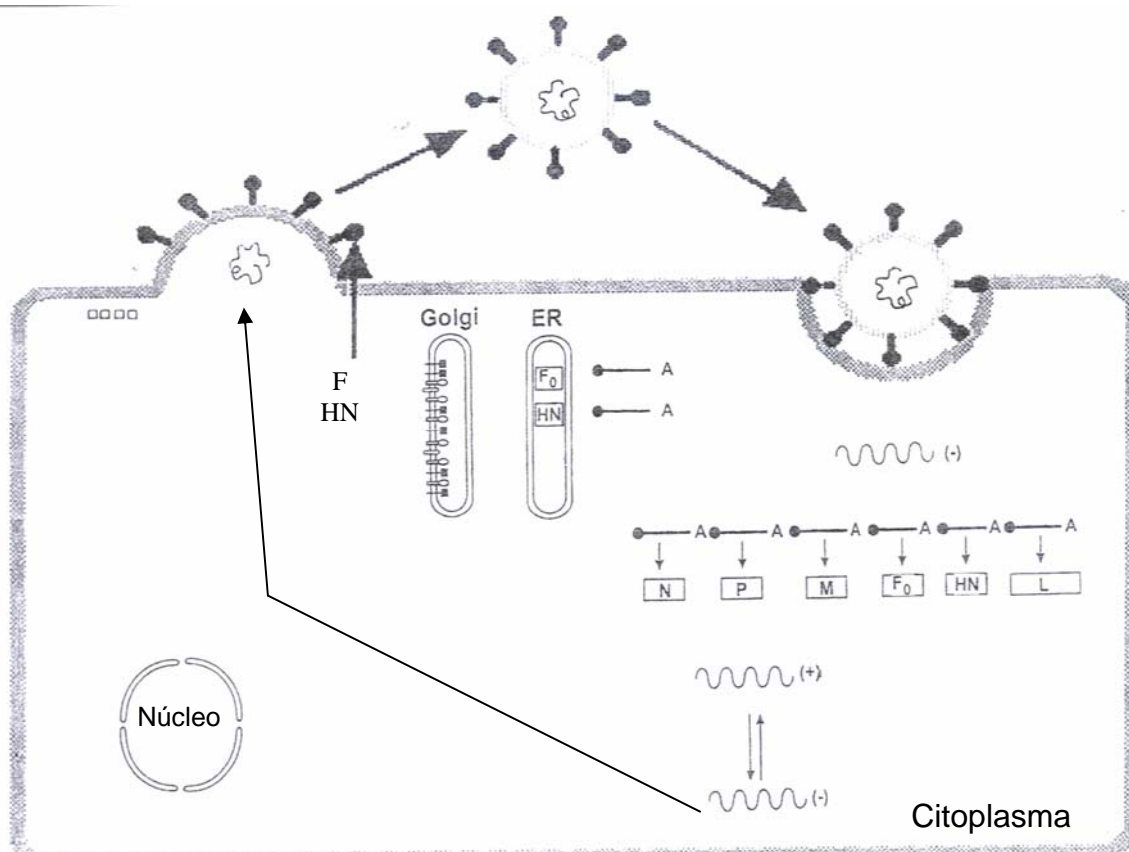


FIGURA 5: Esquema de replicação dos vírus do gênero *Respirovirus* (adaptado de Collins et al., 1996).

2.7. Epidemiologia dos PIV-3

Na América do Norte e na Europa, anualmente, os PIV-3 causam epidemias na primavera e no inverno, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos ou com doenças crônicas. As razões exatas que explicam as diferenças na sazonalidade do PIV-3 ainda continuam desconhecidas, embora seja proposto que estão diretamente relacionadas com as condições climáticas e ambientais (Glezen et al., 1984).

As infecções respiratórias desencadeadas pelos hPIV-3 ocorrem, mundialmente, em recém-nascidos, crianças, adultos e em alguns animais, na maioria das vezes, de forma subclínica e assintomática, sendo o agente etiológico raramente isolado. Acredita-se que os humanos apresentem predisposição às infecções provocadas pelo hPIV-3, estando estas associadas a fatores como idade, mal nutrição, superlotação de ambientes, deficiência de vitamina A, diminuição da amamentação, posição sócio-econômica e até ao aumento de toxinas no ambiente (Berman, 1991, Mcintosh, 1991, Kim et al., 2000; Tsai et al., 2001).

Aproximadamente 18 mil recém-nascidos e crianças são internados todos os anos em hospitais pediátricos nos EUA, vítimas de infecções respiratórias do trato inferior causadas pelo PIV-3. O hPIV-3 está associado, principalmente, às infecções em crianças com até 6 meses de idade, sendo o responsável também por cerca de 40% dos casos de infecções em crianças no seu primeiro ano de vida (Washburne et al., 1992). Nos Estados Unidos, infecções respiratórias agudas são responsáveis por cerca de 3 a 18% dos casos de internação em hospitais pediátricos, sendo as infecções causadas

pelos PIVs detectadas em cerca de 9 a 30% dos casos (Downham et al., 1974, Murphy et al., 1980; Carballal et al., 2001).

Nos EUA, são registrados aproximadamente 800 mil novos casos por ano de infecções do trato respiratório inferior em pacientes com até 18 anos de idade, sendo estimado que 12% dessas infecções sejam provocadas pelos hPIV-3 (Shay et al., 1999). Esta é a segunda maior causa de hospitalização de pacientes pediátricos, ficando atrás somente das infecções provocadas pelo RSV (Straliotto et al., 2002).

Pesquisas sorológicas realizadas em crianças entre 6 e 10 anos de idade demonstraram evidência de infecções passadas, sugerindo que estas eram infecções primárias assintomáticas (Gardner, 1969). No Brasil e no Rio Grande do Sul, existem poucas estudos epidemiológicos publicados, possivelmente devido à falta de interesse pelo hPIV-3 que apresenta baixa ocorrência em nosso meio (1,5%) e, principalmente, pelo interesse dos pesquisadores por outros vírus respiratórios, como RSV, adenovírus e vírus da influenza (Straliotto et al., 2002).

Infecções respiratórias causadas pelo bPIV-3 têm sido reportadas em rebanhos de todo o mundo. Estudos sorológicos antigos realizados nos rebanhos dos EUA revelaram índices de 87,8% de prevalência (Karim et al., 1985). Em outros países, como a Irlanda do Norte e Austrália, foi constatada a presença de infecção em 97,5% (McCullough et al., 1987) e mais de 80% (St. George, 1969) do rebanho desses países, respectivamente. No Brasil, foram verificados índices de prevalência em torno de 80% em nosso rebanho (Candeias & Ribeiro, 1970).

Dos relatos disponíveis sobre a identificação de anticorpos inibidores da hemaglutinação detectados por reações sorológicas, merecem destaque o trabalho realizado por Candeias & Ribeiro (1968) que, usando uma cepa viral de origem humana, identificaram pela primeira vez anticorpos em 33,71% dos soros bovinos de um total de 553 amostras coletadas. Os mesmos autores realizaram estudo similar, porém com uma cepa de origem bovina (SF-4) e encontraram 84,1% de positividade nos soros bovinos testados de um total 902 amostras coletadas (Candeias & Ribeiro, 1970). No Rio Grande do Sul, Wizigmann et al. (1972) constataram a presença de anticorpos em 97% dos soros bovinos de um total de 221 amostras coletadas. Dal Pizzol et al. (1989) detectaram a presença de anticorpos contra o vírus bPIV-3 em 70% dos soros bovinos de um total de 393 amostras coletadas.

Evidências sorológicas apontam, ainda, que o vírus bPIV-3 pode infectar células diferentes das do seu hospedeiro natural (bovinos), neste caso células humanas (Nichol et al., 2000, Mounts et al., 2001; Choudhary et al., 2001). O bPIV-3 vem sendo identificado como causador de infecções em humanos e, assim como o próprio hPIV-3, produz infecções assintomáticas (Karron et al., 1996).

2.8. Transmissão dos PIV-3

A transmissão das viroses provocadas pelo hPIV-3 foi demonstrada em um estudo que avaliou a capacidade de disseminação e a capacidade infecciosa desse agente (Henrickson et al., 1997). Foi demonstrado que aerossóis liberados por crianças infectadas com o vírus hPIV-3 podem

percorrer uma distância de aproximadamente 60 cm e provocar infecção em outro indivíduo (Mc Lean et al., 1967). Sabe-se que a maioria das transmissões em humanos ocorre entre crianças de 2 a 6 meses de idade, de forma semelhante a dos outros PIVs humanos devido, principalmente, à capacidade de disseminação do vírus pelo ar e também pela presença deste em superfícies contaminadas (Henrickson et al., 1998).

Nas superfícies, a transmissão ocorre, na maioria das vezes, pelo contato direto do indivíduo com suas próprias mãos que estão contaminadas. Também pode ocorrer transmissão por meio de contato direto das mãos de pessoa para pessoa (Collins et al., 1996). A transmissão direta via secreções nasais pode ocorrer de pessoa para pessoa, tendo sido demonstrado que a quantidade de vírus presente nessas condições (durante uma infecção aguda) é aproximadamente dez vezes maior que a quantidade presente nas mãos (Hall et al., 1977).

Já o vírus bPIV-3 freqüentemente infecta bezerros de 2 a 8 meses de idades criados em condições intensivas, podendo essa infecção persistir durante muitas semanas (Kapil & Basaraba, 1997). Nessas condições, o ambiente, geralmente, é pouco ventilado e o grande número de animais possibilita a transmissão do vírus bPIV-3 via aerossóis ou pelo contato direto entre animais. Além disso, estes animais ainda podem adquirir infecções secundárias provocadas pelo aumento do número de bactérias no ar, agravando ainda mais o seu quadro clínico (Radostits et al., 1994).

Os vírus hPIV-3 e bPIV-3 são capazes de sobreviver aproximadamente por 10 horas em superfícies não porosas e por 4 horas em superfícies porosas (Brady et al., 1990).

Em experimentos realizados para avaliar a capacidade infectante desses vírus foi comprovado que ao entrarem em contato com os dedos das mãos, eles perdem aproximadamente 90% de infectividade nos 10 primeiros minutos, podendo a contaminação não ser transferida aos outros dedos (Ansari et al., 1991). Estes vírus podem ser eficientemente removidos dos focos de transmissão pela aplicação de detergentes comuns, desinfetantes ou agentes antisépticos (Brady et al., 1990).

2.9. Patogenia e manifestações clínicas dos PIV-3

Os PIV-3 são patógenos responsáveis pelo desenvolvimento de infecções respiratórias em uma variedade de espécie diferentes. Os PIV-3 multiplicam-se nas vias aéreas superiores, apresentando tropismo pelas células epiteliais (ciliadas, não ciliadas e caliciformes), onde parecem ser adsorvidos e liberados mais extensivamente nos domínios apicais e basolaterais dessas células. Além destas, também são encontrados em células alveolares, onde infectam preferencialmente os macrófagos e pneumócitos tipo II (Bryson et al., 1979). Já foram reportadas infecções no tecido nervoso (nervo olfatório) após inoculação intranasal do vírus em camundongos (Mori et al., 1996).

Quando os vírus PIV-3 infectam as células hospedeiras, ocorre uma diminuição na atividade mitótica das mesmas depois de decorridas 24 horas do

contato com o agente. A primeira mudança morfológica observada em culturas de célula de tecidos respiratórios humanos inoculados com o vírus é, geralmente, o arredondamento focal e o aumento do tamanho do citoplasma e núcleo (Craighead, 1968). Outras mudanças que podem ser observadas são a presença de vacúolos citoplasmáticos simples ou multiloculares, inclusões celulares basofílicas ou eosinofílicas e formação de células gigantes multinucleadas (Collins et al., 1996).

Além dessas alterações, estes vírus normalmente provocam apoptose em culturas de células de tecidos respiratórios (He et al., 2001).

A destruição provocada pela infecção no tecido é focal e branda, desaparece rapidamente e pode não ser detectada. Quando branda, na maioria das vezes desencadeia no hospedeiro bronquiolite, bronquite e edemas pulmonares (Carpenter et al., 1998). Uma exceção ocorre em hospedeiros imunocomprometidos, onde a infecção pelo vírus PIV-3 pode desencadear uma forte pneumonia e levar o hospedeiro à morte. A severidade desse tipo de infecção tem sido identificada em crianças e não em adultos (Tremonti et al., 1968).

Em animais imunodeprimidos o vírus bPIV-3 é capaz de causar pneumonia intersticial, afetando o lobo cranial do pulmão. Essas lesões pulmonares podem ser bilaterais, havendo focos de colapso e consolidação do parênquima no lobo crânio-ventral (Kapil & Basaraba, 1997).

Algumas estruturas das células hospedeiras apresentam papel fundamental para a patogenia viral. A actina e o citoesqueleto celular são necessários durante os processos infecciosos, já que estas são utilizadas pelo

PIV-3 na movimentação de suas glicoproteínas pela superfície das células infectadas. Além dessas, os microtubos celulares são necessários para que os vírus PIV-3 tenham uma liberação eficiente após maturação nas células (Bose et al., 2001). Outras estruturas não celulares e que fazem parte do mecanismo de patogenia viral são as glicoproteínas HN e F que tiveram suas funções anteriormente descritas, sendo responsáveis pela fusão do vírus com a membrana celular hospedeira. As fusões apresentam diferentes cinéticas, dependendo exclusivamente da interação vírus-célula e célula-célula após infecção (Moscona & Peluso, 1992).

2.10. Síndromes clínicas dos PIV-3

Os PIV-3 estão sendo associados a síndromes clínicas diferentes que podem ser consideradas como específicas para cada hospedeiro, mas que encontram forte correlação, principalmente, com a idade dos indivíduos infectados.

As mais importantes são: em humanos a laringotraqueobronquite aguda (Crupe), bronquiolite, traqueobronquite e pneumonia e em bovinos a febre dos transportes, bronquiolite, broncopneumonia e abortos.

2.10.1. Laringotraqueobronquite aguda (Crupe)

Aproximadamente, 10 a 25% dos casos de infecção respiratória do trato inferior em crianças com até cinco anos de idade são desencadeadas por essa síndrome (Murphy et al., 1980, Denny et al., 1983, Denny & Clyde, 1986, Henrickson et al., 1994; Linnquist et al., 1997).

Os PIVs humanos têm sido identificados em aproximadamente 56 a 74% do total desses casos, sendo o hPIV-3 responsável em média por mais de 10% das infecções em crianças (Hambling, 1964). Outros vírus que infectam crianças como o RSV, vírus influenza A e B, bem como infecções bacterianas secundárias por *Mycoplasma spp.* podem estar associados com a síndrome (Peltola et al., 2002). Em adultos, o hPIV-3 é o agente etiológico mais fortemente associado à síndrome (Won et al., 2000).

Os principais sinais clínicos encontrados nos indivíduos incluem febre, tosse ou rouquidão, obstrução da laringe e inspiração estridente.

2.10.2. Bronquiolite

Aproximadamente 25 a 30% dos casos de infecção respiratória do trato inferior na infância são diagnosticados como bronquiolite sendo que em 81% dos casos o pico de incidência ocorre no primeiro ano de vida, declinando drasticamente até desaparecer durante a idade escolar. Acreditava-se que menos de 90% dos casos de bronquiolite fossem de origem viral, entretanto alguns trabalhos estimaram que até 83% dos casos de bronquiolite possam ser provocados por vírus (Murphy et al., 1980; Denny & Clyde, 1986).

Destes, o mais comum é o hPIV-3 que é responsável por aproximadamente 10 a 15% das bronquiolites causadas em crianças não hospitalizadas. Os principais sinais clínicos encontrados nos indivíduos incluem febre, respiração ofegante, taquipnéia, retração e criptação (Denny et al., 1983).

2.10.3. Pneumonia

A pneumonia é diagnosticada em aproximadamente 83% das crianças com menos de 5 anos de idade que são hospitalizadas com infecções respiratórias do trato inferior e em 23% dos pacientes não hospitalizados que são tratados. O pico de incidência da pneumonia ocorre no segundo ou terceiro ano de vida. O diagnóstico é realizado clinicamente pelo aparecimento de sinais clássicos como febre e crepitação, além de evidências de consolidação pulmonar em exame físico com raio X (Murphy et al., 1980, Belshe et al., 1983, Jennings et al., 1985, Denny & Clyde, 1986; Kellner et al., 1988).

Em crianças hospitalizadas no primeiro ano de vida, cerca de 90% acabam desenvolvendo pneumonia causada por viroses, sendo o restante dos casos atribuídos a doenças crônicas (Murphy et al., 1981, Korppi et al., 1986, Denny & Clyde, 1986, Nohynek et al., 1991; Hortal et al., 1994).

Essa percentagem diminui para aproximadamente 50% quando crianças com idade escolar são hospitalizadas com suspeita de infecções respiratórias do trato inferior (Jennings et al., 1985, Korppi et al., 1986; Denny & Clyde, 1986).

Em adultos, constatou-se uma diminuição no número de casos de pacientes com sintomas clássicos de pneumonia de etiologia viral, não passando de cerca 12% do total (Greenberg, 1991, Dowell et al., 1996, Drews et al., 1997; Marx et al., 1999). Indivíduos imunocomprometidos podem desenvolver pneumonia, sendo o hPIV-3 o responsável por cerca de 10% dos casos em pacientes hospitalizados (Fiore et al., 1998).

2.10.4. Traqueobronquite

Pacientes com sinais de respiração baixa e sintomas que não se enquadram em nenhuma das três síndromes acima citadas têm o diagnóstico de traqueobronquite. Também são muito comuns sintomas como tosse, grande ruído ao respirar e ronquidão, mas poucos indivíduos ainda podem ter febre. Aproximadamente 20 a 30% das crianças com infecções respiratórias do trato inferior têm o diagnóstico de traqueobronquite. A incidência é inferior nos primeiros cinco anos de vida, mas em crianças com idade escolar e em adolescentes, a traqueobronquite é comumente diagnosticada de maneira uniforme entre os indivíduos e na maioria das vezes apresenta etiologia viral. Em mais de 25% dos casos de traqueobronquiolite, a causa principal é a infecção causada por PIVs, sendo hPIV-3 o mais comumente identificado (Denny & Clyde, 1986).

2.10.5. Febre dos transportes, bronquiolite, broncopneumonia e abortos

Os bPIV-3 apresentam importância considerável no cenário mundial, pois provocam infecções respiratórias assintomáticas nos rebanhos, sendo esta conhecida como febre dos transportes. Este quadro foi primeiramente relatado no hemisfério norte em bovinos estressados devido ao transporte que ocorria em condições climáticas desfavoráveis, além de animais criados de forma intensiva em ambientes pouco ventilados (Kapil & Basaraba, 1997). Os principais sinais clínicos relatados em animais que apresentam quadro clínico de febre dos transportes são tosse, descarga nasal serosa, hipertemia, anorexia, dispnéia, depressão, perda de peso e, em casos mais graves,

pneumonia (Radostits et al., 1994). Nas infecções provocadas pelo bPIV-3 é comum ocorrer associação com outros vírus, como por exemplo, vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e coronavírus respiratório bovino (BRCV) (Kapil & Basaraba, 1997), além de bactérias como *Pasteurella haemolytica* e *Mycoplasma bovirhinis* (Radostits et al., 1994). Quando estes eventos ocorrem, os animais podem apresentar broncopneumonia (Bailly et al., 2000). Em animais inoculados experimentalmente por Kapil & Basaraba (1997), foi observada, após 2 a 4 dias, sintomatologia de bronquiólite, bronquite e a presença de exsudatos celulares no lúmen bronquiolar.

O bPIV-3 também tem sido relacionado a casos de aborto em bovinos (Sattar et al., 1965) devido à sua capacidade de desenvolver lesões nos fetos e induzir a formação de anticorpos nos fetos, após inoculação intra-uterina de algumas cepas virais (Swift & Kennedy, 1972).

2.11. Imunidade contra os PIV-3

Embora a resposta imune das espécies infectadas pelo vírus PIV-3 venha sendo amplamente estudada, foi apenas nas últimas décadas que os pesquisadores compreenderam os mecanismos responsáveis. Antigamente, acreditava-se que a resposta imune celular contra as infecções virais provocadas pelo vírus PIV-3 era mediada basicamente pela ativação do sistema complemento e por células. Estudos *in vitro* comprovavam que os PIV-3 ativavam diretamente os componentes iniciais da cascata do complemento, não necessitando de anticorpos para realizar tais funções. Constatou-se,

assim, que o complemento interagiu diretamente com os receptores das células hospedeiras infectadas pelo vírus e que a neutralização viral direta ocorria devido à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) desencadeado pelo complemento, rompendo os envoltórios virais (Vasantha et al., 1988). Além disso, foi constatado que células importantes nos mecanismos de imunidade celular são utilizadas contra o PIV-3 durante os processo de replicação viral (Liggitt et al., 1985). Destas podemos destacar os macrófagos e monócitos que estão presentes no trato respiratório do hospedeiro, sendo responsáveis pelo controle das infecções bacterianas, além de servirem de células acessórias para a estimulação da proliferação de linfócitos (Abbas et al., 2000).

Atualmente vem sendo demonstrado que, além destas, a defesa do hospedeiro contra as infecções virais provocadas pelo vírus PIV-3 também é mediada pela resposta imune humoral por anticorpos direcionados contra as duas glicoproteínas de superfície HN e F. Indivíduos humanos recém-nascidos apresentam anticorpos neutralizantes contra o vírus, oriundos da amamentação materna, cujo título diminui já nos primeiros seis meses de vida (Kasel et al., 1984; Springs et al., 1987), enquanto que em bezerros a imunidade é adquirida através do colostro e perdida quando os terneiros atingem 2 meses de idade, tornando-os suscetíveis à infecção (Kapil & Basaraba, 1997).

A diminuição do nível sérico destes anticorpos possivelmente seja a causa das infecções em dois terços das crianças já no primeiro ano de vida, desenvolvendo doença sintomática em apenas um terço delas. Infecções recorrentes são necessárias para que o sistema imune do hospedeiro (tanto

humano, quanto bovino) possa desenvolver maior proteção contra o agente. Em humanos o aumento da proteção contra reinfecções ocorre mais rapidamente depois dos três anos de vida, enquanto que nos bovinos a imunidade conferida pela primeira infecção viral não é duradoura, tornando os animais suscetíveis a reinfecções depois de alguns meses (Murphy *et al.*, 1999).

Entretanto, os mecanismos da resposta imune mediados por anticorpos anti-hPIV-3, mais especificamente pela produção da imunoglobulina E (IgE), pode contribuir para o agravamento do quadro clínico da doença em crianças, juntamente, com a produção exagerada de histamina (Welliver *et al.*, 1982). A maior parte das respostas por anticorpos parecem ser mediada por IgG, sendo que 30% de humanos adultos apresentam aumento nos níveis de IgG3, IgG4 e IgA secretória (Julkunen *et al.*, 1985).

Durante ou pouco tempo após uma infecção por hPIV-3 pode ser observada a produção de anticorpos IgM (Van Der Logi *et al.*, 1982). A IgA secretória apresenta um papel importante, mas não definitivo, na proteção contra infecções naturais ocasionadas pelos vírus PIVs (Welliver *et al.*, 1982).

A resposta imune mediada por linfócitos T citotóxicos parece ser também importante no combate a esse tipo de processo infeccioso (Henderson, 1979, Kimmel *et al.*, 1982; Hou *et al.*, 1992), sendo diretamente direcionada contra as proteínas HN, P e NP do vírus (Dave *et al.*, 1994; Cole *et al.*, 1994).

Recentemente, foi demonstrado que células T CD4 e CD8 foram capazes de produzir muitos mediadores inflamatórios, chamados de citocinas.

Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Interferon gamma (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) foram detectados nos pulmões de pacientes infectados pelo vírus hPIV-3. Estas citocinas apresentam a capacidade de diminuir a resposta proliferativa das células Th1, além de ajudar na proteção das mesmas contra a apoptose mediada pelo vírus. O IFN- γ pode dificultar a transcrição primária do PIV-3 da mesma forma que o vírus pode dificultar o caminho dos mediadores das células T, dificultando com isso a expressão de antígenos virais pelo complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC de classe II) (Gao et al., 2001).

2.12. Detecção laboratorial dos PIV-3

2.12.1. Coleta e espécimes clínicos

A coleta dos espécimes clínicos, utilizados para isolamento e diagnóstico das infecções respiratórias causadas pelo PIV-3s, deve ser realizada de preferência durante a fase aguda da doença. O método utilizado para a coleta depende exclusivamente das células que serão utilizadas para o isolamento, do método de diagnóstico empregado, da idade do paciente e do estado geral desse paciente.

Estudos realizados para avaliar os melhores métodos de coleta de espécimes clínicos para fins diagnósticos demonstraram alto índice de recuperação do hPIV-3, após coleta de suabes nasais e aspirados nasais (Hall et al., 1977; Wong et al., 1982), sendo estes espécimes clínicos recomendados para isolamento viral em crianças. Como o vírus PIV-3 replica-se, primeiramente, em células da naso e orofaringe, estas têm sido recomendadas

para a realização do diagnóstico dessas infecções. Além desses espécimes também podem ser utilizados suabes de garganta, suabes nasofaríngeais e lavados nasais (Marks et al., 1971, Hall et al., 1977, Shimokata et al., 1981, Glezen et al., 1984; Frayha et al., 1989).

Para o isolamento viral de bPIV-3 são comumente utilizadas amostras virais de suabes nasais, faríngeais, aspirados traqueais ou lavados pulmonares. Também foram realizados isolamentos virais de amostras retiradas das vias respiratórias durante a necropsia de bovinos (Rebhun et al., 1995).

2.12.2. Diagnóstico virológico de infecções causadas por PIV-3

Inúmeros métodos são empregados para o diagnóstico virológico de infecções causadas por hPIV-3 e bPIV-3, sendo a maior parte deles realizada através do isolamento viral em cultivo celular, pela identificação de antígenos virais sobre secreções ou tecidos de animais (hemaglutinação, imunofluorescência direta e imunoperoxidase), ou ainda no caso do hPIV-3, pelo emprego de métodos moleculares de diagnóstico.

A prova da hemaglutinação (HA) tem sido utilizada há muitos anos como método para detecção da presença de PIV-3s em laboratório, sendo realizada diretamente dos isolados virais presentes na monocamada de cultivos de tecidos na presença de hemácias de cobaio (Canchola et al., 1964, Canchola et al., 1965; Herrmann & Hable, 1970).

A imunofluorescência direta (IFD) tem sido utilizada com sucesso para o diagnóstico virológico rápido das infecções respiratórias causadas pelos

hPIV-3s, quando se busca a identificação de antígenos virais em secreções e tecidos. Este método é mais rápido e seguro comparado ao da HA (Collins et al., 1996).

Outra prova que merece destaque, conhecida como imunoperoxidase (IPX), pode ser utilizada como uma ferramenta de triagem nas suspeitas de contaminação pelos PIV-3s em cultivos celulares, apresentando baixo custo para o laboratório. Até o presente momento, não há estudos mencionando o uso da mesma para os PIV-3. As provas de IFD e IPX são baseadas exclusivamente na ligação antígeno-anticorpo, podendo a sensibilidade e especificidade no caso da IFD, ser teoricamente aumentada quando utilizados anticorpos monoclonais antígeno-específicos (Waner et al., 1985).

Embora um pouco mais demorado que as outras técnicas sugeridas para a realização do diagnóstico rápido das infecções causadas pelos PIV-3s, o isolamento viral continua sendo amplamente utilizado e considerado como padrão-ouro (Warner et al., 1999). Este fornece o diagnóstico conclusivo dessas infecções através da utilização de diferentes linhagens celulares, tendo as células um papel importante na sensibilidade do método. As células mais comumente empregadas são as de linhagem MDBK para fins de isolamento de bPIV-3 e células de linhagem PMK, LLC-MK2 ou Vero para o isolamento de hPVI3 (Hierholzer et al., 1993). A detecção desses vírus em cultivos celulares ocorre pela visualização do efeito citopatogênico (ECP) característico com a formação de sincícios, arredondamento celular e a presença de corpúsculos de inclusão intra-citoplasmáticos. A presença do ECP nos cultivos celulares, após

inoculação viral, varia entre os PIV-3s, sendo necessários aproximadamente três dias para evidenciar o ECP provocado pelo bPIV-3 e até quatro ou cinco dias para algumas cepas de hPIV-3 (Gonçalves et al., 2003; Vainionpää & Hyypiä, 1994).

2.12.3. Diagnóstico sorológico de infecções causadas pelo PIV-3

O diagnóstico sorológico das infecções provocadas pelos PIV-3s é baseado na detecção pareada de anticorpos IgG e IgM, sendo realizado através de técnicas como: ELISA, inibição da hemaglutinação, soroneutralização e, raramente, por radioimunoensaio, Western blot e fixação do complemento (Henrickson, 1991). O desenvolvimento de anticorpos heterólogos durante as infecções provocadas pelos diferentes subtipos de PIVs e outros vírus como o da caxumba produzem reação cruzada em algumas reações sorológicas, dificultando a sua interpretação (Vainionpää et al., 1994). Estes são problemas persistentes e de difícil resolução para o diagnóstico sorológico nos laboratórios (Chanock et al., 1958, Chanock et al., 1958, Lenette et al., 1963; Frankova et al., 1988).

A maioria dos laboratórios, que realiza o diagnóstico sorológico das infecções provocadas por hPIV-3 e bPIV-3, utiliza reações do tipo ELISA (Vuorinen & Meurman, 1989) e a inibição da hemaglutinação (Waner, 1999), respectivamente.

2.12.3.1. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

Atualmente, os ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA têm sido amplamente utilizados no diagnóstico sorológico das infecções causadas pelos PIV-3s. Apresentam alta sensibilidade e especificidade, quando comparados com outras técnicas sorológicas, por exemplo HI, além de serem de fácil execução e possibilitarem o processamento de inúmeras amostras ao mesmo tempo (Assaf et al, 1983). Existem ensaios do tipo ELISA indireto que foram desenvolvidos para o diagnóstico sorológico de hPIVs (Julkunen, 1984; Vuorinen & Meurman, 1989) e para o diagnóstico das infecções causadas por bPIV-3 (Graham et al. 1998; Graham et al, 1999; Gonçalves et al., 2003). Além destes, tem sido reportada a utilização de técnicas de ELISA por competição que proporcionam aumento da especificidade pela utilização de anticorpos monoclonais (Wanner, 1999).

2.12.3.2. Inibição da Hemaglutinação (HI)

A técnica de HI foi descrita por Carbrey (1971), sendo baseada na propriedade de aglutinação de hemácias por certos vírus. Quando anticorpos presentes no soro de amostras reconhecem epítomos da glicoproteína HN presentes no envelope viral dos PIV-3s, ocorre a ligação desse anticorpo com esse antígeno viral. Isto impede que a partícula viral se ligue aos receptores específicos das hemácias para a HN, provocando o fenômeno conhecido como inibição da hemaglutinação. Esta técnica tem sido principalmente empregada para diagnóstico das infecções respiratórias causadas pelo bPIV-3, por se tratar de um método relativamente rápido e barato. Assim como muitos testes

sorológicos, ela pode apresentar reatividade cruzada com anticorpos inespecíficos, sendo necessário que as amostras de soro sejam submetidas a um tratamento prévio com 25% de caolim (Joo et al, 1976).

2.12.3.3. Soroneutralização (SN)

As reações de soroneutralização (SN) detectam somente anticorpos neutralizantes do vírus. São consideradas muito sensíveis para a detecção de anticorpos contra os vírus parainfluenza hPIV-3 (Schmidt et al., 1989). A reação de SN para a pesquisa de anticorpos contra o bPIV-3 foi desenvolvida e utilizada por Kapil & Basaraba (1997). Comparada com a HI ou com ensaios imunoenzimáticos, a SN é mais trabalhosa e muito demorada, pois os resultados definitivos são somente obtidos após seis dias (USDA, 1993).

2.12.4. Diagnóstico molecular

Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a detecção e identificação dos hPVI3. Entre estes, a técnica de RT-PCR vem sendo descrita em vários estudos, que demonstram ser sensíveis e específicos (Karron et al., 1994, Fan, 1996, Freymuth et al., 1997, Eugene-Ruellan et al., 1998; Echevarria et al., 2000).

Entretanto, até o presente momento, não foi desenvolvida uma técnica para o diagnóstico do bPIV-3 por RT-PCR. Como estes vírus são constituídos por um genoma de RNA é necessário que, antes da reação em cadeia da polimerase (PCR), seja feita uma reação de transcrição reversa (RT-PCR), daí essa denominação. Na RT-PCR, para fins de detecção dos hPIV-3,

têm sido utilizados oligonucleotídeos com seqüências mais conservadas dos genes estruturais do hPIV-3 que codificam a proteína Hemaglutinina (HN) (Karon et al, 1994; Fan & Henrickson, 1996) e a proteína de Fusão (Waner, 1999). Existem, atualmente, inúmeras variantes dessa técnica como a RT-PCR multiplex, descrita primeiramente em 1995 e a RT-PCR hexaplex (Fan et al., 1998), capazes de detectar vários agentes virais presentes no mesmo espécime clínico. Estas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade comparáveis às do cultivo celular do vírus (Yao et al., 1997, Henrickson,1998, Fan et al., 1998, Barenfranger et al., 2000; Liolios et al., 2001).

Outros métodos moleculares que utilizam sondas de DNA vírus-específicas para a análise direta de RNA dos PIVs, como as técnicas de Northern e dot blot, estão sendo utilizadas em nível de pesquisa; entretanto, são bastante demoradas e proporcionam resultados menos uniformes e sensíveis, quando comparados a outros métodos com fins diagnósticos (Henrickson et al., 1997).

No Brasil, até o presente momento, não foram desenvolvidos testes moleculares para o diagnóstico de infecções causadas pelo bPIV-3. Assim, no presente trabalho, é descrito o desenvolvimento de uma técnica de RT-PCR capaz de realizar a detecção rápida do bPIV-3, utilizando-se amostras de bPIV-3 e hPV-3 de diferentes procedências.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Estabelecer técnicas moleculares para a detecção e caracterização dos vírus parainfluenza tipo 3, em nosso meio.

3.2. Específicos

- Desenvolver e padronizar uma técnica de RT-PCR capaz de detectar o bPIV-3 e hPIV-3.

- Realizar o seqüenciamento do gene hemaglutinina-neuraminidase (HN) da primeira amostra de bPIV-3 isolada no Rio Grande do Sul e compará-la com outras cepas de bPIV-3 e hPIV-3 disponíveis no GenBank.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

Os experimentos com os vírus bPIV-3 foram realizados no Laboratório de Virologia da FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), enquanto que os experimentos com os vírus hPIV-3 foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS-UFRGS).

4.2. Células

Para multiplicação e titulações viral foram utilizadas células renais de bovino da linhagem "Madin-Darby Bovine Kidney" (MDBK, ATCC, CCL-22). As células MDBK foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo de Eagle (EMEM – GIBCO), suplementado com 8% de Soro Fetal Bovino (SFB; GIBCO) e 0,001% de enrofloxacin (Baytril, Bayer). As células foram tripsinizadas sempre que atingiam 100% de confluência (48-72 horas), segundo métodos usuais (Butler et al., 1992).

4.3. Amostras virais

4.3.1. Amostra referência

Neste estudo, foi utilizada como amostra referência do vírus bPIV-3 a cepa SF-4 (Bailly et al., 2000). Essa amostra foi obtida originalmente do National Veterinary Laboratories Service (EUA), sendo gentilmente cedida pela Dra. Sílvia Sardi da UFBA ao Laboratório de Virologia do IPVDF, após a quarta passagem em células MDBK.

4.3.2. Amostras virais humanas

Para o isolamento e detecção do vírus hPIV-3, foram utilizadas 10 amostras de origem humana que foram gentilmente cedidas pela Ms. Selir Straliozzo (Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul - LACEN-RS). As mesmas foram, previamente, diagnosticadas como positivas para a presença de hPIV-3 por Imunofluorescência direta (Chemicon).

4.3.3. Amostras virais bovinas

Neste estudo, foram utilizadas três amostras de bPIV-3, sendo duas delas, DIO e PG1775, oriundas de secreções nasais de bovinos caracterizadas previamente (Gonçalves et al., 2003; Silva et al., 2002). A terceira amostra, CRIB, utilizada no estudo era oriunda de um cultivo de células inadvertidamente contaminado e isolada no Laboratório de Virologia do IPVDF.

4.3.4 Amostras de outros vírus

Para avaliar a especificidade da técnica de RT-PCR, foram utilizadas duas amostras virais isoladas de aspirados nasais humanos (1 amostra de hPIV-1 e 1 amostra de hPIV-2) identificadas por IFD no LACEN/RS. Também foram utilizadas três diferentes amostras virais: uma amostra vacinal do vírus da cinomose canina (Lederle) gentilmente cedida pelo Laboratório VETSUL, uma amostra de herpesvírus bovino tipo-1 (BHV-1) (LA), gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Balcarce, Argentina e uma do vírus da influenza eqüina (H2N2) gentilmente cedida pela Dr(a). Marilda Siqueira da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ).

As amostras virais utilizadas estão listadas na **Tabela 3**.

4.4. Isolamento viral em cultivos celulares

Placas de cultivo celular de 6 poços contendo monocamadas de células MDBK (com 90% de confluência após 24 horas de cultivo) foram inoculadas com volumes de 50 μ L/poço de cada espécime viral. As células foram cultivadas em meio EMEM – (GIBCO) sem soro fetal bovino e 0,001% de enrofloxacina (Baytril, Bayer). Na mesma placa, foram incluídos, como controles, cultivos onde não foram inoculadas amostras virais. Depois de inoculadas, as placas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ por 72 horas até que fosse evidenciado o efeito citopático (ECP). A leitura das placas foi realizada em microscópio invertido (NIKON – TMS - Japan). Quando os cultivos apresentavam cerca de 90 % de ECP, as placas foram congeladas por 1 hora a –70 °C e depois descongeladas. Os sobrenadantes foram coletados e 1mL de cada amostra foi

clarificada por centrifugação (Multispeed Refrigerated Centrifuge PK 121R - ALC) a 2000 x g por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e separados em tubos contendo 1mL cada e estocados a -70 °C.

Tabela 3 – Relação das amostras virais utilizadas neste estudo, com a espécie clínica, local e ano de isolamento.

Identificação	Espécime clínico	Vírus	Método de Triagem	Local / Ano
DIO ^a	Secreção nasal de bovino	bPIV-3	HA	RS-Brasil, 2002
PG1775 ^b	Secreção nasal de bovino	bPIV-3	HA	GO-Brasil, 2002
CRIB ^a	Cultivo celular	bPIV-3	HA	RS-Brasil, 2003
VR 01 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 03 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 04 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 45 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 281 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 321 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 353 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 357 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 359 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
VR 364 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-3	IFD	RS-Brasil, 2002
hPIV-1 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-1	IFD	RS, Brasil 2002
hPIV-2 ^c	Aspirado nasal humano	hPIV-2	IFD	RS, Brasil, 2002
Lederle ^d	Vacina	CCV	IPX	RS, Brasil
EIV ^e	Cepa referência	EIV	RT-PCR	RJ, Brasil
LA ^f	IBR	BHV	PCR	Balcarce, Argentina

a – Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul / RS, Brasil

b – Amostra isolada no IPVDF, proveniente do município de Nova Caxias / GO, Brasil

c – Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN / RS)

d – Laboratório VETSUL

e - Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ)

f – Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Balcarce, Argentina

4.5. Estoques virais

A amostra referência, bem como as amostras anteriormente isoladas dos vírus bPIV-3 e hPIV-3, tiveram seus estoques obtidos por passagem em cultivo celular. Células de linhagem MDBK com 24 horas de cultivo celular apresentando 90% de confluência foram inoculadas com 300 μ L de cada amostra viral, com multiplicidade de infecção entre 0,1 e 1,0 doses infectantes, sendo incubadas a 37°C por 72 horas ou até que o efeito citopatogênico (ECP) fosse evidenciado com 90% de destruição da monocamada celular. Os sobrenadantes obtidos foram coletados e clarificados por centrifugação (Multispeed Refrigerated Centrifuge PK 121R - ALC) a 2000 x g por 20 minutos, sendo sobrenadante resultante do centrifugado coletado em um tubo e estocado a -70°C.

4.6. Titulação viral

Os estoques virais foram titulados segundo o método descrito por Carbrey et al. (1971), adaptado para microplacas. Em placas de 96 poços foram distribuídos 50 μ L/poço de cada amostra viral diluída de 10^{-1} a 10^{-7} em meio EMEM sem soro, em quadruplicata. Em seguida foram aplicados 50 μ L de uma suspensão contendo de $1 - 2 \times 10^4$ células/poço, sendo as placas incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas, até que fosse evidenciado o ECP por microscópio invertido de contraste de fase (NIKON – TMS - Japan). Foi determinado como título, a recíproca da maior diluição onde foi ainda observada a presença de ECP. Os títulos foram expressos em DICC₅₀ por poço.

As amostras virais também foram tituladas pela técnica de Hemaglutinação (HA) e as amostras do bPIV-3 submetidas à técnica de Imunofluorescência Direta (IFD).

4.7. Hemácias de cobaio

Para o teste de hemaglutinação (HA), foram coletadas, por punção intracardíaca, hemácias de cobaio em solução de Alsever. As mesmas foram lavadas por três vezes em PBS pH 7,2 e diluídas 1:120 em PBS-BSA 0,1% pH 7,4, segundo descrito por Gonçalves et al. (2003). As especificações do método e o preparo das soluções encontram-se no **item 9.1**.

4.8. Teste de hemaglutinação (HA)

Para a técnica de HA, foi utilizada como controle de antígeno a amostra referência, primeiramente titulada em triplicata (1:16), além do controle de hemácias. Em microplacas de fundo em "V" foram realizadas diluições seriadas (à base 2) da amostra viral (a partir da diluição 1:2) em PBS-BSA 0,1% pH 7,4. Hemácias de cobaio, previamente lavadas e diluídas a 1:120 em PBS-BSA 0,1% pH 7,4, foram acrescentadas à placa, sendo estas incubadas por 60 minutos a 37°C, conforme descrito por Gonçalves et al. (2003). Os títulos das amostras virais, em unidades hemaglutinantes (UHA), foram expressos como a recíproca da maior diluição que causou hemaglutinação completa nas hemácias de cobaio (Fao, 1990).

4.9. Estabilidade do bPIV-3

Após a titulação, três criotubos contendo cada um aproximadamente 2,0 mL da amostra referência foram utilizados para testar a estabilidade do vírus bPIV-3 frente a diferentes condições de temperatura de estocagem. Estes criotubos foram estocados às temperaturas de 4°C, -20°C e -70°C durante sete dias consecutivos. As amostras estocadas a -20°C e -70°C foram descongeladas em banho-maria (BIOPAR) a 37°C durante 3 minutos e, juntamente com a amostra viral da geladeira, foram tituladas em células e pela técnica de HA como descrito nos **itens 4.6 e 4.8**, respectivamente.

4.10. Teste de imunoperoxidase (IPX)

Para a padronização da IPX foram cultivadas, em garrafas plásticas de 25 cm³, células MDBK em EMEM (GIBCO) suplementado com 8% de SFB (GIBCO). As células foram tripsinizadas sempre que atingiam 100% de confluência (cerca de 48 horas) e sua concentração ajustada para 1-2 x 10⁵ células com EMEM (GIBCO) suplementado com 5% de SFB (GIBCO). Em microplacas de 96 orifícios de fundo "U" foram inoculados 50µL da amostra viral de referência com concentração de 10^{4,75} DICC₅₀ por poço. Posteriormente foram adicionados 50 µL/poço de células previamente tripsinizadas, seguido de incubação em estufa a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ por 72 horas ou até que fosse evidenciado 50% de ECP na monocamada celular. Depois de verificada a presença de ECP, o sobrenadante foi desprezado e a microplaca secada em estufa a 37°C. Posteriormente, a microplaca foi congelada a - 70°C por 1 hora, descongelada por 10 minutos à temperatura ambiente e fixada com 50 µL/poço de

paraformaldeído 4 % (**item 9.1**) durante 10 minutos. A microplaca foi lavada por três vezes com 100 µL/poço de PBS/Tween-20 (**item 9.1**), sendo adicionados 50µL/poço do “pool” de soros bovinos contendo anticorpos contra bPIV-3 (gentilmente cedido pelo Dr. Franz Rijsewijk da ID-Lelystad, Lelystad, Holanda). Este soro foi testado nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:1500 em solução de diluição (**item 9.1**). Foram adicionados 50 µL/poço de cada diluição do soro bovino e a placa incubada a 37 °C por 1 hora. Após três lavagens com 100 µL/poço de PBS/Tween-20 foram adicionados 50 µL/poço de um conjugado contendo anti-IgG de bovino desenvolvido em carneiro testado nas diluições de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 em solução de diluição, sendo a microplaca incubada nas mesmas condições anteriormente citadas. Após a incubação foram realizadas mais três lavagens conforme descrito acima, acrescentando-se 50µL/poço da solução de revelação (**item 9.1**), sendo a microplaca incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, a solução de revelação foi desprezada, a placa seca à temperatura ambiente, sendo a leitura realizada em microscópio invertido (NIKON – TMS – Japan) com aumento de 100X.

Para a padronização da técnica de IPX foram escolhidas as diluições finais para o soro bovino positivo de 1:1000 e para o conjugado anti-IgG de carneiro de 1:400. A sensibilidade foi avaliada pela diluição da amostra referência SF-4 em triplicata, como descrito no **item 4.6**, apresentando título viral de $10^{4,25}$ DICC₅₀. Para realização desse experimento, foi utilizado como controle negativo células não inoculadas.

Para avaliar a especificidade, foram inoculadas diferentes amostras virais em células MDBK conforme descrito acima. Utilizou-se quatro amostras

virais de herpesvírus bovino (EVI 99, EVI 88, EVI 100 e EVI 123), uma amostra viral de herpesvírus de búfalo (BuHV 16), ambas isoladas pela equipe do Laboratório de Virologia do IPVDF, uma amostra viral de BVDV (Singer) e uma amostra vacinal do vírus da cinomose canina (Lederle). Para realização desse experimento, foram incluídos como controle positivo à amostra referência e como controle negativo, células não inoculadas.

4.11. Teste de Imunofluorescência Direta (IFD)

A técnica foi realizada conforme descrito por Gonçalves et al. (2003), com modificações. Utilizando-se garrafas plásticas de 25 cm³, células MDBK foram cultivadas em EMEM (GIBCO) suplementado com 8% com SFB (GIBCO). As células foram tripsinizadas sempre que atingiam 100% de confluência (cerca de 48 horas) e sua concentração ajustada para 1-2 x 10⁵ células com EMEM (GIBCO) suplementado com 5% SFB (GIBCO). Nas placas de 6 orifícios com fundo em chato foram colocadas lamínulas estéreis (24 x 24mm) e adicionados 200 µL/poço de células e 800 µL/poço de EMEM (GIBCO) sem SFB. As células foram incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. A seguir foram inoculados 50µL das amostras virais dos isolados de bPIV-3 com concentrações de aproximadamente 10^{5,0} DIC₅₀, sendo a placa incubada nas mesmas condições por 72 horas, ou até que fosse evidenciado 50% do ECP na monocamada celular. Visualizada a presença de ECP, os sobrenadantes da placa foram desprezados e os cultivos fixados com 10 µL/poço de acetona, à temperatura ambiente por 10 minutos. Após, a placa foi lavada por três vezes com PBS 0,01M pH 7,6 durante 10 minutos à temperatura ambiente. Foram

acrescentados, então, à placa, 20 µL/lamínula do conjugado monoclonal específico contra bPIV-3 marcado com isotiocianato de fluoresceína (Central Veterinary Agency, Weybridge, UK). Foi utilizado conjugado diluído a 1:5 em PBS 0,01M pH 7,6, conforme recomendado pelo fabricante. Após a adição do conjugado, a placa foi incubada em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C. Após desprezar-se o conjugado foram realizadas três lavagens com PBS 0,01M pH 7,6. A seguir, a placa foi lavada com água destilada e adicionada de 25µL/ lamínula de glicerina tamponada com PBS 0,01M pH 7,6. A lâminula foi submetida à leitura em microscópio de fluorescência com iluminação por lâmpada de halogênio (Axiolab, Carl Zeiss). Para realização da técnica foram incluídos como controle positivo à amostra referência e como negativo, células não inoculadas. Foram consideradas positivas na IFD as amostras que apresentaram padrão citoplasmático de fluorescência característico dos bPIV-3 e negativas as que não apresentaram este padrão quando comparadas com os controles positivo e negativo.

4.12. Técnica de Transcrição Reversa - Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

4.12.1. Seleção e síntese dos oligonucleotídeos

As seqüências previamente publicadas dos genes que codificam a proteína de fusão (F), a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a proteína grande (L) da amostra referência (cepa SF-4) e de outros bPVI3 e hPIV-3, obtidas no GenBank (nr. AF178655, AF178654, D84095, NC001796, ABO12132, M21649 e Z11575), foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W - Versão 3.0

(Thompson et al., 1994) (**Anexo I**). Os oligonucleotídeos degenerados foram selecionados utilizando-se o programa VECTOR NTI - Versão 4.0 (InforMax, Inc.) e analisados nos arquivos de genoma viral do NIH (National Institute of Health, Bethesda, EUA) – BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Os oligonucleotídeos degenerados foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (USA), em uma escala de síntese de 50 nmol para cada oligonucleotídeo (**Tabela 4**).

TABELA 4: Oligonucleotídeos iniciadores usados para o seqüenciamento do gene HN do bPIV-3.

Oligonucleotídeo	Localização dos nucleotídeos ^a	Seqüência (5' →3') ^b	Referência
P1 (+)	6661-6682	GCCRTATRTACTRACAAAYARA	Deste estudo
P3 (+)	7088-7108	ACAAGYRCTTCTYYACAATTCAG	* Stokes et al., 1992
P4 (-)	7607 – 7625	TCATCAACTTTYKGGYWGTTG	* Echevarría et al., 1998
P5 (+)	7487 – 7508	ACTYRTAAAYYTCYRGACYTYRGTAC	* Echevarría et al., 1998
P6 (-)	8076 – 8096	GTAATTTYRCTYRTGCCAATTG	* Storey et al., 1987
P7 (+)	7940 – 7960	ATYYATTGTTGTTGAYYAAAGGC	* Echevarría et al., 1998
P8 (-)	8373 – 8393	GTTGTATATYSCAGCTGYRYRAG	Deste estudo
P9 (+)	8382 – 8403	CTGSATATAACAACAARYTG	Deste estudo
P10 (-)	8690 - 8711	ACKATAGGAGARTTRAGGTGAC	Deste estudo

(+) Oligonucleotídeo direto e (-) oligonucleotídeo reverso

* Oligonucleotídeos adaptados

^a Localização dos nucleotídeos foi baseada na seqüência do gene completo do bPIV-3, cepa SF-4

^b **K**= T/G, **R**= G/A, **S**= C/G, **Y**= T/C, **YK**= T/G, **YR**=A/G, **YS**=G/C, **YY**=C/T.

4.12.2. Estratégia de amplificação

Para o seqüenciamento completo do gene HN do vírus bPIV-3 (amostra DIO) foram selecionados nove oligonucleotídeos iniciadores, sendo um 3', chamado de P4, comum a dois fragmentos dos 5 amplicons esperados.

Visando a amplificação da primeira região que codifica o gene da proteína HN, foi desenvolvido um oligonucleotídeo direto degenerado chamado de P1, que foi selecionados a partir da extremidade final não codificante do gene da proteína F do vírus bPIV-3 e um oligonucleotídeo reverso degenerado chamado de P4 que flanqueia uma região que codifica o gene da proteína HN.

Para a segunda região amplificada foi selecionado um oligonucleotídeo direto degenerado P3 que flanqueia uma região anterior à posição onde o P4 foi selecionado no gene que codifica a proteína HN. O P4 citado anteriormente foi utilizado como oligonucleotídeo reverso para essa reação de amplificação.

Para a amplificação da terceira região, foi selecionado um oligonucleotídeo direto degenerado chamado de P5, anterior ao P4, e um oligonucleotídeo reverso degenerado chamado de P6.

Para a quarta região foi desenvolvido um oligonucleotídeo direto degenerado chamado de P7, anterior ao P6, e um oligonucleotídeo reverso degenerado chamado de P8.

Finalmente, para a amplificação da quinta região foi selecionado um oligonucleotídeo direto degenerado chamado de P9 e um oligonucleotídeo reverso degenerado chamado de P10. Para esta amplificação final, não há sobreposição com a região anterior porque o P9 está praticamente na mesma posição do P8 no gene da HN, porém no sentido 5'. O oligonucleotídeo P10 foi

selecionado a partir da extremidade inicial não codificante do gene da proteína L. Estas estratégias foram utilizadas devido às dificuldades encontradas para selecionar oligonucleotídeos na região inicial e final do gene da HN e pela ausência de regiões conservadas entre os vírus bPIV-3 e hPIV-3. Também foi utilizada a estratégia de sobreposição das regiões amplificadas, que proporcionam maior segurança na análise dos fragmentos seqüenciados. Um esquema da estratégia de amplificação dos diferentes fragmentos do gene da HN do vírus bPIV-3 é encontrado na **Figura 6**.

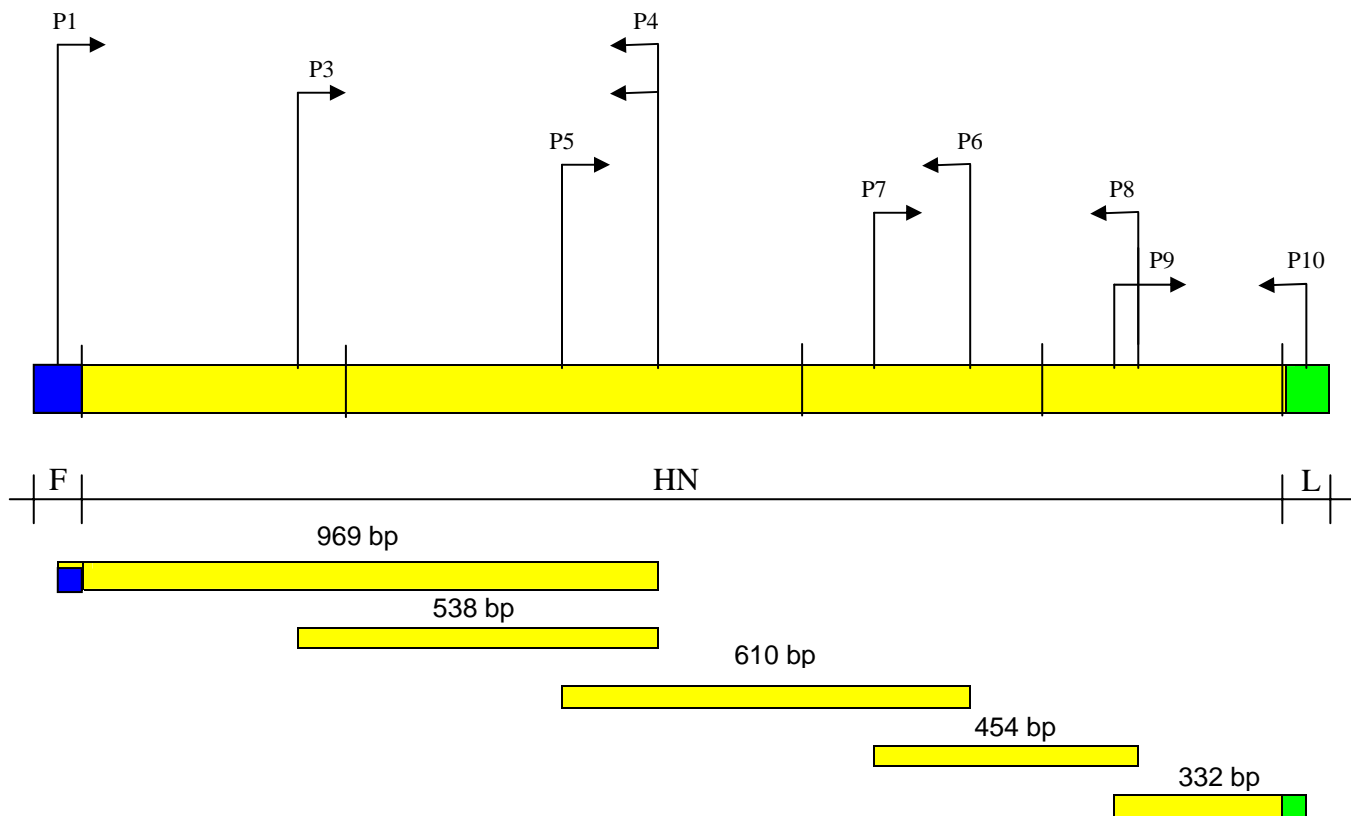


FIGURA 6: Estratégia de amplificação dos fragmentos para o seqüenciamento completo do gene da hemaglutina-neuramidase (HN) do vírus bPIV-3 amostra DIO.

Para o desenvolvimento da técnica de RT-PCR, visando a detecção do vírus bPIV-3 e hPIV-3 e sua caracterização molecular por seqüenciamento direto dos fragmentos amplificados, foi utilizado como oligonucleotídeo direto degenerado o P3 e como oligonucleotídeo reverso degenerado o P6, como visualizado anteriormente na **Tabela 4**. Esses oligonucleotídeos apresentam pequenas alterações em seus nucleotídeos quando comparados com oligonucleotídeos descritos para o vírus hPIV-3, como os publicados por Storey et al. (1987) e Stokes et al. (1992). Na **Figura 7**, pode ser visualizado o esquema da estratégia de amplificação do fragmento do gene da HN para a detecção dos vírus bPIV-3 e hPIV-3 por RT-PCR.

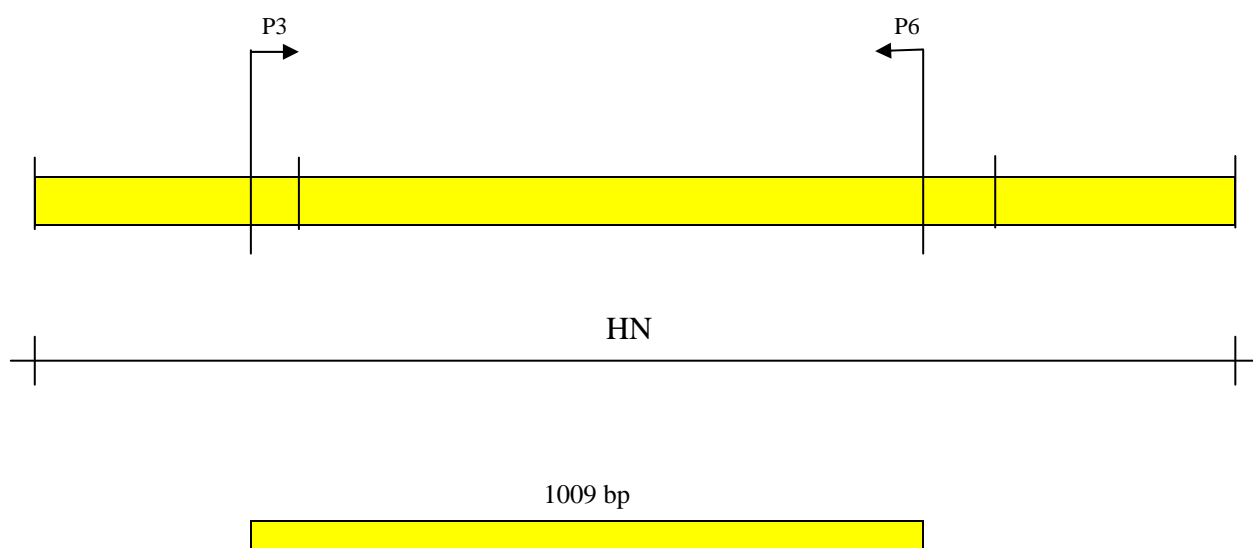


FIGURA 7: Estratégia de amplificação do fragmento do gene da hemaglutina-neuraminidase (HN) para detecção e seqüenciamento direto de amostras do vírus bPIV-3.

4.12.3. Extração e precipitação de DNA viral

Para os testes de especificidade dos oligonucleotídeos da técnica de RT-PCR com fins diagnósticos, foi utilizado o DNA extraído da amostra de herpesvírus bovino tipo 1 (BHV). Amostra do vírus apresentando título igual a 10^5 DICC₅₀ foi inoculada em células MDBK, cultivadas em garrafas de 75cm². Após evidenciar cerca de 100% do ECP nas células, o conteúdo da garrafa foi coletado e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e centrifugado novamente a 7000g x por 20 minutos. Após, o sobrenadante ser coletado, foi realizada nova centrifugação (Sorval) a 100.000g x por duas horas a 4°C para concentração do vírus, através de um colchão de sacarose a 25%. Posteriormente, o material sedimentado foi ressuspendido em 200µL de TNE pH 7,4 (**item 9.1**). Após, foram adicionados novamente 200µL de TNE duas vezes concentrado (**item 9.1**). O material foi incubado em tubo de microcentrífuga com 2µL de proteinase K (20 mg/mL) e 1% de SDS por 1 hora a 37°C. Após a incubação, o material foi submetido a extração com um volume igual de fenol (pH 8,0) e adição de NaCl para uma concentração final de 0,3M. O material foi homogenizado durante 30 minutos e centrifugado a 12000g x por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada uma extração com clorofórmio, sendo o material homogenizado durante 3 minutos e centrifugado a 12000g x por 3 minutos. A seguir, o material foi precipitado com etanol absoluto a -70 °C durante uma hora, sendo centrifugado a 12000g x por 20 minutos. O etanol foi removido e ao precipitado resultante foi adicionado o mesmo volume de etanol 70% e centrifugado a 12000g x por 10 minutos. O sobrenadante final foi removido, sendo o tubo invertido sobre um papel absorvente por 3 a 5 minutos à

temperatura ambiente até que não fosse observado mais nenhum resíduo de álcool. O precipitado de DNA foi então solubilizado em 30 μ L de água estéril e, quando não utilizado a seguir, foi armazenado a – 20 °C.

4.12.4. Extração do RNA viral

Para a extração de RNA da amostra referência do vírus bPIV-3 (SF-4), amostra DIO, amostras que foram utilizadas nos testes de especificidade e as amostras testadas na técnica desenvolvida de RT-PCR para detecção dos bPIV-3 e hPIV-3, utilizou-se 500 μ L de cada material estocado após o isolamento viral conforme **item 4.5**. Em tubo de microcentrífuga, foram adicionados um volume de 500 μ L de Trizol (Invitrogen™ Life Technologies, USA), sendo o conteúdo homogeneizado em “vortex” e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, e após nova homogeneização em “vortex”, o tubo foi centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm à temperatura de 10°C (Multispeed Refrigerated Centrifuge PK121R - ALC). A fase aquosa foi isolada e adicionada de 500 μ L de isopropanol (MERCK), sendo centrifugada posteriormente por 15 minutos a 15000 rpm, a 10°C. Os sobrenadantes foram desprezados e, ao precipitado de RNA, foram adicionados 500 μ L de etanol 75%, seguido de centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm, a 10°C. Os sobrenadantes foram desprezados novamente e os precipitados secados ao ar por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os precipitados foram ressuspensos em 10 μ L de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

4.12.5. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, adicionou-se ao volume anterior 1 μ L de oligonucleotídeo reverso específico para cada fragmento com concentração de 10 pM (P4, P6, P8, P10) e 1 μ L de dNTPs (10 mM) (Invitrogen™ Life Technologies, USA). Um μ L do oligonucleotídeo P6 foi utilizado para a síntese de cDNA das amostras testadas na técnica RT-PCR, juntamente com 1 μ L de dNTPs (10 mM) (Invitrogen™ Life Technologies, USA). Após desnaturação por 10 minutos a 70°C, os tubos foram resfriados no gelo durante 1 minuto. As amostras contendo RNA total anteriormente desnaturado foram centrifugados brevemente, incubados por dois minutos a 37°C e a eles adicionados 8 μ L da mistura da RT que continha: 4 μ L de tampão 5X (250 mM Tris- HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂), 2 μ L de DTT (0,1 M) e 1 μ L de Inibidor Recombinante de Ribonuclease – RNaseOUT™ (40unidades/ μ L) (Invitrogen™ Life Technologies, USA). Os tubos foram incubados por 2 minutos a 37°C e em seguida adicionados de 200 unidades de Transcriptase Reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Invitrogen™ Life Technologies - USA), sendo incubado por 50 minutos a 37 °C. As reações foram inativadas deixando-se os tubos por 15 minutos a 70 °C, conforme instruções do fabricante.

4.12.6. Amplificação

4.12.6.1. RT-PCR para o seqüenciamento do gene da HN do bPIV-3 amostra DIO

Visando o seqüenciamento do gene HN do vírus bPIV-3 da amostra DIO, foram realizadas 5 diferentes reações de amplificação. A amostra referência foi utilizada como controle positivo. As amplificações foram realizadas em termociclador Thermal Reactor Hybaid™ com um volume final de 50µL. Para cada reação foram utilizados: 5µL de tampão de PCR 10x, 5µL de cloreto de magnésio (50mM), exceto para o fragmento 1, quando utilizou-se 4µL, 1µL de deoxirribonucleotídeo trifosfatado (10mM) (Invitrogen™ Life Technologies, USA), 1µL de oligonucleotídeo direto (10pM), 1µL de oligonucleotídeo reverso (10pM) e 0,4µL *Taq* DNA polimerase (5U/µL -Invitrogen™ Life Technologies, USA). Para as amplificações do gene da HN do bPIV-3, foram utilizadas as seguintes condições de amplificação com variações apenas nas temperaturas de anelamento: uma desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos para todos os fragmentos, seguida por 35 ciclos de uma seqüência: 94°C por 1 minuto para desnaturação, 42°C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos dos fragmentos 1 e 3, 72°C por 1 minuto para extensão da *Taq* DNA polimerase e uma extensão final para a polimerase a 72°C por 7 minutos. Para os fragmentos 2, 4 e 5 foram utilizadas as mesmas condições de amplificação anteriormente descritas, exceto para as temperaturas de anelamento que foram de 44°C por 1 minuto, 46°C por 1 minuto e 48 °C por 1 minuto, respectivamente.

A **Tabela 5** mostra os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesta primeira parte do estudo e o tamanho dos fragmentos esperados, expressos em pares de bases (bp).

TABELA 5: Pares de oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho dos fragmentos amplificados por PCR, expressos em pares de base.

Pares de oligonucleotídeos	Fragmento (bp)
P1 – P4	969 bp
P3 – P4	538 bp
P5 – P6	610 bp
P7 – P8	454 bp
P9 -P10	332 bp

4.12.7. Otimização da técnica de RT-PCR para a detecção do bPIV-3 e hPIV-3

Para averiguar a eficiência da técnica de RT-PCR foram realizados, testes de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

4.12.7.1. Sensibilidade

A sensibilidade da técnica de RT-PCR foi determinada por dois procedimentos diferentes:

1) Após titulação da amostra referência e isolamento do RNA viral a partir das respectivas diluições

Para determinar a sensibilidade da técnica de RT-PCR, foi realizada uma titulação da amostra referência SF-4 em cultivo celular, conforme descrito anteriormente no **item 4.6**. Aproximadamente, 500 μ L de cada diluição seriada restantes da titulação (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) foram utilizados para a isolamento de RNA viral e síntese de cDNA, conforme descrito nos **itens 4.12.4 e 4.12.5**. Posteriormente, os cDNA sintetizados a partir das respectivas diluições foram quantificados, como descrito no **item 4.12.11** e utilizados na técnica de RT-PCR para tentar amplificar o fragmento do gene da HN da amostra referência, nas mesmas concentrações dos reagentes e condições descritas posteriormente no **item 4.12.8**. Os fragmentos amplificados do gene da HN resultantes de cada diluição por esta técnica foram visualizados conforme descrito abaixo no **item 4.12.9**.

2) Após diferentes diluições do cDNA com concentração conhecida

A outra maneira utilizada para avaliar a sensibilidade da técnica de RT-PCR foi a partir de diferentes diluições do cDNA da amostra referência SF-4 em água estéril (1:1 a 1:10, 1:100: 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:20000). Este cDNA possuía título viral e concentração conhecidos. Após a realização das diluições da amostra de cDNA, estas foram submetidas à técnica de RT-PCR na tentativa de amplificação dos fragmento do gene da HN da amostra referência, nas mesmas concentrações dos reagentes e condições descritas posteriormente no **item 4.12.8**. Os fragmentos amplificados do gene da HN resultantes de cada diluição detectados por esta técnica foram visualizados conforme descrito abaixo no **item 4.12.9**.

4.12.7.2. Especificidade

Para os testes de especificidade da RT-PCR visando o seqüenciamento do gene da HN do bPIV-3 (amostra DIO), foram utilizadas as seguintes amostras de vírus RNA: amostra referência, amostra DIO, amostra do vírus parainfluenza tipo 1 humano hPIV-1, parainfluenza tipo 2 humano hPIV-2, amostras vacinais do vírus da cinomose canina e vírus influenza eqüino. Estas amostras foram submetidas a extração de RNA viral e síntese de cDNA, com os devidos oligonucleotídeos conforme descrito nos **itens 4.12.4 e 4.12.5**. Uma amostra de herpesvírus bovino tipo-1 (BHV-1), foi submetida à extração de DNA viral conforme descrito no **item 4.12.3**. Posteriormente, estas amostras foram analisadas pelas diferentes técnicas de RT-PCR, na tentativa de amplificação dos diferentes fragmentos, nas mesmas concentrações dos reagentes e condições descritas no **item 4.12.6.1**.

Para os testes da especificidade da RT-PCR que visam a detecção do bPIV-3 e hPIV-3 e que utiliza o par de oligonucleotídeo P3/P6, foi avaliada com as amostras acima descrita, além das amostras de bPIV-3 (PG1775 e CRIB). Depois de submetidas ao isolamento viral e síntese de cDNA com o oligonucleotídeo P6 conforme descrito nos **itens 4.12.4 e 4.12.5**, as amostras foram analisadas pela técnica de RT-PCR, na tentativa de amplificação do fragmento de 1009 bp, nas mesmas concentrações dos reagentes e condições descritas abaixo no **item 4.12.8**. Os fragmentos amplificados do gene da HN detectados nas técnicas de RT-PCR foram visualizados conforme descrito abaixo no **item 4.12.9**.

4.12.7.3. Reprodutibilidade

Para verificar a reprodutibilidade da técnica, foram utilizadas a amostra referência, amostra DIO, amostra PG1775, amostra CRIB e duas amostras do hPIV-3 (VR45 e VR281). Estas amostras foram submetidas ao isolamento viral e síntese de cDNA conforme descrito nos **itens 4.12.4 e 4.12.5**. Estas amostras foram analisadas pela técnica de RT-PCR na tentativa de amplificação do fragmento do gene da HN, sendo testadas em cinco dias diferentes com as mesmas concentrações dos reagentes e condições descritas abaixo no **item 4.12.8**.

4.12.8. RT-PCR para detecção de bPIV-3 e hPIV-3

Visando a detecção dos vírus bPIV-3 e hPIV-3 e sua caracterização molecular por seqüenciamento direto desses fragmentos, foi utilizado um volume final de 50 μ L de reação. As seguintes condições de reação foram utilizadas: 5 μ L de tampão 10x de PCR específico para a enzima, 4 μ L de cloreto de magnésio (50 mM), 1 μ L de deoxirribonucleotídeo trifosfatado (10mM) (InvitrogenTM Life Technologies, USA), 1 μ L oligonucleotídeo direto P3 (10 pM), 1 μ L oligonucleotídeo reverso P6 (10 pM) e 0,4 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L -InvitrogenTM Life Technologies, USA). As seguintes condições de amplificações foram utilizadas: inicialmente uma temperatura de 96°C por 2 minutos para desnaturação da dupla fita de DNA, seguida de uma seqüência de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 44°C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos, 72°C por 1 minuto para atividade extensora da *Taq* DNA polimerase, sendo essa seqüência repetida

por 35 vezes, seguida de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Para este par de oligonucleotídeos iniciadores, o fragmento amplificado esperado foi de 1009 bp.

4.12.9. Eletroforese em gel de agarose

Para avaliar os resultados da síntese de cDNA, ampliações dos fragmentos do gene da HN por RT-PCR e clivagens, foi utilizada eletroforese horizontal em gel de agarose (Sambrook et al., 1989). Para os fragmentos amplificados, foi utilizado gel de agarose 1,0% e para os produtos de digestão enzimática, gel de agarose 1,5%, ambos em tampão TAE (Trisma-Base-SIGMA-St. Louis – Missouri). A eletroforese foi realizada também com TAE a 76 Volts por 40 minutos. Após a eletroforese, os géis foram submersos em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL). O resultado da eletroforese foi visualizado em um transiluminador (WHITE/UV) com luz ultravioleta (UV).

4.12.10. Purificação dos produtos de PCR

Para purificação direta dos fragmentos amplificados nas RT-PCR que foram enviados para o seqüenciamento, utilizou-se o kit PureLink™ (Invitrogen™ Life technologies – USA). Para o fragmento (P7/P8) que apresentou um produto de amplificação inespecífico, utilizou-se o kit GFX (Amersham Biosciences), após eletroforese e retirada do fragmento de interesse de um gel de agarose de 0,7%, como recomendado pelo fabricante.

4.12.11. Quantificação de DNA

Os produtos obtidos pelos processos de extração, purificação e amplificação foram quantificados tanto por análise visual, comparando-se com um padrão de massa molecular, como por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV). Para os produtos amplificados foram utilizados como padrão de massa molecular de 100 bp, *DNA Ladder* de 1kb Plus ou *DNA Ladder* de 1 Kb (Invitrogen), dependendo do fragmento de interesse, em gel de agarose 1% (Invitrogen). Para controle dos produtos purificados para seqüenciamento foi utilizado um padrão de baixa massa molecular de 100 bp (GIBCO (GRAND ISLAND, NY, USA)). Para a análise espectrofotométrica foi utilizada uma diluição de 1:500 de cada preparação de DNA em volume total de 500 μ L, que foi colocada em cubeta de quartzo (Sigma Spectrophotometer Cuvet-UV/VIS), sendo a leitura realizada no comprimento de onda 260 nm com espectrofotômetro Ultrospec® II (LKB Biochrom LTD). Para o cálculo da concentração foi considerada a proporção padronizada de que 1 UA (unidade de absorbância) de uma solução de ácidos nucléicos a 260 nm equivale a 50 μ g de DNA por mililitro de solução (Sambrook, 1989).

4.12.12. Clivagem dos produtos de PCR purificados com enzima de restrição

Após purificação e quantificação dos fragmentos de interesse foram realizadas clivagens a uma temperatura de 30°C por 1 hora, conforme instruções do fabricante. A enzima utilizada foi *Nco I* (Invitrogen) na concentração de 10 U/ μ L. Todo o produto digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no **item 4.12.9**.

4.13. Seqüenciamento

O seqüenciamento direto dos produtos da PCR purificados foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) e Laboratório Weinmann Ltda, utilizando-se o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados por PCR utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-NNNNNNNNNNNNNNN-3' e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 55°C por 5 seg e 60°C por 4 minutos. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95°C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz"*.

4.14. Análise dos produtos da PCR após seqüenciamento

Todas as seqüências parciais de DNA viral, exceto o fragmento 1 da amostra DIO, obtidas após duas repetições do seqüenciamento de cada fita foram submetidas a um BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para averiguar o grau de homologia das mesmas com a amostra referência Genbank (número de acesso AF178655) nos arquivos do genoma do vírus do NIH (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Estas seqüências também foram comparadas com a amostra referência e com outras amostras de bPIV-3 e hPIV-3, individualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e titulação viral

A provável presença de vírus nas amostras foi inicialmente evidenciado pela produção do efeito citopático (ECP) característico em células MDBK infectadas pelo bPIV-3 (**Figura 9**).

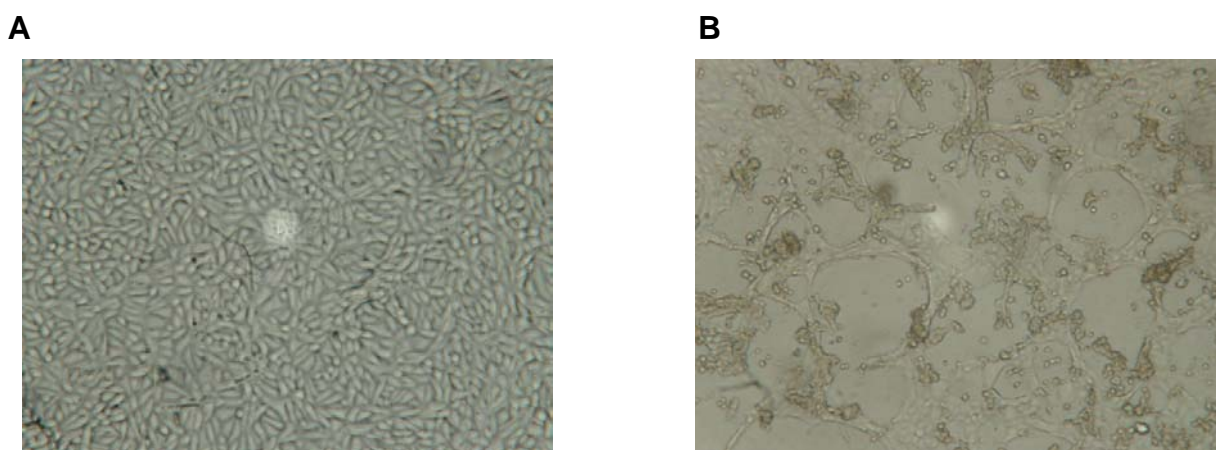


FIGURA 9: Aspectos morfológicos das células MDBK não infectadas (A) e infectadas pelo vírus bPIV-3 (B) em aumento de 100x. O efeito citopático (ECP) característico dos PIV-3 (arredondamento celular, formação de sincícios e inclusão citoplasmática) pode ser observado em B.

Nas amostras analisadas de bPIV-3 (DIO, CRIB, PG1775) o ECP em células MDBK foi evidenciado entre a terceira e quarta passagem viral. Para as amostras de hPIV-3 (VR01, VR03, VR04, VR45, VR281, VR321, VR353, VR357,

VR 359 e VR 364) foi evidenciada a presença de ECP na segunda passagem em células MDBK.

Algumas linhagens celulares foram descritas como susceptíveis à infecção pelos vírus parainfluenza tipo 3, dentre elas as linhagens de rim fetal bovino (MDBK) para o bPIV-3 e (LLC-MK2, HEp-2 e Vero,) para o hPIV-3 (Murphy et al., 1999; Waner et al., 1999). As células MDBK foram utilizadas neste estudo para o isolamento de todas as 13 amostras testadas, pelo fato de já terem sido relatados isolamentos anteriores do bPIV-3, utilizando esta linhagem celular. Além disso, as condições ideais para o cultivo do vírus foram descritas em estudos anteriormente (Candeias et al., 1971, Bailly et al., 2000; Gonçalves et al., 2001). Embora existam trabalhos que relatam o isolamento viral do hPIV-3 principalmente na linhagem celular LLC-MK2 (Fan et al., 1998; Corne et al., 1999), as células MDBK mostraram-se bastante susceptíveis à infecção pelo hPIV-3, uma vez que das dez amostras de origem humana utilizadas no estudo, todas foram isoladas nessas células. Este fato sugere que essa linhagem celular pode ser utilizada para realização do diagnóstico definido por isolamento viral em cultivo celular no laboratório em casos de falta de uma linhagem adequada para esta finalidade. O ECP característico foi observado neste estudo, sendo evidenciado dentro de 3 a 4 dias após inoculação viral para as amostras bovinas e 4 a 5 dias após inoculação viral com amostras humanas, conforme descrito por Corne et al. (1999). Este foi claro e característico com a presença de células arredondadas, inclusões citoplasmáticas e formação de sincícios progressivos que resultavam em morte celular e destruição do tapete celular. Características semelhantes são comumente encontradas em muitas linhagens celulares que

podem estar contaminadas com o PIV-3, mas o ECP característico acaba passando despercebido em muitos laboratórios devido ao desconhecimento do mesmo por alguns virologistas. A causa mais provável desta contaminação seria o soro fetal (SFB). Procura-se fazer com que os vírus tiveram um baixo número de passagens, uma vez que o número alto de passagens poderia vir selecionar mutações no material genético do vírus interferindo nos resultados (Collins et al., 1996), principalmente no seqüenciamento do gene da HN da amostra DIO. Com isso, os títulos produzidos em cultivo celular acabaram sendo relativamente baixos, com exceção das amostras bovinas (DIO, CRIB e PG1775) e a amostra humana VR281 que apresentaram títulos mais altos. Os resultados das titulações são apresentados na **Tabela 6**, sendo expressos em doses infectantes para 50% dos cultivos celulares ($DCCI_{50}$).

Tabela 6. Resultados obtidos na titulação das amostras multiplicadas em células MDBK dos bPIV-3 e hPIV-3.

Amostra	Identificação	Título em $DCCI_{50}$
bPIV-3	DIO	$10^{5,25}$
	CRIB	$10^{4,75}$
	PG1775	$10^{6,0}$
hPIV-3	VR01	$10^{2,25}$
	VR03	$10^{2,50}$
	VR04	$10^{3,25}$
	VR45	$10^{3,50}$
	VR281	$10^{4,25}$
	VR321	$10^{3,75}$
	VR353	$10^{3,50}$
	VR357	$10^{2,25}$
	VR359	$10^{2,50}$
	VR364	$10^{2,75}$

5.2. Reação de hemaglutinação (HA)

Na **Figura 10** são apresentados os resultados obtidos nas reações de hemaglutinação (HA) para a amostra referência SF-4 e amostras do bPIV-3, segundo Fao (1990). A amostra referência apresentou título de 16 unidades hemaglutinantes por 50 μ L (UHA/50 μ L), sendo utilizada como controle positivo para as reações dos isolados virais que foram testados. As amostras de bPIV-3 (DIO, CRIB, PG1775) apresentaram títulos de 16, 8 e 32 unidades hemaglutinantes por 50 μ L (UHA/50 μ L), respectivamente. Para as amostras de hPIV-3 (VR01, VR03, VR04, VR45, VR281, VR321, VR353, VR357, VR359 e VR364) foram observados títulos de 2, 2, 4, 4, 8, 4, 4, 2, 2, 2 unidades hemaglutinantes por 50 μ L (UHA/50 μ L), respectivamente.

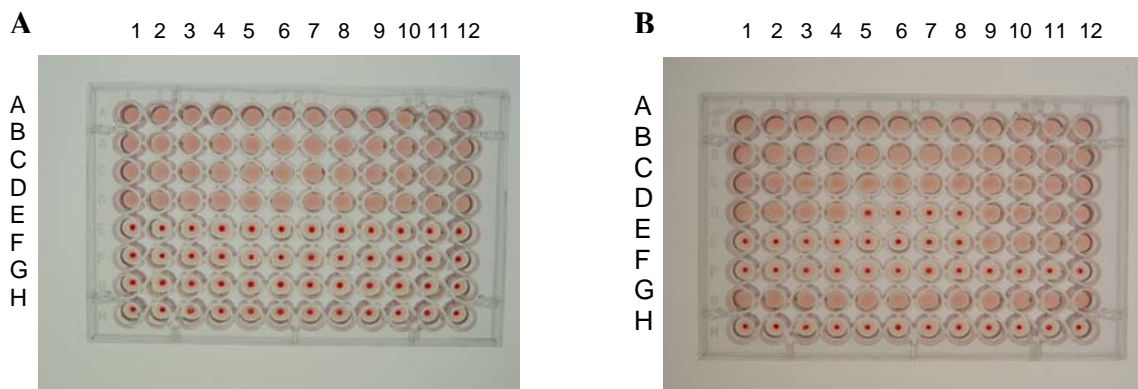


FIGURA 10. Resultados obtidos na reação de hemaglutinação (HA) para amostras de bPIV-3. A) Amostra referência SF-4 em triplicata (1 a 12) com título de 16 UHA/50 μ L e controle de hemácias (H – 1 a 12). **B)** amostras DIO (1 a 4) com título de 16 UHA/50 μ L, CRIB (5 a 8) com título de 8 UHA/50 μ L e PG1775 (9 a 12) com título de 32 UHA/50 μ L. Controle positivo, amostra referência (G – 1 a 12) e controle de hemácias (H – 1 a 12).

Os resultados dos títulos hemaglutinantes das amostras dos bPIV-3 e hPIV-3, obtidos através da reação de hemaglutinação variaram de 2 a 32 utilizando hemácias de cobaio. Gonçalves et al, (2003), obtiveram títulos semelhantes para as amostras referência e amostra DIO do bPIV-3. As amostras de hPIV-3 apresentaram títulos hemaglutinantes relativamente baixos quando comparados com as amostras bovinas, mas isso não inviabilizou o isolamento do RNA viral dessas amostras. Assim, ficou constatado que as partículas virais infecciosas presentes nessas amostras apesar de estarem com baixos títulos hemaglutinantes e no cultivo celular podem ser utilizadas com sucesso para o cumprimento dos objetivos propostos no estudo.

5.3. Estabilidade do bPIV-3

Na **Tabela 7**, são mostrados os resultados da estabilidade da amostra referência SF-4, com título inicial conhecido ($10^{4,75}$ DICC₅₀), quando a mesma foi submetida a diferentes condições de armazenamento. Os títulos da amostra são expressos em DICC₅₀, para o cultivo celular e em UHA/50 μ L para HA. As titulações foram realizadas durante sete dias consecutivos.

Os resultados observados abaixo para a estabilidade da amostra referência, cepa SF-4 condizem com os resultados sugeridos por Zielinska-Jencytik (1972). O experimento realizado neste estudo diferenciou-se em parte dos realizados pelos autores anteriormente citadas, uma vez que foram realizados congelamentos e descongelamentos das amostras durante dias consecutivos, até que o título não pudesse ser mais evidenciado. Isso proporcionou uma maior perda de infectividade viral, devido à destruição de virions presentes na amostra.

Entretanto, observou-se que as amostras do PIV-3 mantiveram-se estáveis quando armazenadas a 4°C e em freezer a -70°C, perdendo sua infectividade rapidamente quando armazenadas a -20°C. Constatou-se que o título das amostras virais armazenadas em ambas as temperaturas manteve-se nos primeiros dias após os congelamentos e descongelamentos, decrescendo progressivamente com o passar dos dias. Quando armazenadas em a -20°C, constatou-se um decréscimo acentuado dos títulos comparados com as amostras armazenadas a 4°C e -70°C até o sétimo dia, quando não foi observado título na amostra. Segundo, Henrickson & Savatski (1997), os vírus armazenados nessa temperatura apresentam perda de mais de 90% de sua capacidade infecciosa. Entretanto, quando armazenados a -70°C, são capazes de apresentar uma boa taxa de infectividade mesmo quando armazenados durante muitos anos.

Os resultados dos testes de hemaglutinação (HA) também sugerem que os títulos hemaglutinantes da amostra armazenada a -20°C não podem ser mais determinados, a partir do quinto dia após armazenamento. Por utilizar inoculação viral em cultivo celular, não foi surpresa que a técnica de titulação viral detectasse a presença de virions, ainda no sexto dia, nas amostras armazenadas a -20°C fato não ocorrido na HA. Isso demonstrou que a titulação viral em cultivo celular pode ser considerada como um método mais confiável que a HA.

TABELA 7. Resultados dos testes de estabilidade obtidos por cultivo celular (DICC₅₀) e HA (UHA/50 μ L). Utilizou-se a amostra referência SF-4 após ser estocada em 3 diferentes temperaturas (4°C, -20°C, -70°C).

Dia	SF-4 (4°C)		SF-4 (-20°C)		SF-4 (-70°C)	
	Título	HA	Título	HA	Título	HA
1 ^o	10 ^{4,75}	16	10 ^{4,75}	16	10 ^{4,75}	16
2 ^o	10 ^{4,50}	16	10 ^{3,50}	8	10 ^{4,75}	16
3 ^o	10 ^{3,50}	8	10 ^{3,25}	4	10 ^{4,50}	16
4 ^o	10 ^{3,25}	4	10 ^{3,00}	4	10 ^{4,25}	8
5 ^o	10 ^{3,00}	4	10 ²	0	10 ^{4,25}	8
6 ^o	10 ^{2,75}	4	10 ^{1,00}	0	10 ^{4,00}	8
7 ^o	10 ^{2,50}	2	0	0	10 ^{3,75}	4

5.4. Imunoperoxidase (IPX)

Na **Figura 11**, é mostrado o resultado da técnica de IPX para a detecção de bPIV-3 após inoculação viral em cultivo com células MDBK. O padrão característico de coloração citoplasmática foi observado na amostra referência SF-4 utilizada na técnica como controle positivo, bem como nas amostras testadas de bPIV-3 (DIO, CRIB, PG1775). O controle negativo não apresentou coloração citoplasmática.

A imunoperoxidase (IPX) tem sido descrita como um método fácil e rápido para diagnosticar doenças infecciosas causadas por agentes virais (Soliman et al., 1997). Esta vem sendo amplamente empregada para detecção de anticorpos contra uma variedade de vírus como: herpesvírus bovino, vírus da síndrome respiratória em suínos e circovírus. Até o presente momento, não existem relatos na literatura sobre utilização dessa técnica para detecção do

bPIV-3 presente em cultivo celular. Portanto, foi desenvolvida uma IPX para triagem dos bPIV-3 em cultivo celular. O bPIV-3 é um dos principais responsáveis pela contaminação de cultivos celulares (Hay et al., 1991), além de nanobactérias e micoplasma (Ciftcioglu et al., 2002; Uphoff et al., 2005) Acredita-se que a fonte da contaminação seja o soro fetal bovino (SFB) que, mesmo estéril e inativado, apresenta algumas partículas virais com capacidade infecciosa. Se presente, o bPIV-3 pode provocar contaminação de linhagens celulares susceptíveis, tendo seu título aumentado a medida que são realizadas passagens em células. Esta contaminação passa despercebida na maioria das vezes nos laboratório de virologia, devido ao pouco conhecimento do ECP característico do vírus por parte de alguns profissionais. A IPX desenvolvida neste estudo, utilizou soro hiperimmune e um anticorpo conjugado anti-IgG de carneiro que foram primeiramente titulados. A diluição ideal para o soro hiperimmune foi de 1:1000 e para o anticorpo conjugado anti-IgG de carneiro de 1:400. Nos resultados da especificidade da técnica utilizando soro hiperimmune e o anticorpo conjugado anti-IgG de carneiro não foi visualizada a ocorrência de reações de coloração citoplasmática com nenhuma das cepas utilizadas para esta finalidade. A técnica de IPX foi capaz de identificar a presença do agente viral até a quarta diluição da amostra referência, onde as células apresentavam ainda uma coloração avermelhada intensa. Contudo, o cálculo da sensibilidade ainda deve ser avaliado, uma vez que a técnica da IPX utiliza mais de um anticorpo para a detecção viral, não podendo assim ser comparada com a IFD vendida comercialmente. Todas as três amostras de bPIV-3 testadas foram positivas na IPX, confirmando os resultados da IFD para as três amostras de bPIV-3. Apesar de parecer específica e sensível, a IPX

apresenta algumas desvantagens já descritas quando comparada com outras técnicas, como por exemplo, o ELISA indireto, apresentando quantificação visual e alto background. Assim, a interpretação dos resultados necessita de pessoa qualificada. Contudo, a IPX vem sendo considerada uma ótima técnica de triagem viral por ser bastante barata para implementação em laboratórios (Houben et al., 1997).

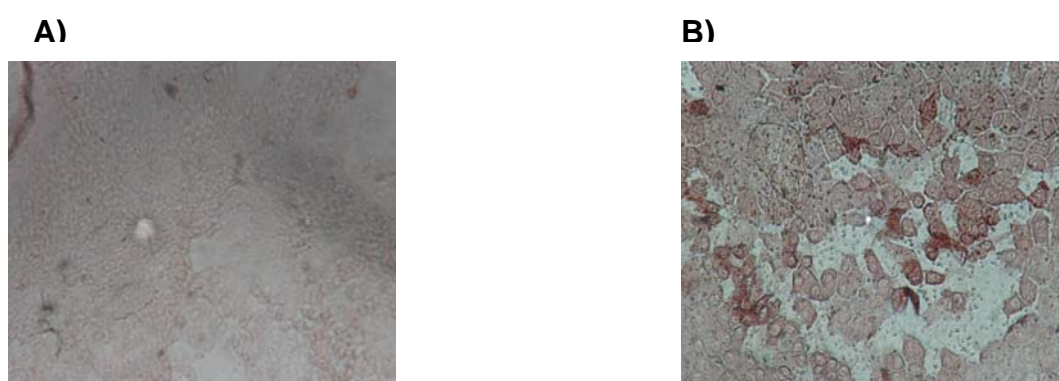


FIGURA 11. Resultado da técnica de imunoperoxidase (IPX) para a detecção do vírus bPIV-3 após cultivo em células MDBK. A) Controle negativo; B) Padrão citoplasmático de coloração observado com a amostra SF-4 e nas de bPIV-3. Aumento de 400 X.

5.5. Imunofluorescência direta (IFD)

A detecção direta de antígenos virais pela utilização do método IFD vem sendo comumente empregado para o bPIV-3 e hPIV-3 em espécimes clínicos oriundos de aspirados nasais e suabes nasais. Diversos kits comerciais padronizados são vendidos no mercado, constituídos de anticorpos monoclonais para o vírus (Eugene-Ruellan et al., 1998; Gonçalves et al., 2003). A IFD foi considerada um método bastante rápido e satisfatório para a detecção viral do

bPIV-3 apresentando boa especificidade. Quando comparados com outros métodos como o ELISA, tem sido reportada uma menor sensibilidade da mesma. Neste estudo, podem ser observados na **Figura 12** um exemplo do padrão fluorescência citoplasmático encontrado nos resultados obtidos na técnica de IFD para a detecção do bPIV-3, após inoculação viral em cultivo com células MDBK. O padrão de fluorescência citoplasmático pode ser observado na amostra referência utilizada na técnica como controle positivo, bem como as amostras testadas de bPIV-3 (DIO, CRIB, PG1775). O controle negativo não apresentou fluorescência citoplasmática nas células, validando assim a técnica.

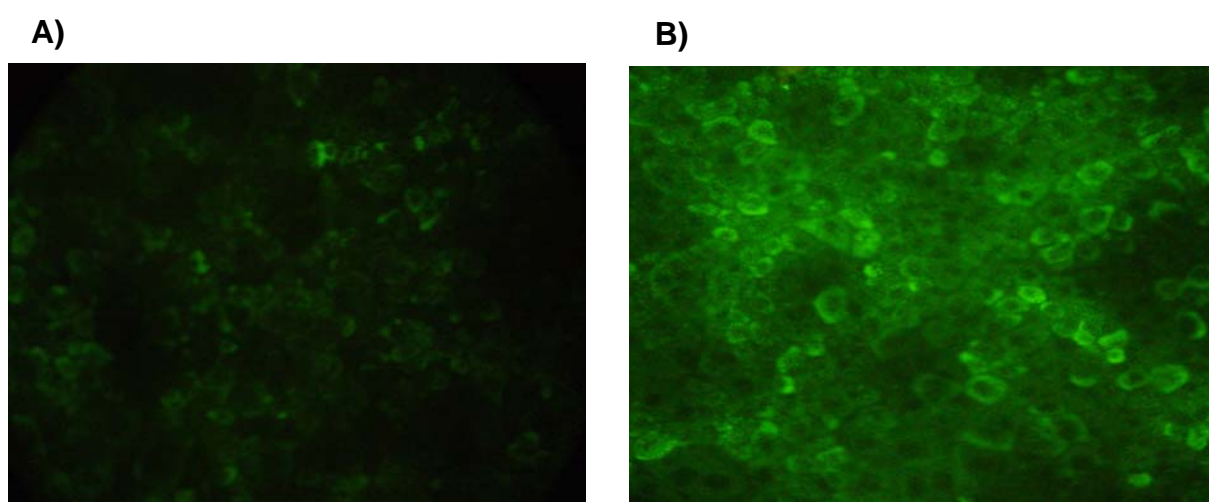


FIGURA 12. Resultado da técnica de IFD para a detecção de bPIV-3 após cultivo em células MDBK. A) Controle negativo; B) Padrão citoplasmático de fluorescência observado com a amostra SF-4. Aumento de 400X.

5.6. RT-PCR

5.6.1. Seleção de oligonucleotídeos e estratégia de amplificação

Como não existem dados publicados sobre a utilização da técnica de RT-PCR com a descrição de oligonucleotídeos para o bPIV-3 foram desenvolvidos neste estudo oligonucleotídeos tendo, como protótipo, seqüências de bPIV-3 e hPIV-3. Desta maneira, oligonucleotídeos foram selecionados a partir de regiões conservadas entre os dois vírus com pequenas adaptações em alguns oligonucleotídeos previamente publicados. O resultado do alinhamento das seqüências dos genes da proteína de fusão (F), a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a proteína grande (L), bem como a posição de cada oligonucleotídeo selecionada pode ser visualizada no **Anexo 2**. Os oligonucleotídeos P3 e P6 foram adaptados de Storey et al. (1987), Stokes et al. (1992), respectivamente, e P4, P5 e P7 adaptados de Echevarría et al. (1998) ambos desenvolvidos por estes autores para amplificação do hPIV-3. As adaptações realizadas variaram desde o número de degenerações do oligonucleotídeo até o posicionamento o mesmo em relação à seqüência do originalmente publicada. Os outros oligonucleotídeos P1, P8, P9 e P10 foram selecionados neste estudo.

A estratégia de amplificação para o seqüenciamento do gene completo da HN do bPIV-3 foi baseada na sobreposição dos cinco fragmentos a serem amplificados. Esta ferramenta proporciona uma maior facilidade para evitar possíveis erros resultantes do seqüenciamento, principalmente nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos.

Para o desenvolvimento da técnica de RT-PCR visando a detecção do vírus bPIV-3 e hPIV-3, foram testadas diferentes combinações de

oligonucleotídeos, sendo a reação de melhor resultado para a amplificação de ambos os vírus a que utilizou os oligonucleotídeos P3 e P6. Em relação à estratégia escolhida para o seqüenciamento das amostras amplificadas com esse par de oligonucleotídeos, deve ser reavaliada já que para um fragmento de aproximadamente 1009 bp podem ocorrer problemas, devido ao tamanho do fragmento, que excede o recomendado para uma leitura fidedigna do seqüenciador. Além disso, neste fragmento, existem sítios de restrição muito parecidos entre os PIV-3, por exemplo Nco I, o que dificulta a diferenciação entre os vírus bovinos e humanos.

5.6.2. Extração de DNA viral

O resultado da extração da amostra de herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) amostra LA apresentou um produto final de extração íntegro e com quantidade suficiente para ser utilizado nos teste de especificidade dos diferentes oligonucleotídeos para PIV-3. O método de extração utilizado, determinado por Sambrook et al. (1989) com modificações, é rotineiramente utilizado no Laboratório de Virologia do IPVDF.

5.6.3. Extração de RNA viral

O resultado da extração de RNA das amostras utilizadas neste estudo, apresentou um produto final com quantidade suficiente para ser utilizado na síntese de cDNA por transcrição reversa (RT). O controle das extrações foi realizado pela utilização da relação proposta por Sambrook et al. (1989), onde a quantificação do produto extraído é realizada por espectrofotometria em dois

diferentes comprimentos de onda 260nm e 280nm e o resultado dessa relação determina a eficiência ou não da extração. Foram seguidas as recomendações propostas pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen™ Life Technologies, USA) que foi utilizado para a extração de todas as amostras, não havendo problemas aparentes no decorrer desta etapa. Posteriormente, foi realizada a síntese de cDNA por transcrição reversa (RT).

5.6.4. Síntese de cDNA

Os resultados das sínteses de cDNA das amostras utilizadas neste estudo foram avaliadas em gel de agarose 1%. Os produtos finais resultantes apresentavam-se com aspecto de degradação, mas quando submetidos a PCR nas condições sugeridas acima, proporcionavam a amplificação do fragmento desejado (**Figura 13**).

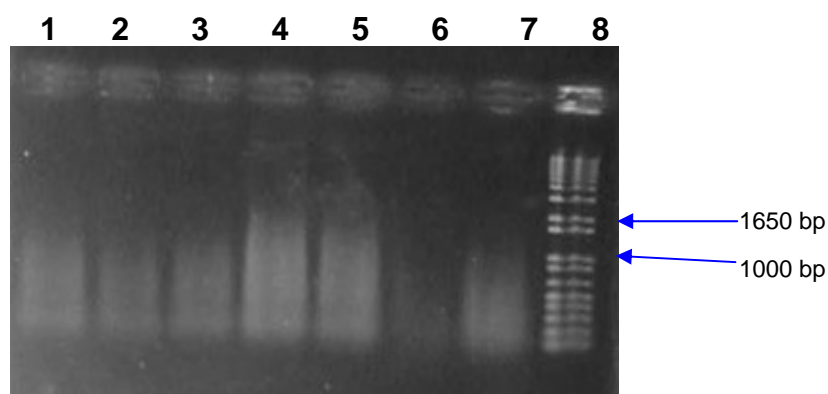


FIGURA 13. Resultado da síntese de cDNA por transcrição reversa (RT) de algumas amostras em gel de agarose 1,0%. 1 a 7) cDNAs de algumas amostras de PIV-3, 8) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB Plus).

5.7. Amplificações

Foram desenvolvidas seis diferentes protocolos de RT-PCR. Estes foram empregadas para diferentes fins, sendo cinco utilizadas no seqüenciamento do gene da HN (amostra DIO) e uma para a detecção do PIV-3.

5.8. RT-PCR para o seqüenciamento do gene da HN do bPIV-3 (amostra DIO)

Dos cinco fragmentos amplificados na RT-PCR para o seqüenciamento do gene da HN do bPIV-3, dois fragmentos (fragmento 4 e fragmento 5) apresentaram produtos inespecíficos, além dos produtos de interesse. Para a amplificação destes fragmentos, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos P7/P8 e P9/P10, respectivamente. Foram testadas diferentes condições de reação e amplificação. Para o fragmento 5 não foram mais visualizados produtos inespecíficos na reação de PCR, quando a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi elevada para uma temperatura de 48°C. O mesmo não ocorreu com o fragmento 4 que após inúmeras tentativas de amplificação em diferentes condições, permaneceu com um produto inespecífico. O produto inespecífico foi amenizado quando se utilizou uma temperatura de anelamento de 46°C. A presença dos produtos inespecíficos nessa reação pode estar associada às características próprias de cada oligonucleotídeo, ou ainda, ao estágio de replicação que o vírus se encontrava no momento em que foram realizadas as extrações de RNA (presença de RNA replicativo).

Para a purificação do fragmento 4 foi utilizado o sistema GFX (Amersham Biosciences) que proporciona a facilidade de extração da banda de interesse a partir do gel de agarose. Para a purificação dos demais fragmentos foi utilizado o sistema PureLink™ (Invitrogen™ Life technologies - USA). As

metodologias destes sistemas de purificação são baseadas na ligação seletiva do DNA a uma membrana de sílica na presença de sais caotrópicos. Conseguem-se recuperar uma quantidade expressiva do produto da PCR, ficando na faixa entre 0,1 a 40 μg de DNA.

Na **Figura 14**, são apresentados os resultados das amplificações dos fragmentos purificados do gene da HN da amostra DIO, antes dos mesmos serem seqüenciados. Os fragmentos resultantes das amplificações do gene da HN da amostra DIO apresentaram amplicons de tamanhos esperados para P1/P4 (969 bp), para P3/P4 (538 bp), para P5/P6 (610 bp), para P7/P8 (454 bp) e para P9/P10 (332 bp).

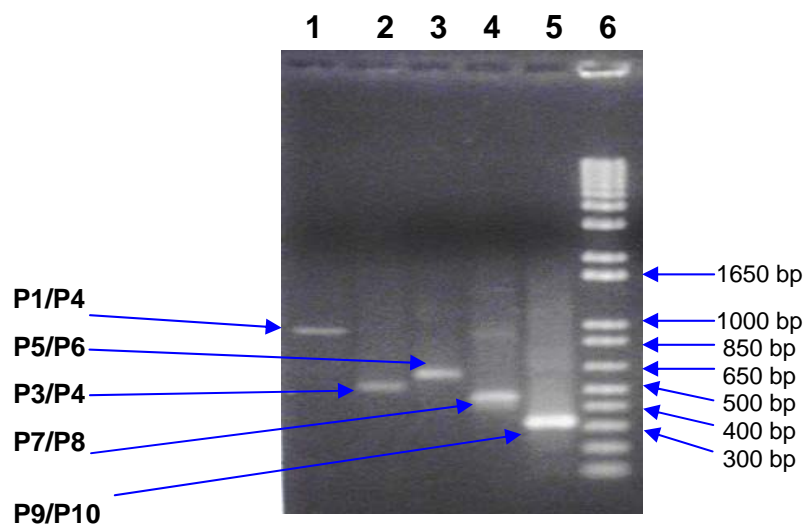


FIGURA 14. Resultados das amplificações dos fragmentos purificados do gene da HN pela técnica de RT-PCR para o seqüenciamento da amostra DIO em gel de agarose 1,0%. 1) Fragmento P1/P4; 2) Fragmento P3/P4; 3) Fragmento P5/P6; 4) Fragmento P7/P8; 5) Fragmento P9/P10; 6) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB Plus).

5.9. Otimização da técnica de RT-PCR

Foram testadas diferentes combinações de oligonucleotídeos, sendo a reação de melhor resultado para a amplificação das amostras dos bPIV-3 e hPIV-3 a que utilizou os oligonucleotídeos P3/P6.

5.9.1. Sensibilidade

A sensibilidade da técnica de RT-PCR foi avaliada após titulação viral e a partir do cDNA quantificado por espectrofotometria, através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN da amostra referência SF-4 (bPIV-3), utilizando-se o par de oligonucleotídeos P3/P6. Os ensaios de RT-PCR possuem boa sensibilidade, sendo relatada na literatura uma variação entre (78% a 100%) (Bressoud et al., 1990).

Após titulação viral

Na **Figura 15** são apresentados os resultados após titulação da amostra em células MDBK, extração do RNA viral e síntese do cDNA. A concentração de DNA amplificado foi diminuindo de forma gradual no decorrer da titulação viral, observando-se amplificação detectável do fragmento de 1009 bp do gene da HN até a quarta diluição (10^{-4}). O controle negativo não apresentou amplificação.

A análise dos resultados das amplificações comprova que a RT-PCR conseguiu detectar até 140 DCCI₅₀ do vírus bPIV-3 em cultivo celular. Dois estudos publicados relatam uma sensibilidade maior que a encontrada no presente estudo, embora está tenha sido estimada para o hPIV-3. Corne et al. (1999) encontraram uma sensibilidade de de 1 DCCI₅₀ na RT-PCR multiplex e a

mesma quando foi testada individualmente a sensibilidade para o hPIV-3. Aguilar et al. (2000) relataram sensibilidade de 32 DCCI₅₀ para a reação de RT-PCR individual para o hPIV-3. A sensibilidade da RT-PCR do bPIV-3 ainda não foi relatada na literatura. Embora, inferior quando comparada à sensibilidade referida nos dois estudos citados, deve-se levar em consideração a maneira como foram realizados os cálculos para chegar a estes valores. Além disso, tem que se ter cuidado quando compararmos com resultados de outros estudos que utilizam nas reações de PCR sondas para hidridização, que aumentam significativamente a sensibilidade da técnica, não sendo o caso desses dois estudos utilizados para comparação da técnica aqui desenvolvida.

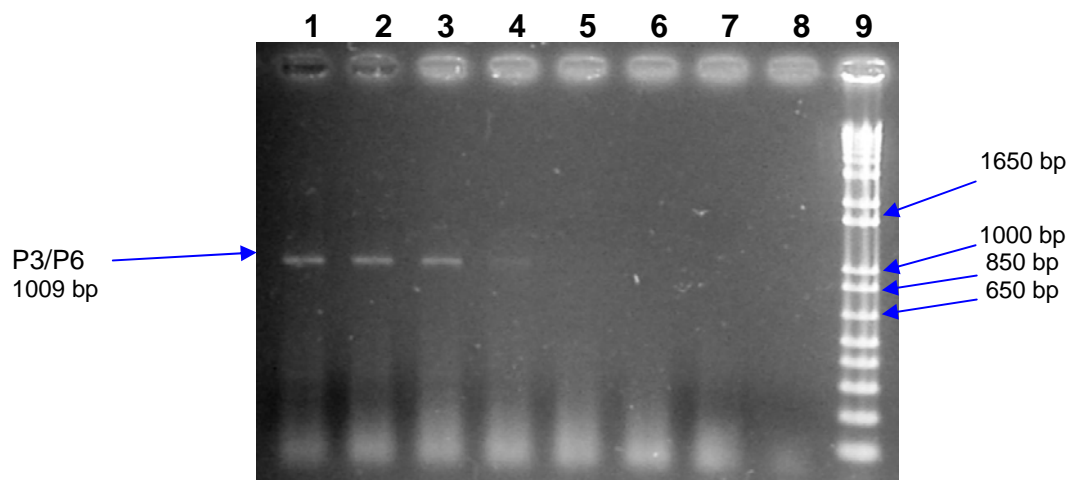


FIGURA 15. Resultados dos testes de sensibilidade da técnica de RT-PCR obtidos através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN da amostra referência SF-4, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Diluição 10^{-1} ; 2) Diluição 10^{-2} ; 3) Diluição 10^{-3} ; 4) Diluição 10^{-4} ; 5) Diluição 10^{-5} ; 6) Diluição 10^{-6} ; 7) Diluição 10^{-7} ; 8) Controle negativo; 9) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB plus).

A partir do cDNA

Na **Figura 16**, são mostrados os resultados após diluições do cDNA viral (475ng/ μ L), observando-se amplificação detectável do fragmento de 1009 bp do gene da HN até a diluição 1:10000 (canaleta 7), correspondendo à concentração de 118,75 pg de DNA. Comparando-se com o padrão de massa molecular, pode ser observado que o tamanho esperado do fragmento do gene da HN de 1009 bp foi obtido na amplificação da amostra SF-4. A concentração de DNA amplificado foi diminuindo de forma gradual no decorrer das diluições do cDNA viral. O controle negativo não apresentou amplificação inespecífica.

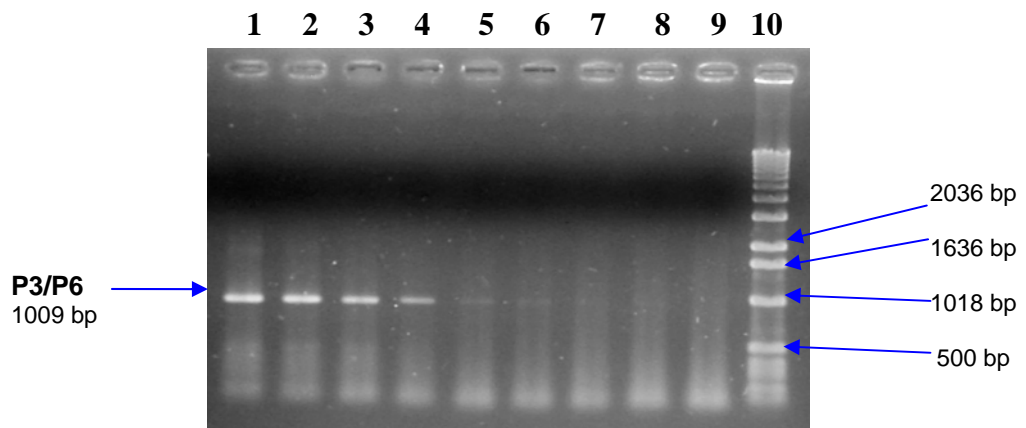


FIGURA 16. Resultados dos testes de sensibilidade da técnica da RT-PCR obtidos através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN da amostra referência SF-4, após eletroforese em gel de agarose 1,0% com diluições seriadas de cDNA. 1) Amostra referência SF-4, 475 ng/ μ L; 2) Diluição 1:10; 3) Diluição 1:100; 4) Diluição 1:1000; 5) Diluição 1:2500; 6) Diluição 1:5000; 7) Diluição 1:10000; 8) Diluição 1:20000; 9) Controle negativo; 10) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB).

A análise dos resultados das ampliações a partir das diluições do cDNA comprova que a relação de RT-PCR utilizando este método pode ser considerada bastante sensível comparada com o cultivo celular, uma vez que foi capaz de amplificar aproximadamente 119 pg de DNA. Não foram encontrados dados na literatura para comparar com os resultados obtidos neste estudo.

Portanto, analisando-se os resultados da sensibilidade após a titulação viral, ficou claro que a técnica RT-PCR deve ser utilizada com cautela, pois foi menos sensível quando comparada com o cultivo celular, já que este apresenta sensibilidade de aproximadamente 1 DCCI₅₀ (Echevarria et. al., 2000).

5.9.2. Especificidade

Nas **Figuras 17, 18, 19 e 20** são apresentados alguns dos resultados dos testes de especificidade da técnica de RT-PCR com amplificação dos diferentes fragmentos do gene da HN do bPIV-3. Houve amplificação dos fragmentos esperados do gene da HN na amostra DIO e na amostra referência SF-4, a última utilizada como controle positivo da reação. Não houve amplificação do fragmento do gene da HN em nenhuma das outras amostras virais testadas: hPIV-1, hPIV-2, cepa vacinal canina do vírus da cinomose (Lederle), cepa padrão eqüina do vírus influenza (H2N2) e uma cepa padrão vírus herpes bovino tipo-1 (LA). Numa análise comparativa com o padrão de massa molecular, é possível observar que foram obtidos os tamanhos esperados dos diferentes fragmentos do gene da HN da amostra DIO e SF-4. O controle negativo também não apresentou amplificação.

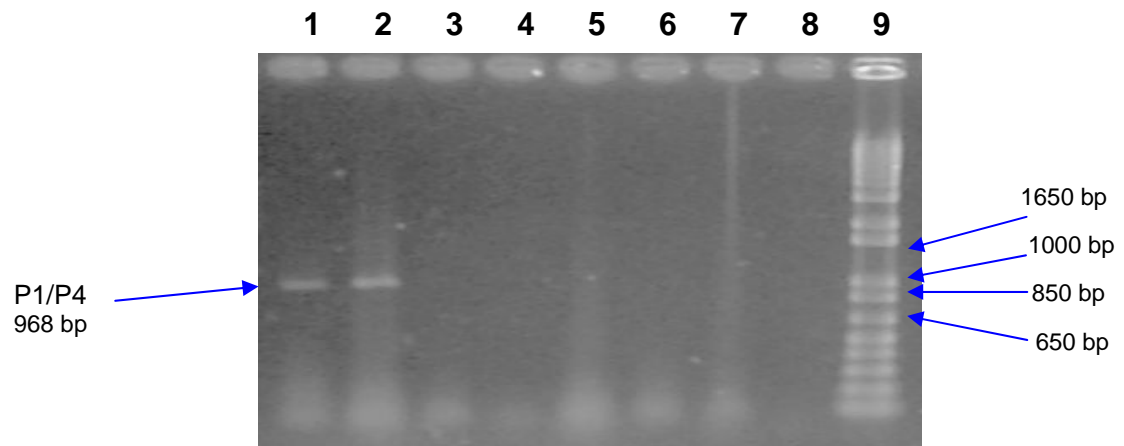


FIGURA 17. Resultados do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P1/P4 do gene da HN, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra referência SF-4; 2) Amostra DIO; 3) Amostra hPIV-1; 4) Amostra hPIV-2; 5) Amostra vacinal canina do vírus da cinomose (Lederle); 6) Amostra de vírus influenza eqüino (H2N2); 7) Amostra de vírus herpes bovino tipo-1 (LA), 8) Controle negativo; 9) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB plus).

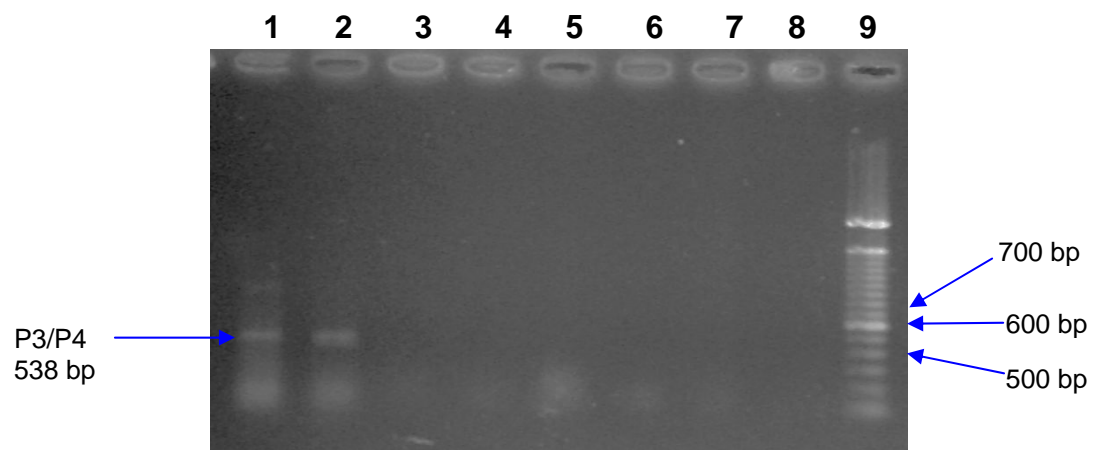


FIGURA 18. Resultados do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P3/P4 do gene da HN, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra referência SF-4; 2) Amostra DIO; 3) Amostra hPIV-1; 4) Amostra hPIV-2; 5) Amostra vacinal canina do vírus da cinomose (Lederle); 6) Amostra de vírus influenza eqüino (H2N2); 7) Amostra de vírus herpes bovino tipo-1 (LA); 8) Controle negativo; 9) Padrão de massa molecular (Ladder 100 bp).

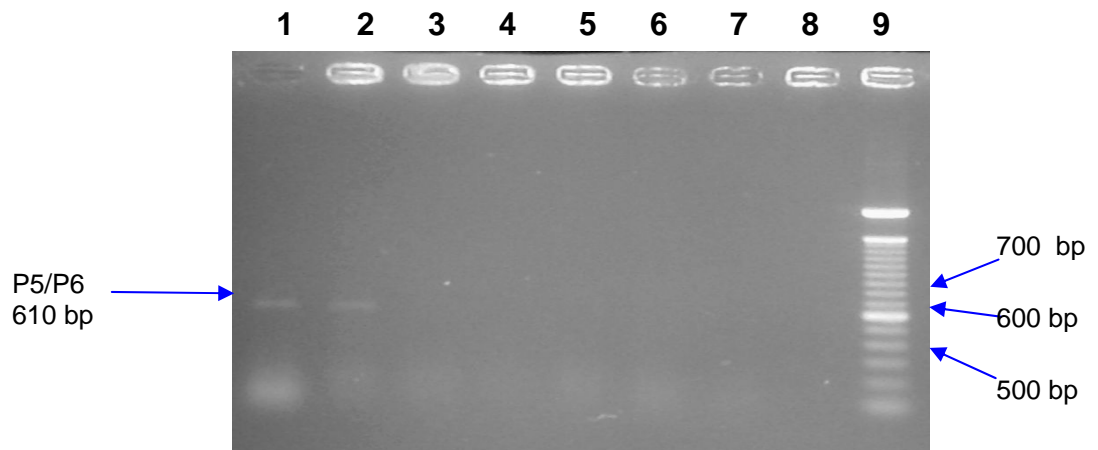


FIGURA 19. Resultados do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P5/P6 do gene da HN, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra referência; 2) Amostra DIO; 3) Amostra hPIV-1; 4) Amostra hPIV-2; 5) Amostra vacinal canina do vírus da cinomose (Lederle); 6) Amostra de vírus influenza eqüino (H2N2); 7) Amostra de vírus herpes bovino tipo-1 (LA); 8) Controle negativo; 9) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 100 bp).

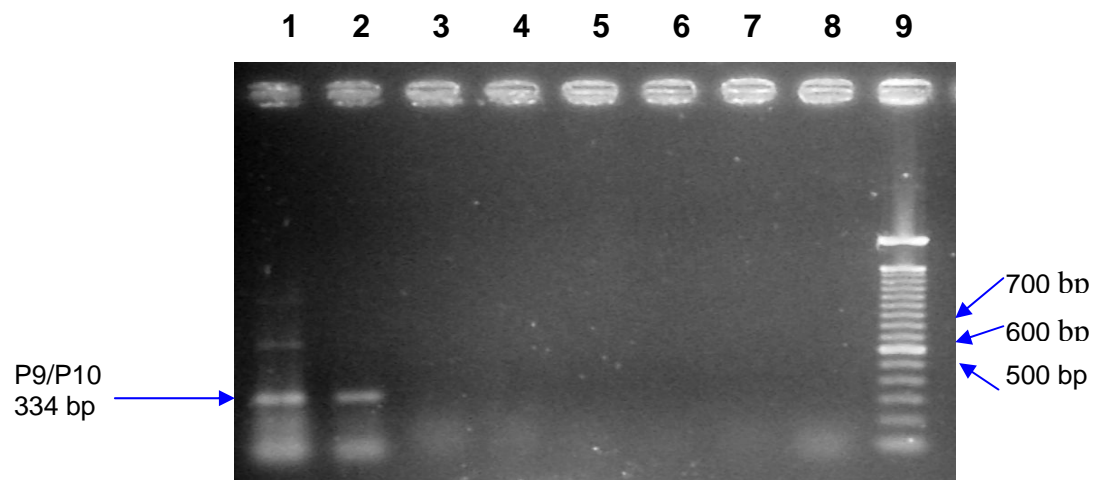


FIGURA 20. Resultados do teste de especificidade da técnica de RT-PCR utilizada para o seqüenciamento, com amplificação do fragmento P9/P10 do gene da HN, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra referência SF-4; 2) Amostra DIO; 3) Amostra hPIV-1 4) Amostra hPIV-2; 5) Amostra vacinal canina do vírus da cinomose (Lederle); 6) Amostra de vírus influenza eqüino (H2N2); 7) Amostra de vírus herpes bovino tipo-1 (LA); 8) Controle negativo; 9) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 100 bp).

Na **Figura 21**, são apresentados os resultados dos testes de especificidade da técnica de RT-PCR utilizando-se P3/P6. Houve amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN na amostra referência SF-4 e nas três amostras (DIO, CRIB, PG1775) isoladas de bPIV-3. Não houve amplificação do fragmento de 1009 bp de nenhuma das outras amostras virais testadas: hPIV-1, hPIV-2, cepa vacinal canina do vírus da cinomose (Lederle), cepa de vírus influenza eqüino (H2N2) e uma cepa de vírus herpes bovino tipo-1 (LA). Em relação ao padrão de massa molecular é possível observar que o tamanho esperado do fragmento de 1009 bp do gene da HN foi obtido na amplificação das amostras de bPIV-3. O controle negativo não apresentou amplificação.

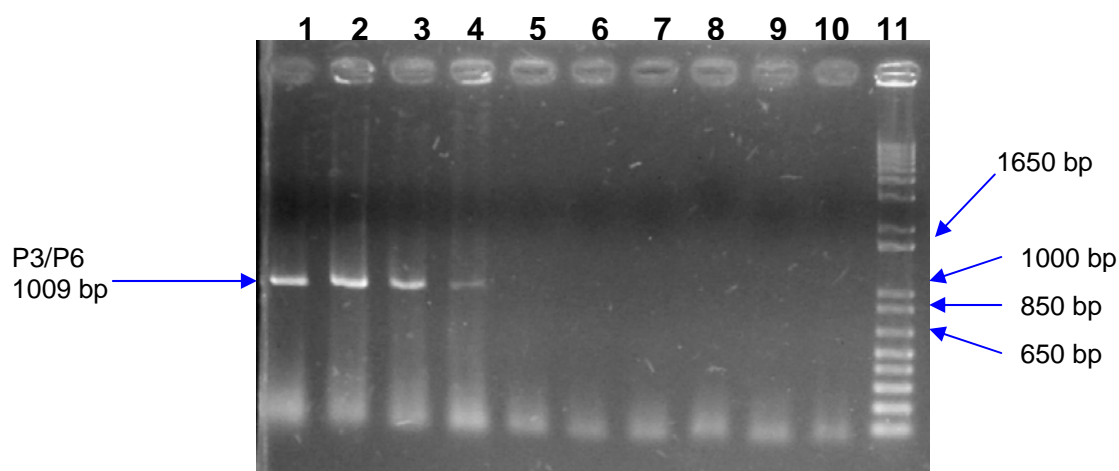


FIGURA 21. Resultados do teste de especificidade da técnica de RT-PCR avaliada através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras de bPIV-3, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra referência SF-4; 2) Amostra DIO; 3) Amostra PG1775; 4) Amostra CRIB; 5) Amostra hPIV-1; 6) Amostra hPIV-2; 7) Amostra vacinal canina do vírus da cinomose (Lederle); 8) Amostra de vírus influenza eqüino (H2N2); 9) Amostra de

vírus herpes bovino tipo-1 (LA); 10) Controle negativo; 11) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB plus).

Analisando-se os resultados encontrados nos testes de especificidade da RT-PCR neste estudo, pode-se dizer que foi de 100% das amostras de bPIV-3. A especificidade pode ser comparada com a de dados publicados por Corne et al. (1999), que relataram uma especificidade de 100% para a padronização de uma RT-PCR multiplex e Fan et al. (1998), que reportaram uma especificidade de 98% para uma técnica de RT-PCR hexaplex para amostras de hPIV-3. Entretanto, a quantidade de vírus utilizados para averiguar a especificidade nestes dois estudos foi maior. Em outro relato a especificidade da RT-PCR, observado por Bressoud et al. (1990), variou entre 64% e 95% para o hPIV-3.

5.9.3. Reprodutibilidade

Em todos os experimentos realizados para testar a reprodutibilidade da RT-PCR, utilizando P3/P6 não houve diferença entre os resultados obtidos.

A **Figura 22** mostra um gel de agarose contendo um fragmento amplificado de 1009 bp do gene da HN que está presente na amostra de referência SF-4 e nas amostras de bPIV-3 e hPIV-3 incluídos nos testes de reprodutibilidade. Não houve amplificação inespecífica em nenhuma das reações testadas. O controle negativo também não apresentou amplificação. Este gel é referente a quinta repetição do experimento.

Assim, os resultados referentes à reprodutibilidade da RT-PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos P3/P6 e as amostras testadas, sugerem tratar-se de uma técnica bastante reprodutível.

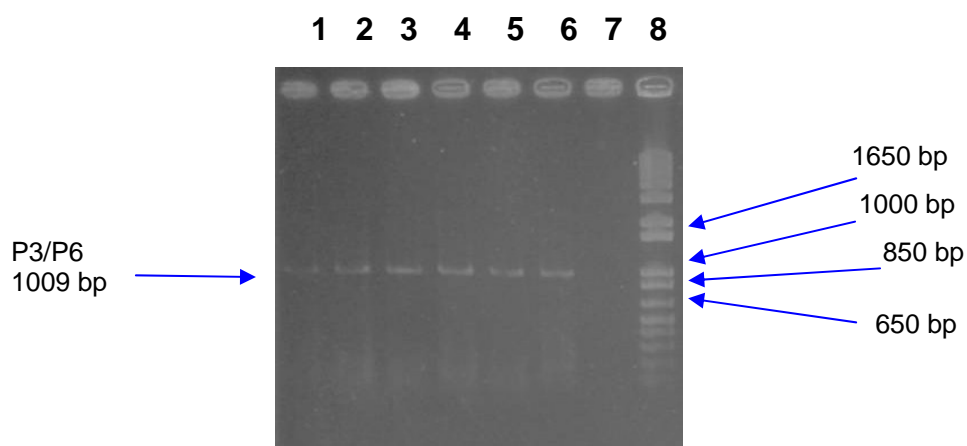


FIGURA 22. Resultados do teste de reprodutibilidade da técnica de RT-PCR avaliada através da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras do bPIV-3 e hPIV-3 em dias diferentes e eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra referência SF-4; 2) Amostra DIO; 3) Amostra PG1775; 4) Amostra CRIB; 5) Amostra VR45; 6) Amostra VR281; 7) Controle negativo; 8) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB Plus).

5.10. RT-PCR para a detecção de bPIV-3 e hPIV-3

Na **Figura 23**, são apresentados os resultados da amplificação do fragmento do gene da HN da amostra referência SF-4 e das amostras virais de bPIV-3 isoladas através de cultivos celulares, utilizando-se os oligonucleotídeos P3/P6. Os fragmentos obtidos em todas as amplificações foram bem definidos, não apresentando amplificações inespecíficas. Desta maneira, a técnica pode ser considerada bastante útil para a detecção do bPIV-3 a partir de cultivos celulares.

Numa análise comparativa é possível observar que os fragmentos (1009 bp) migram na mesma posição do respectivo padrão de massa molecular. Também é possível observar, pelo controle negativo, que não houve contaminação do material com DNA externo.

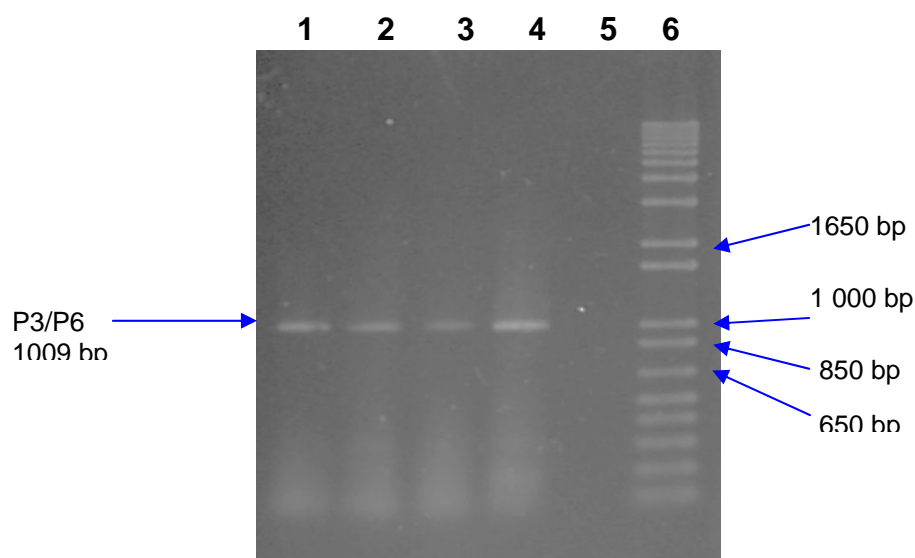


FIGURA 23. Resultados da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras isoladas de vírus bPIV-3, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra referência SF-4; 2) Amostra DIO; 3) Amostra PG1775; 4) Amostra CRIB; 5) Controle negativo; 6) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB Plus).

Na **Figura 24** são apresentados os resultados da amplificação do fragmento do gene da HN da amostra referência SF-4 e das amostras virais de hPIV-3 isoladas por cultivo celular, utilizando-se os oligonucleotídeos P3/P6. A análise destes resultados comprova que os fragmentos obtidos em todas as amplificações foram bem definidas, apresentando a amostra VR 281 (canaleta 5) uma fraca amplificação inespecífica de aproximadamente 900 bp, mas que não interferiu durante a realização dos testes de sensibilidade e especificidade. A técnica possivelmente possa ser empregada como ferramenta para a detecção do hPIV-3 a partir de cultivos celulares. Seria conveniente, no entanto, testar

futuramente a técnica, utilizando amostras de aspirados e suabes nasais de pacientes potencialmente infectados pelo bPIV-3 ou hPIV-3, conforme descrito em muitas publicações para amostras virais de origem humana (Fan et al., 1997, Osiowy, 1998, Eugene-Ruellan et al., 1998, Echevarría et al., 1998, Aguiar et al., 2000).

Numa análise comparativa, pode-se observar que os fragmentos (1009 bp) migram na mesma posição do respectivo padrão de massa molecular. Também é possível observar, pelo controle negativo, que não houve contaminação do material com o DNA alvo.

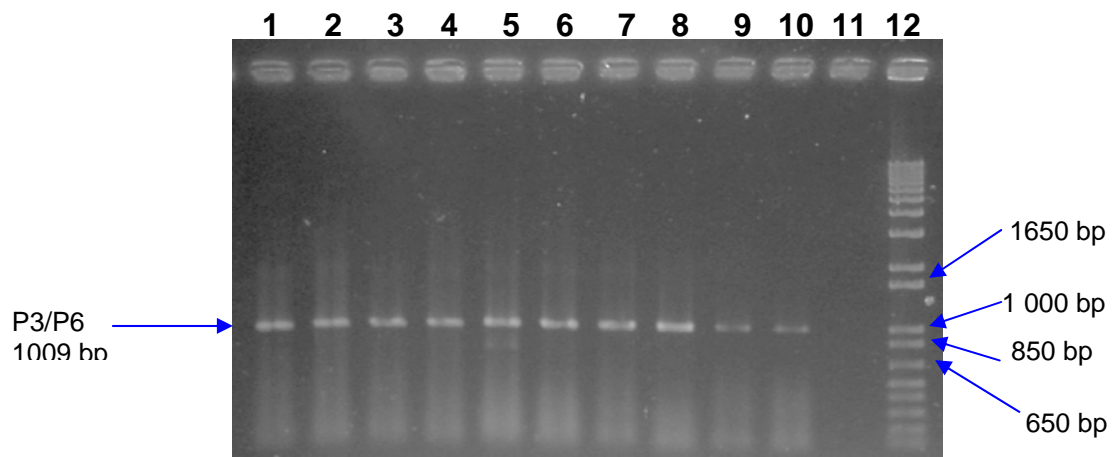


FIGURA 24. Resultados da amplificação do fragmento de 1009 bp do gene da HN das amostras isoladas de vírus hPIV-3, após eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1) Amostra VR 01; 2) Amostra VR 03; 3) Amostra VR 04; 4) Amostra VR 45; 5) Amostra VR281; 6) Amostra 321; 7) Amostra VR353; 8) Amostra 357; 9) Amostra VR 359; 10) Amostra VR364; 11) Controle negativo; 12) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1KB plus).

5.11. Análise dos produtos de clivagem com Nco I

Na **Figura 25**, são apresentados os resultados da digestão do fragmento de 1009 bp amplificado do gene da HN por RT-PCR, referentes à amostra referência SF-4 e às amostras DIO, PG1775 e CRIB do vírus bPIV-3, respectivamente. A amostra referência mostrou um perfil de migração idêntico ao esperado em seu mapa de restrição. Com dois fragmentos esperados de aproximadamente 800 bp e 208 bp as amostras DIO, PG1775 e CRIB tiveram perfil de restrição similar ao da amostra referência.

Os resultados analisados sugerem que as amostras de bPIV-3 apresentam apenas 1 sítio para Nco I, não sendo possível diferenciá-las com esta enzima. Devido à pequena quantidade de sítios de restrição para o bPIV-3 neste fragmento, faz-se necessário o seqüenciamento dessas amostras para analisar se existe homologia com as publicadas. A utilização do fragmento de 1009 bp não possibilitou a diferenciação das amostras bovinas, não sendo capaz também de diferenciá-las das humanas, pois as amostras humanas apresentam o mesmo sítio de Nco I na mesma posição. O uso de outras enzimas de restrição poderia ser útil para esta finalidade. Não foram encontrados relatos na literatura sobre a utilização de enzimas de restrição para a diferenciação dos bPIV-3 e hPIV-3. Esta possibilidade fica para trabalhos futuros uma vez que o objetivo deste estudo foi realizar o seqüenciamento do gene da HN da amostra DIO e o desenvolvimento de uma técnica de RT-PCR para a detecção de ambos os vírus. Além disso, deve-se escolher uma região mais diversificada, que contenha um número maior de sítios para enzimas de restrição que possam diferenciar bPIV-3 do hPIV-3.

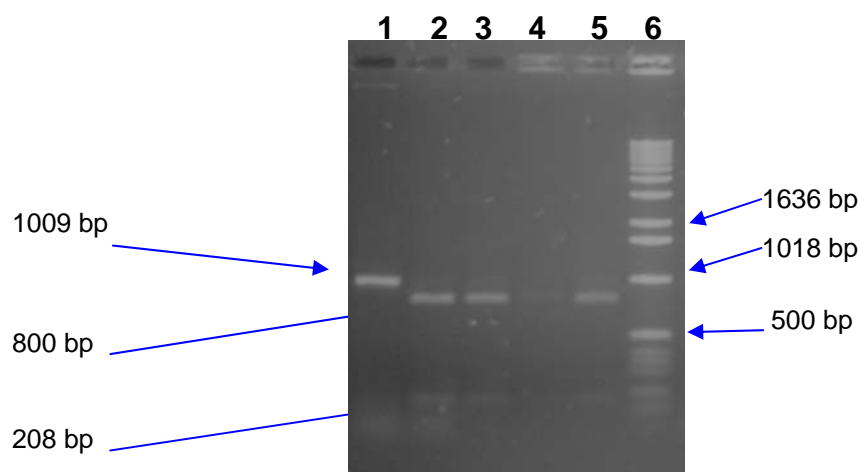


FIGURA 25. Resultados do perfil de restrição do fragmento amplificado de 1009 bp do gene da HN do vírus bPIV-3 por RT-PCR, após clivagem com *Nco* I e eletroforese em gel de agarose 1,5%. 1) Amostra referência SF-4 não digerida; 2) Amostra referência SF-4 digerida; 3) Amostra DIO digerida; 4) Amostra PG 1775 digerida; 5) Amostra CRIB digerida; 6) Padrão de massa molecular em bp (Ladder 1 Kb).

5.12. Seqüenciamento

O seqüenciamento do gene da HN da amostra DIO foi parcialmente realizado. O resultado do seqüenciamento de um dos 5 fragmentos do gene da HN da amostra DIO está exemplificado na **Figura 26**.

Para os fragmentos 2, 3, 4 e 5 foram realizadas duas reações de seqüenciamento para cada fita de DNA. O fragmento 1 também foi submetido ao seqüenciamento, mas por duas vezes não foi possível a realização da leitura de nenhuma das fitas de DNA. A explicação possivelmente esteja nos oligonucleotídeos uma vez que estes são degenerados, ou até mesmo no tamanho do produto, que é de aproximadamente 970 bp, excedendo a

capacidade de leitura. Outra hipótese poderia ser a má qualidade do produto ou algum interferente para a reação, oriundo da purificação. O resultado do seqüenciamento deste fragmento esta sendo aguardado e estará disponível em poucos dias. As seqüências 2, 3, 4 e 5 foram submetidas ao BLAST, sendo todas homólogas ao bPIV-3 (**Anexo II**). A seguir, foi realizado o alinhamento destes fragmentos. Observou-se uma homologia de nucleotídeos da amostra DIO de 99%, quando comparada com a amostra referência (**Anexo II**). Quando comparada com outras amostras de bPIV-3 disponíveis no Genbank, (número de acesso AF178655, D84095) apresentaram uma homologia de 98 a 91%, respectivamente (**Anexo II**). Homologia de 79 a 80% (**Anexo II**) foi observada quando foi realizado o alinhamento dos fragmentos da amostra DIO do bPIV-3 com outras amostras de hPIV-3 do Genbank (número de acesso M18763, M18761, ABO12132, Z11575).

Em resumo, no presente estudo podemos observar que os altos níveis de homologia entre as amostras não foram muitos diferentes aos já relatados na literatura e aqui descritos no **item 2.5.5**. A alta homologia encontrada entre a amostra DIO e a amostra referência, merece ser destacada, pois embora tenham sido isoladas em diferentes continentes em um intervalo de 40 anos, apresentam homologia na região gênica analisada. Essa relação indica que, embora sujeito a mutações e evolução contínuas, a amostra aqui isolada se manteve aparentemente conservada, quando comparada à amostra referência. A homologia da amostra DIO em relação às amostras dos hPIV-3 foi um pouco superior a relatada na literatura por Collins et al. (1996) de 77%.

6. CONCLUSÕES

A técnica de RT-PCR para a detecção do bPIV-3 apresentou boa especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade, embora ainda deva ser melhor avaliada.

Nas condições testadas neste estudo a técnica de RT-PCR apresentou resultados que permitem sua utilização como teste de triagem para a detecção do bPIV-3 no controle de qualidade de cultivos celulares em laboratórios de virologia.

Esta técnica poderia ser utilizada como um teste confirmatório para o diagnóstico de infecções respiratórias humanas por PIV-3.

O resultado parcial do seqüenciamento do gene da HN da amostra DIO sugere que esta apresenta uma homologia de 99% com a amostra referência, cepa SF-4, e 91 a 98% com outras amostras do bPIV-3, previamente depositadas no Genbank.

O desenvolvimento da IPX para a detecção da presença do bPIV-3 em cultivos celulares apresentou boa especificidade, embora sua sensibilidade deva ser melhor avaliada, comparando-a com outros métodos mais sensíveis já existentes.

7. PERSPECTIVAS

Utilizar a técnica de RT-PCR desenvolvida no presente trabalho em estudos epidemiológicos, com a finalidade de conhecer a ocorrência dos vírus bPIV-3 e hPIV-3 no RS, através da coleta de amostras de secreções nasais.

Implementar um protocolo para controle de qualidade no laboratório de virologia do IPVDF, incluindo a técnica de RT-PCR para a detecção de contaminação de cultivos celulares pelo bPIV-3.

Incluir a técnica de RT-PCR na padronização de uma PCR multiplex a fim de ser utilizada no diagnóstico de infecções respiratórias humanas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**, Pennsylvania: Saunders Company. 4^a ed; 553p, 2000.

ABINANTI, F.R., CHANOCK, R.M., COOK MK, WONG D, WARFIELD M. Relationship of human and bovine strains of myxovirus para-influenza 3. **Proc Soc Exp Biol Med**, Maywood, 106:466-469, 1961.

ABINANTI, F.R., HOERLEIN, A.B., WATSON, R.L, HUEBNER, R.J. Serologic studies of myxovirus parainfluenza 3 in cattle and the prevalence of antibodies in bovines. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 86, p.505-511, 1961.

ADAIR, B.M. Immunofluorescence in the serological diagnosis of parainfluenza type 3 and respiratory syncytial virus infection in calves. **Research in Veterinary Science**, Washington, v. 41. p. 414-416, 1986.

AGUILAR, J. C; BRENA, M. P. P; GARCIA, M. L; CRUZ, N; ERDMAN, D. D; ECHEVARRIA, J. E. Detection and identification of Human Parainfluenza Viruses 1,2,3 and 4 in Clinical Samples of Pediatric Patients by Multiplex Reverse Transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, p1191-1195, 2000.

ALEXANDER, D. J. Classification, host range and distribution of avian Paramyxoviruses. In: MCFERRAN, J. V.; MCNULTY, M. S. (Eds). **Acute virus infections of poultry**. Dordecht: Martinus Nijhoff, p. 87-95, 1991.

ANDREWES, C. H.; BANG, F. B.; BURNET, F. M. A short description of the myxovirus group (influenza and related viruses). **Virology**, Orlando, v.1, n. 2, p. 176-184, 1955.

ANSARI, S. A. et al. Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studics with human parainfluenza virus 3 and rhinovirua 14. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 2115-2119,1991.

ARGHEDAS, A.; STUTMAN, H. R.; BLANDING, J. D. Parainfluenza type 3 meningitis: report of two cases and rewiew of the literature. **Clinical Pediatrics**, Philadelphia, v. 29, n. 3, p. 175-178, 1990.

ASSAF, R.; MONTPETIT, C.; MARSOLAIS, G. Serology of bovine parainfluenza virus type 3: Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v.47, n. 2, p. 140-142, 1983.

BAILLY, J. E. et al. Sequence determination and molecular analyses of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates. **Virus Genes**, Norwell, v. 20, n. 2, p. 173-182, 2000.

BARENFRANGER, J. et al. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 8, p. 2824-2828, 2000.

BASARABA, R. J; LAEGREID, W. W; BROWN, P. R. Cell-to-cell contact not soluble factors mediate suppression of lymphocyte proliferation by bovine parainfluenza virus type 3. **Viral Immunology**, Bethesda, v.7, n. 3, p. 121-132, 1994.

BELSHE, R. B.; VAN VORIS, L. P.; MUFSON, M. A. Impact of viral respiratory diseases on infants and young children in a rural an urban arca of southern West Virginia. **American Journal Of Epidemiology**, Baltimore, v. 117, p. 467-474,1983.

BERMAN, S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of deveioning countics. **Reviews Of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, p. S454-S462, 1991.

BITNUN, A. et al. Acute childhood encephalitis and *Mycoplasma pneumoniae*. **Clinical of Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, n. 12, p. 1674-1684, 2001.

BLANCHARD, B. M. Cluster headache associated with parainfluenza virus, proceded and succeded by migraine. **Headache**, Chicago, v. 38, p. 132-134, 1998.

BOSE, S.; MALUR, A.; BANERJEE, A. K. Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: role of microfilament and microtubule. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1984-1989, 2001.

BRADY, M. T.; EVANS, J.; CUARTAS, J. Survival and disinfection of parainfluenza viruses on environmental surfaces. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 18, n. 1, p. 18-23, 1990.

BRANDT, C. D. et al. Simultaneous infections with different enteric and respiratory tract viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, n.1, p. 177-179, 1986.

BRESSOUD, A. et al. Rapid detection of influenza virus H1 by the polymerase chain reaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 167, n. 2, p. 425-30, 1990.

BRYSON, D. G. et al. Observations on outbreaks of respiratory disease in calves associated with parainfluenza type 3 virus and respiratory syncycial virus infection. **Veterinary Record**, London, v. 104, n. 3, p. 45-49, 1979.

BUCKINGHAM, S. C. et al. A randomized double-blind, placebo-controlled trial of dexamethasone in severe respiratory syncycial virus (RSV) infection: effects on RSV quantily and clinical outcome. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 185, p. 1222-1228, 2002.

BUTLER, M.; DAWSON, M. **Cell culture**. London: Blackwell Scientific, 1992. 247 p.

CANCHOLA, J. G. et al. Recovery and identification of human myxoviruses. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 29, n. 4, p. 496-503, 1965.

CANCHOLA, J.; VARGOSKO, A. J.; KIM, H. W. Antigenic variation among newly isolated strains of parainfluenza type 4 virus. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 79, p. 357-364, 1964.

CANDEIAS, J. A. N, RIBEIRO, L. C. Anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus parainfluenza 3 (HA-1), em gado bovino. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 2, p. 180-185, 1968.

CANDEIAS, J. A. N; RIBEIRO, L. C. Anticorpos inibidores da hemaglutinação para as cepas SF-4 e HA-1 de Myxovirus parainfluenza 3, em gado bovino do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 37, p. 129-135, 1970.

CANDEIAS, J. A. N; SUGAY, W; RIBEIRO, L. C. Isolamento do Myxovirus parainfluenza 3 em gado bovino do estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.5, p. 207-212, 1971.

CARBALLAL, G. et al. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 64, n. 2, p. 167-174, 2001.

CARBREY, E. A. et al. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine diarrhea virus and shipping fever (Parainfluenza 3). **Proceedings of U. S. A. Health Association**, Chicago, v.75, p. 629-648, 1971.

CARDOSO, T. C. et al. of an indirect ELISA method for the detection of chicken antibodies infections bronchitis virus. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n.1, p. 64-69, 1996.

CARPENTER, T. C; REEVES, J. T; DURMOWICZ, A. G. Viral respiratory infection increases susceptibility of young rats to hypoxia-induced pulmonary edema. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 3, p. 1048-1054, 1998.

CHANOCK, R. M. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 104, p. 555-576, 1956.

CHANOCK, R. M. et al. New viruses observed in children with respiratory diseases. **Public Health Reports**, Rockville, v. 73, p. 193-195, 1958.

CHANOCK, R. M. et al. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 258, n.5, p. 207-213, 1958.

CHANOCK, R. M. et al. The hemadsorption technique , with special reference to the problem of naturally occurring simian para-influenza virus. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 3, p. 125-129, 1961.

CHANOCK, R. M.; PARROT, R. H. Parainfluenza viruses. In: **VIRAL and rickettsial infections of man**. 4. ed. [s.l.]: J.B. Lippincott , 1965. 1282 p.

CHANOCK, R. M. Parainfluenza viruses. In: LENNETTE, E. H. (Ed.) **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Washington: American Public Health Association, 1979. p. 611-633.

CHANOCK, R. M.; MCINTOSH, K. Parainfluenza viruses. In: FIELDS, B. N. (Ed.). **Virology**. New York: Raven Press, 1985. p. 1241.

CHOU DHARY, S. et al. Interferon action against human parainfluenza virus type 3: involvement of a novel antiviral pathway in the inhibition of transcription. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 4823-4831, 2001.

CIFTCIOGLU, N. et al. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 7, p. 2077-86, 2002.

CITOVSKY, V; YANAI, P; LOYTER, A. The use of circular dichroism to study conformational changes induced in Sendai virus envelope glycoproteins: a correlation with the viral fusogenic activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 261, n. 5, p. 2235-2239, 1986.

COLE, G. A. et al. Analysis of the primary T-cell response to Sendai virus infection in C57BL/6 mice CD4+ T-cell recognition is directed predominantly to the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. **Journal of Virology**, Washington, v. 68, p. 6863-6870, 1994.

COLLINS, P. L; CHANOCK, R. M; McCHINTOSH, K. Parainfluenza virus. In.: **Fields virology**. 3^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.1. p. 1205-1242.

COMPANS, R. W; CHOPPIN, P. W. Isolation and properties of the helical nucleocapsid of the parainfluenza virus SV5. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 57, n. 4, p. 949-956, 1967.

COOK, M. K; CHANOCK, R. M. In vivo antigenic studies of parainfluenza viruses. **American Journal Of Hygiene**, Baltimore, v. 77, p. 150-159, 1963.

CORNE, M. J. et al. A multiplex RT-PCR for the detection of parainfluenza viruses 1-3 in clinical samples. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 9-18, 1999.

CRAIGHEAD, J. E.; BRENNAN, B. J. Cytopathic effects of parainfluenza virus type 3 in organ cultures of human respiratory tract tissue. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 52, n. 2, p. 287-300, 1968.

DAL PIZZOL, M. et al. Detecção de anticorpos para o vírus parainfluenza-3 em bovinos e ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 17, p. 59-64, 1989.

DAVE, V. et al. Viral cross-reactivity and antigenic determinants recognized by human parainfluenza virus type I - specific cytotoxic T-cells. **Virology**, New York, v. 199, p. 376-383, 1994.

DENNY, F. H. et al. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. **Pediatrics**, New York, v. 71, n. 6, p. 871-876, 1983.

DENNY, F. W.; CLYDE, JR. W. A. Acute lower respiratory infections in nonhospitalized children. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 108, p. 635-646, 1986.

DOWELL, S. F. et al. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 174, n. 3, p. 456-462, 1996.

DOWNHAM, M. A.; MCDUILLIN, J.; GARDNER, P. S. Diagnosis and clinical significance of paraifluenza virus infections in children. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 49, n. 1, p. 8-15, 1974.

DREWS, A. L. et al. Dual respiratory virus infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 25, n. 6, p. 1421-1429, 1997.

ECHEVARRIA, J. E. et al. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1,2,3 and 4 from clinical samples by multiplex PCR. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1388-1391, 1998.

ECHEVARRIA, J. E. et al. Rapid molecular epidemiologic studies of human parainfluenza viruses based on detect sequencing of amplified DNA from a multiplex RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 88, p. 105-109, 2000.

EGELMAN, E. H. et al. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. **Journal of Virology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 2233-2243, 1989.

EUGENE-RUELLAN, G. et al. Detection of respiratory syncytial virus A and B and prainfluenza 3 sequences in respiratory tracts of infants by a single PCR with primers targeted to the L-polymerase gene and differential hybridization. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 796-801, 1998.

FAN, J.; HENRICKSON, K. J. Rapid diagnosis of human parainfluenza virus type 1 infection by quantitative reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 8, p. 1914-1917, 1996.

FAN, J.; HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. L. Rapid Simulataneous Diagnosis of Infections with Respiratory Syncytial Viruses A and B, Influenza Viruses A and B,

and Human Parainfluenza Virus Types 1, 2 and 3 by Multiplex Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction – Enzyme Hybridization Assay (Hexaplex). **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 26, n. 6, p. 1397 – 1402, 1998.

FAO. Manual de técnicas de diagnóstico virológico. Red de Cooperacion Técnica entre Laboratórios de Investigacion y Diagnóstico Veterinário. Food and Agricultura Organization, Roma, 1990.

FIORE, A. E. et al. Outbreak of pneumonia in a long-term care facility: antecedent human parainfluenza virus 1 infection may predispose to bacterial pneumonia. **Journal of The American Geriatrics Society**, New York, v. 46, n. 9, p. 1112-1117, 1998.

FRANKOVA, V.; HOLUBOVA, J.; GRUBHOLFER, I.; KASOVA, U. Contribution to laboratory diagnosis of mumps and parainfluenza. **Acta Virology**, Sinicae, v. 32, n. 6, p. 503-514, 1988.

FRAYHA, J. S. et al. Nasopharyngeal swabs and nasopharyngeal aspirates equally effective for the diagnosis of viral respiratory disease in hospitalized children. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n.6, p. 1387-1389, 1989.

FREYMUTH, F. et al. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. **Clinical And Diagnostic Virology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 31-40, 1997.

FRYER, A. D.; JACOBY, O.B. Parainfluenza virus infection damages inhibitory M₂ muscarinic receptors on pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. **Pharmacology**, Bethesda, v. 102, p. 267-271, 1991.

FUKUMI, H.; NISHIKAWA, F.; SUGIYAMA, T. An epidemic due to HA2 virus in an elementary school in Tokyo. **Japanese Journal Of Medical Science And Biology**, Tokyo, v. 12, p. 307-317, 1959.

GAO, J. et al. Human parainfluenza virus type 3 inhibits gamma interferon induced major histocompatibility complex class II expression directly and by inducing alpha/beta interferon. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 3, p. 1124-1131, 2001.

GARCIA, Z.; BANKOWSKI, R. A. Comparison of a tissue-culture virus neutralization test and enzyme linked immunosorbent assay for measurement of antibodies to infectious bronchitis. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 25, p. 121-130, 1981.

GARDNER, S. D. The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of their prevalence. **Journal Of Hygiene**, Cambridge, v. 67, n. 3, p. 545-550, 1969.

GLEZEN, W. P. et al. Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 150, n. 6, p. 851-857, 1984.

GONÇALVES, D. A. et al. Isolation of bovine parainfluenza vírus type 3, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Virus Reviews and Research**, São Paulo, v. 6, p.139, 2001.

GONÇALVES, D. A. et al. Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 953-956, 2003.

GOSWAMI, K. K. A.; RUSSELL, W. C. A comparison of Paramyxoviruses by immunoprecipitation. **Journal Of General Virology**, London, v. 60, p. 177-183, 1982.

GRAHAM, D. A. et al. Isotype- and subclass-specific responses to infection and reinfection with parainfluenza-3 virus: comparison of the diagnostic potential of ELISAs detecting seroconversion and specific IgM and IgA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 11, n. 2, p. 127-133, 1999.

GRAHAM, D. A. et al. Evaluation of a single dilution ELISA system for detection of seroconversion to bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus: comparison with testing by virus neutralization and hemagglutination inhibition. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 10, n. 1, p. 43-48, 1998.

GREENBERG, S. B. Viral pneumonia. **Infectious Disease Clinics of North América**, Philadelphia, v. 5, p. 603-621, 1991.

HALL, C. B. et al. Parainfluenza viral infections in children: correlation of shedding with clinical manifestations. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 91, n. 2, p. 194-198, 1977.

HAMBLING, M. H. Survival of the respiratory syncytial virus during storage under various conditions. **British Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 45, p. 647-655, 1964.

HAMPARIAN, V. V.; HILLEMANN, M. R.; KETLER, A. Contributions to characterization and classification of animal viruses. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 112, p. 1040-1050, 1963.

HAY, R. J. Operator-induced contamination in cell culture systems. **Developments in Biological Standardization**, Basel, v. 75, p. 193-204, 1991.

HE, B. et al. The SH integral membrane protein of the paramyxovirus simian virus 5 is required to block apoptosis in MDBK cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 9, p. 4068-4079, 2001.

HENDERSON, F. W. Pulmonary cell-mediated cytotoxicity in hamsters with parainfluenza virus type 3 pneumonia. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 120, n. 1, p. 41-47, 1979.

HENRICKSON, K. J. Viral pneumonia in children. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 9, p. 227-233, 1998.

HENRICKSON, K. J. Monoclonal antibodies to human parainfluenza virus type 1 detect major antigenic changes in clinical isolates. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 164, n. 6, p. 1128-1134, 1991.

HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. L. Two distinct human parainfluenza virus type one genotypes detected during the 1991 epidemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 695-700, 1996.

HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. Genetic variation and evolution of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin neuraminidase: analysis of 12 clinical isolates. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 166, n. 5, p. 995-1005, 1992.

HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. L. Antigenic structure, function, and evolution of the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 1. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.176, n. 4, p. 867-875, 1997.

HENRICKSON, K. J.; KUHN, S. M.; SAVATSKI, L. L. Epidemiology and cost of human parainfluenza virus type one and two infections in young children. **Clinical of Infectious Disease**, Chicago, v. 18, p. 770-779, 1994.

HERRMANN, E. C.; HABLE, K. A. Experiences in laboratory diagnosis of parainfluenza viruses in routine medical practice. Mayo. **Clinical Proceedings**, Cape Town, ZA, v. 45, n. 3, p. 177-188, 1970.

HERVATH, G. M. et al. Sensitivity of NCI-H292 human lung mucoepidermoid cells for respiratory and other human viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 6, p.1504-1510, 1993.

HINDIYEH, M.; HILLYARD, D.; CARROLL, K. Evaluation of the Prodesse Hexaplex multiplex PCR assay for direct detection of seven respiratory viruses in clinical specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 116, n. 2, p. 218-224, 2001.

HORTAL, M. et al. Etiology and severity of community acquired pneumonia in children from Uruguay: a 4 year study. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, São Paulo, v. 36, p. 255-264, 1994.

HOU, S.; DOHERTY, P. C.; ZIJLSTRA, KATZ, J. M. Delayed clearance of Sendai virus in mice lacking class 1 MHC-restricted CD8+ T cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 149, n. 4, p. 1319-1325, 1992.

Houben, S.; Callebaut, P.; Pensaert, M. B. Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 125-128, 1997.

Howe, C. Morphogenesis of type 2 parainfluenza virus examined by light and electron microscopy. **Journal of Virology**, Washington, v. 1, n. 1, p. 215-237, 1967.

HU, X.; RAY, R.; COMPANS, R. W. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1528-1534, 1992.

HURRELL, J. M. Methods of storing viruses at low temperatures with particular reference to the Myxovirus group. **Journal of Medical Laboratory Technology**, London, v. 24, n. 1, p. 30-41, 1967.

JENNINGS, L. C. et al. Acute respiratory tract infections of children in hospital: a viral and mycoplasma pneumoniae profile. **The New Zealand Medical Journal**, Christchurch, v. 98, n. 783, p. 582-585, 1985.

JOHNSON, K. M. et al. Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 71, p. 81, 1960.

JOHNSON, D. P.; GREEN, R. H. Viremia during parainfluenza type 3 virus infection of hamsters. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 144, n. 3, p. 745-748, 1973.

JOO, H. S.; DONALDSON-WOOD, C. R.; JOHNSON, R. H. A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 52, p.422-424, 1976.

JULKUNEN, I. Serological diagnosis of parainfluenza virus infections by enzyme immunoassay with special emphasis on purity of viral antigens. **Journal Of Medical Virology**, New York, v. 14, p. 177-187, 1984.

KAPIL, S.; BASARABA, R. J. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus. **The Veterinary Clinics Of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v.13, p.455-469, 1997.

KARIM, A. et al. Serologic epidemiological study of parainfluenza 1,2, and 3viruses in beef cattle in Illinois. **Research Communications in Clinical Pathology and Pharmacology**, Westbury, v. 47, v. 3, p. 437-440, 1985.

KARRON, R. A. et al. Rapid detection of parainfluenza type 3 virus RNA in respiratory specimens: use of reverse transcription–PCR-enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 484-488, 1994.

KARRON, R. A.; MAKHENE, M.; GAY, K. Evaluation of a live attenuated bovine parainfluenza type 3 vaccine in two-to-six-month old infants. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 15, p. 650-654, 1996.

KASEL, J. A. et al. Acquisition of serum antibodies to specific viral glycoproteins of parainfluenza virus 3 in children. **Journal of Virology**, Washington, v. 52, p. 828-832, 1984.

KELLNER, G. et al. Contribution of rhinoviruses to respiratory viral infections in childhood. A prospective study in a mainly hospitalized infant population. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 25, p. 455-469, 1988.

KIM, M. R.; LEE, H. R.; LEE, G. M. Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. **The Journal of Infection**, London, v. 41, p. 152-158, 2000.

KIMMEL, K. A.; WYDE, P. R.; GLEZEN, W. P. Evidence of a T-cell-mediated cytotoxic response to parainfluenza virus type 3 pneumonia in hamsters. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, Winston-Salem, v. 31, p. 71-83, 1982.

KINGSBURY, D. W. **The paramyxoviruses**. In: *The molecular biology of animal viruses*, p349-382. Marcel Decker, Inc., New York, p349-382 1977.

KOMADA, H. et al. Strain variation in parainfluenza virus type 4. **Journal Of General Virology**, London, v. 71, p. 1581-1583, 1990.

KOMADA, H. et al. Antigenic diversity of human parainfluenza virus type 1 isolates and their immunological relationship with Sendai virus revealed by monoclonal antibodies. **Journal Of General Virology**, London, v. 73, p. 875-884, 1992.

KORPPI, M. et al. Viral findings in children under the age of two years with expiratory difficulties. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 75, p. 457-464, 1986.

KUMAR, S. et al. **MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software**. Arizona: Arizona State University, v.17, p. 1244-1245, 2001.

LAMB, R. A. ; MAHY, B. W. J.; CHOPIN, P. W. The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. **Virology**, Orlando, v. 69, p. 116-131, 1976.

LAMB, R. A. Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: Factors influencing formation of syncytia. **Journal of Virology**, Washington, v. 66, p. 4564-4569, 1992.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In.: FIELDS, B. (Ed.) **Fields virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v. 1. p.1205-1242.

LENETTE, E. H. et al. Serologic responses to parainfluenza viruses in patients with mumps virus infection. **Journal Of Laboratory And Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 61, p. 780-788, 1963.

LIGGIT, D.; HUSTON, L.; SILFLOW, R. Impaired function of bovine alveolar macrophages infected with parainfluenza -3 virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, p. 1740-1744, 1985.

LINQUIST, S. W. et al. Parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 16, p. 34-38, 1997.

LIOLIOS, L. et al. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 2779-2783, 2001.

MARKS, M. I.; NAGAHAMA, I. I.; ELLER, J. J. Parainfluenza virus immunofluorescence. In vitro and clinical application of the direct method. **Pediatrics**, New York, v. 48, p. 73-78, 1971.

MARKWELL, M. A. K. New frontiers opened by the exploration of host cell receptors. In: KINGSBURY, D.W. (Ed.). **The paramyxoviruses**. New York: Plenum, 1991. p. 407-425.

MARX, A. et al. Parainfluenza virus infection among adults hospitalized for lower respiratory tract infection. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 29, p. 134-140, 1999.

MC LEAN, O. M.; BANNATYNE, R. M.; GIVAN, K. F. Myxovirus dissemination by air. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 96, p.1449-1453, 1967.

MCCULLOUGH, S. J.; ADAIR, B. M.; MCKILLOP, E. R. A survey of serum antibodies to respiratory viruses in cattle in Northern Ireland. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 41, p. 342-344, 1987.

MCINTOSH, K. Pathogenesis of severe acute respiratory infections in the developing world: respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. **Reviews Of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, p. 492-500, 1991.

MO, X. Y.; SARAWAR, S. R.; DOHERTY, P. C. Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, p. 1288-1291, 1995.

MORIMOTO, Y.; DOI, Y.; ITOH, H. Effect of trypsin on reproduction of type 4 parainfluenza virus in vero cell cultures under fluid overlay. **Japanese Journal Of Medical Science And Biology**, Tokyo, v. 23, p. 1-11, 1970.

MORRISON, T.; MCQUAIN, C.; MCGINNES, L. Complementation between avirulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector: Requirements for membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, p. 813-822, 1991.

MOSCONA, A; PELUSO, R. W. Fusion properties of cells infected with human parainfluenza virus type 3: receptor requirements for viral spread and virus-mediated membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington, v. 66, p.6280-6287, 1992.

MOUNTS, A. W. Virus nosocomial study group. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 183, p. 810-813, 2001.

MURPHY, B. et al. Seasonal pattern in childhood viral lower respiratory tract infections in Melbourne. **Medical Journal Of Australia**, Sydney, v. 1, p. 22-24, 1980.

MURPHY, T. F. et al. Pneumonia: an eleven year study in a pediatric practice. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 113, p. 12-21, 1981.

MURPHY, F. A. et al. Paramyxoviridae. In.: *Veterinary Virology*. 3^a ed. p. 411-428, 1999.

NEUMANN, G.; WHITT, M. A.; KAWAOKA, Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA – what have we learned? **Journal of General Virology**, London, v. 83, p. 2635-2662, 2002.

NICHOL, S. T; ARIKAWA, J; KAWAOKA, Y. Emerging viral diseases. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 97, p. 12411-12412, 2000.

NOHYNEK, H. et al. The causes of hospital-treated acute lower respiratory tract infection in children. **American Journal Of Diseases Of Children**, Chicago, v. 145, p. 618-622, 1991.

OSIOWY, C. Direct Detection of Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza Virus, and Adenovirus in Clinical Respiratory Specimens by a Multiplex Reverse Transcription-PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 3149-3154, 1998.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods in Enzymology**, New York, v.276A, 307-326, 1997.

PALESE, P. et al. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. **Virology**, Orlando, v. 61, p. 397-410, 1974.

PELTOLA, V.; HEIKKINEN, T.; RUUSKANEN, O. Clinical courses of croup caused by influenza and parainfluenza viruses. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 21, p. 76-78, 2002.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. Viral diseases characterized by respiratory signs. In.: **VETERINARY medicine**. 8th ed. [s.l.]: Baillière Tindall, 1994. 1763 p.

REBHUN, W. C.; CHUCK, G.; RICHARDS, C.M. **Diseases of dairy cattle**. London: William & Wilkins, 1995. 530 p.

REISINGER, R. C.; HEDDLESTON, K. L.; MANTHEI, C. A. A. Myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. **Journal of the American Medical Association**, New York, v. 135, v. 3, p.147-152, 1959.

SAKAI, Y. et al. Nucleotide sequence of the bovine parainfluenza 3 virus genome: it's 3' end and the genes of NP, P, C and M proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 15, p. 2927-2944, 1987.

SAKAI, Y.; SHIBUTA, H. Syncytium formation by recombinant vaccine viruses carrying bovine parainfluenza 3 virus envelope proteins genes. **Journal of Virology**, Washington, v. 63, p. 3661-3668, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Habor Laboratory , 1989. 3.v.

SATTAR, S. A.; BOHL, E. H.; SENTURK, M. Viral causes of bovine abortion in Ohio. **Journal of the American Medical Association**, New York, v. 147, p. 1207-1210, 1965.

SATTAR, S. A. et al. *In utero* infection of bovine fetuses with *Myxovirus parainfluenza-3*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 28, p. 45-49, 1967.

SCHIMIDT, N. J.; EMMONS, R. W. Parainfluenza virus, mumps virus and newcastle disease virus. In.: DIAGNOSTIC procedures for viral, rickettsial and chlamydial infection. 6th ed. New York: American Public Health Association, 1989. 978 p.

SHAY, D. K. et al. Bronchiolitis-associated hospitalization among US children, 1980-1996. **JAMA**, Chicago, v. 282, p. 1440-1446, 1999.

SHIMOKATA, K. et al. Plaque formation by human-origin parainfluenza type 2 virus in established cell lines. **Archives Of Virology**, New York, v. 67, p. 355-360, 1981.

SILVA, A. D. et al. Isolamento do vírus parainfluenza tipo 3 em aborto bovino no estado de Goiás (GO). In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29; **Resumos**, Gramado, RS, 2002.

SOLIMAN, A. K. et al. Application of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of arboviral antibodies. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 147-151, 1997.

SPRINGS, M. K. et al. Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses contributions or the individual proteins to host immunity. **Journal of Virology**, Orlando, v. 61, p. 3416-3423, 1987.

ST. GEORGE, T. D. A. Bovine strain of myxovirus parainfluenza type 3- experimental transmission and a survey of antibodies in cattle in Australia and New Guinea. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 45, p. 315-320, 1969.

STOKES, A. et al. The complete nucleotide sequence of JS strain of human parainfluenza virus type 3: comparison with the Wash/47855/57 prototype strain. **Virus Research**, Amsterdam, v. 25, p. 91-103, 1992.

STONE-HULSLANDER, J.; MORRISON, T. G. Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. **Journal of Virology**, Orlando, v. 71, p. 6287-6295, 1997.

STOREY, D. G.; DIMOCK, K.; KANG, C. Y. Structural characterization of virion proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3. **Journal of Virology**, Orlando, v. 52, p. 761-766, 1984.

STOREY, D. G. et al. Nucleotide sequence of the coding and flanking regions of the human parainfluenza virus 3 hemagglutinin-neuraminidase gene: comparison with other paramyxoviruses. **Intervirology**, Basel, v. 27, p. 69-80, 1987.

STRALIOTTO, S. M. Study of Viral Etiology in Children with Acute Respiratory Infection in Southern Brazil: 1990-1992. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.4, p. 238-291,2002.

SWIERKOSZ, E. M. et al. Isolation and Characterization of a Naturally Ocurring Parainfluenza 3 Virus Variant. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1829-1841, 1995.

SWIFT, B. L.; KENNEDY, P. C. Experimentally induced infection of *in utero* bovine fetuses with bovine parainfluenza 3 virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 33, p. 57-63, 1972.

TAKIMOTO, T. et al. Crystallization of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein. **Virology**, Orlando, v. 270, p. 208-214, 2000.

THOMPSON, J. D. et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TREMONTI, L. P.; LIN, J. S.; JACKSON, G. G. Neuttralizng activity in nasal secretions and serum in resistance of volunteers to parainfluenza virus type 2. **Journal of Imunnology**, Baltimore, v. 101, p. 572-577, 1968.

TSAI, H. P. et al. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 111-118, 2001.

TSURUDOME, M. Extensive antigenic diversity among human parainfluenza type 2 virus isolates and immunological relationships among paramyxoviruses revealed by monoclonal antibodies. **Virology**, Orlando, p. 171, p. 38-48, 1989.

UPHOFF, C. C., DREXLER, H. G. Detection of mycoplasma contaminations. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 290, p. 13-23, 2005.

USDA. **Supplemental assay method for titration of parainfluenza-3 neutralizing antibody**. Washington: Department of Agriculture, 1983. 7 p.

VAINIONPÄÄ, R.; HYYPIÄ, T. Biology of Parainfluenza Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, n. 2, p. 265–275, 1994.

VAN DER LOGI, J. T.; VAN LOON, A. M.; VAN DER VEEN, J. Detection of parainfluenza IgM antibody by hemadsorption immunosorbent technique. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 10, p. 213-221, 1982.

VAN WYKE COELINGH, K. L.; WINTER, C. C.; MURPHY, B. R. Antigenic variation in the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza type 3 virus. **Virology**, Orlando, v. 143, p. 569-582, 1985.

VASANTHA, S. et al. Interactions of a nonneutralizing IgM antibody and complement in parainfluenza virus neutralization. **Virology**, Orlando, v. 167, p. 433-441, 1988.

VUORINEN, T.; MEURMAN, O. Enzyme immunoassays for detection of IgG and IgM antibodies to parainfluenza types 1, 2 and 3. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 23, p. 63-70, 1989.

WANER, J. L. Production of monoclonal antibodies against parainfluenza 3 Virus and their use in diagnosis by immunofluorescence. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. , p.535-538, 1985.

WANER, J. L. Parainfluenza Viruses. In.: MURRAY, P. R. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. New York: American Society for Microbiology, 1999. 1157 p.

WASHBURNE, J. F.; BOCCHINI, J. A.; JAMISON, R. M. Summertime respiratory syncytial virus infection: epidemiology and clinical manifestations. **Southern Medical Journal**, Birmingham, v. **85**, p. 579-583, 1992.

WECHSTER, S. L. et al. Human parainfluenza virus 3: purification and characterization of subviral components, viral proteins and viral RNA. **Virus Research**, Amsterdam, p. 339-351, 1985.

WELLIVER, R. C. et al. Role of parainfluenza virus-specific IgE in pathogenesis of croup and wheezing subsequent to infection. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 101, p. 889-896, 1982.

WELLIVER, R. et al. Natural history of parainfluenza virus infection in childhood. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 101, p. 180-187, 1982.

WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z. M. T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus da diarreia a vírus-enfermidade das mucosas dos bovinos, no estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Guaíba, v.1, p.52-58, 1972.

WON, P. C. Y. et al. Adult croup: a rare but more severe condition. **Respiration**, Basel, v. 67, p. 684-688, 2000.

WONG, D. T. et al. Rapid diagnosis of parainfluenza virus infection in children. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 16, p. 164-167, 1982.

WOODS, G. T. et al. Effect of vaccination against bovine myxovirus parainfluenza-3 before weaning and at the time of weaning on the natural history of respiratory disease in beef calves. **American Review Of Respiratory Disease**, New York, v. 95, p. 278-284, 1967.

YAO, Q; HU, X; COMPANS, R. W. Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, p. 650-656, 1997.

ZIELINSKA-JENCZYTIK, J. The influence of environment on parainfluenza 3 virus and its replication in tissue cultures. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, Olympia WA, v. 20, p. 525-542, 1972.

Z11575 AGACAAATCCAAATTCGAGA-TGGAATACTGGAAGCATAACCAATCACGGAAAGGATGCTG
M21649 AGACAAATCCAAATCCGAGA-TGGAATACTGGAAGCACACCAATCACGGAAAGGATGCTG
NC001796 AGACAAATCCAAATTCGAGA-TGGAATACTGGAAGCATAACCAATCACGGAAAGGATGCTG
ABO12132 AGACAAATCCAAATTCGAGA-TGGAATACTGGAAGCATAACCAATCACGGAAAGGATGCTG
AF178655 AGGCGACACCGAACCCAAAAATGGAATATTGGAAACACACAAACAGCACAAAAAACACCA
178654 AGGCGACACCAAACCTCAAAAATGGAATATTGGAAACACACAAACAGCATAAATAACACCA
D84095 AGACGACACCAAATTCAAAAATGGAATATTGGAAACACACAAACAGCACAAAGGACACTA

** * * * * ** * * * * * ** *

Z11575 GTAATGAGCTGGAGACGTCTATGGCTACTCATGGCAACAAGCTCACTAATAAGATAATAT
M21649 GTAATGAGCTGGAAACATCCATGGCTACTCATGGCAACAAGATCACCAACAAGATAACAT
NC001796 GTAATGAGCTGGAGACGTCCATGGCTACTCATAACAACAAGCTCACTAATAAGATAATAT
ABO12132 GTAATGAGCTGGAGACGTCCATGGCTACTCATAACAACAAGCTCACTAATAAGATAATAT
AF178655 ACAATGAAACCGAAACAACCAGAGGCAAACACAGTAGCAAGGTTACAAATATCATAATGT
178654 ACAATGAAACCGAAACAGCCAGAGGCAAACATAGTAGCAAGGTTACAAATATCATAATGT
D84095 ACAATGAACTTGGGACAACCAGAGACAGACACAGCAGCAAAGCCACAAATATCATAATGT

***** *

Z11575 ACATATTATGGACAATAATCCTGGTGTTATTATCAATAGTCTTCATCATAGTGCTAATTA
M21649 ATATATTATGGACAATAATCCTGGTGTTATTATCAATAGTCTTCATCATAGTGCTAATTA
NC001796 ATATATTATGGACAATAATCCTGGTGTTATTATCAATAGTTTTTCATCATAGTGCTAATTA
ABO12132 ATATATTATGGACAATAATCCTGGTGTTATTATCAATAGTTTTTCATCATAGTGCTAATTA
AF178655 ACACCTTCTGGACAATAACATCAACAATATTATTAGTCATTTTTATAATGATATTGACAA
178654 ACACCTTCTGGACAATAACATTAACAATATTATCAGTCATTTTTATAATGATATTGACAA
D84095 ACATCTTCTGGACAACAACATCAACAATATTATCAGTCATTTTTATAATGATATTGATAA

* * * * * ** *

Z11575 ATTCCATCAAAAAGTGAAAAGGCCACGAATCATTGCTGCAAGACATAAAATAATGAGTTTA
M21649 ATTCCATCAAAAAGTGAAAAGGCCATGAATCATTGCTACAAGACGTAAACAATGAGTTTA
NC001796 ATTCCATCAATAGTGAAAAGGTCCATAATTCATTGCTACAAGAAATAAAATAATGAGTTTA
ABO12132 ATTCCATCAATAGTGAAAAGGTCCATAATTCATTGCTACAAGAAATAAAATAATGAGTTTA
AF178655 ACTTAATTCAAGAGAACAATCATAATAAAATTAATGTTGCAGGAAATAAGAAAAGAATTCG
178654 ACTTAATTCAAGAGAACAATCATAATAAAATTAATGTTGCAGGAAATAAGAAAAGAATTCG
D84095 ATTTAATTCAAGAGAACAATCACAAATTAATGTTGCAGGAAATAAGGAAAGAATTCG

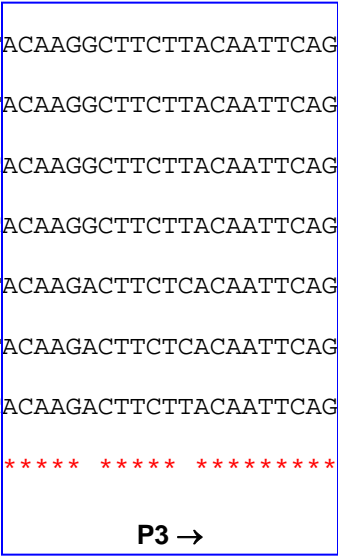
* *

Z11575 TGGAAATTACAGAAAAGATCCAAATGGCATCGGATAATACCAATGATCTAATACAGTCAG
M21649 TGGAGTTACAGAAAAGATCCAAATGGCATCGGATAATATTAATGATCTAATACAGTCAG
NC001796 TGGAGATTACAGAAAAGATCCAAATGGCATCGGATAATACCAATGATCTAATACAGTCAG
ABO12132 TGGAGATTACAGAAAAGATCCAAATGGCATCGGATAATACCAATGATCTAATACAGTCAG
AF178655 CGGCAATAGACACCAAGATTCAGAGGACCTCGGATGACATTGGAACCTCAATACAGTCAG
178654 CGGCAATAGACACCAAGATTCAGAGGACTTCGGATGACATTGGAACCTCAATACAGTCAG
D84095 CAGCAATAGATACCAAATTCAAAAGACCTCAGATGACATTGGTACCTCAATACAATCAG

* *

Z11575 GAGTGAATACAAGGCTTCTTACAATTCAGAGTCATGTCCAGAATTACATACCAATATCAT
M21649 GAGTGAATACAAGGCTTCTTACAATTCAGAGTCATGTCCAGAATTATATACCGATATCAT
NC001796 GAGTGAACACAAGGCTTCTTACAATTCAGAGTCATGTCCAGAATTATATACCAATATCAT
ABO12132 GAGTGAACACAAGGCTTCTTACAATTCAGAGTCATGTCCAGAATTATATACCAATATCAT
AF178655 GAATAAATACAAGACTTCTCACAATTCAGAGTCATGTTCAAACTATATCCCCTATCAC
178654 GAATAAATACAAGACTTCTCACAATTCAGAGTCATGTTCAAACTATATCCCCTATCAT
D84095 GAATAAACACAAGACTTCTTACAATTCAGAGTCATGTTCAAACTATATTCATTATCAT

* *



P3 →

Z11575 TAATGCCAGGGCCGGGATTATTAGCTATGCCAACGACTGTTGATGGCTGTGTTAGAACTC
M21649 TAATGCCAGGGCCGGGATTATTAGCTATGCCAACGACTGTTGATGGCTGTGTTAGAACTC
NC001796 TAATGCCAGGGCCGGGATTATTAGCCATGCCAACGACTGTTGATGGCTGTGTCAGAACTC
ABO12132 TAATGCCAGGGCCGGGATTATTAGCCATGCCAACGACTGTTGATGGCTGTGTCAGAACTC
AF178655 TAATACCAGGGCCAGGTTTATTAGCAACATCTACTACAGTAAATGGCTGTATTAGAATCC
178654 TAATACCAGGACCAGGTTTATTAGCAACATCTACTACAGTAAATGGCTGTATTAGAATTC
D84095 TAATACCAGGGCCAGGTTTATTAGCAACATCCACTACTGTAAATGGCTGCATTAGACTCC

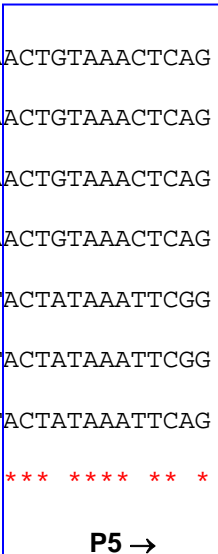
**** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * *

Z11575 CGTCTTTAGTTATAAATGATCTGATTTATGCTTATACCTCAAATCTAATTACTCGAGGTT
M21649 CGTCCTTAGTTATAAATGATCTGATTTATGCTTATACCTCAAATCTAATTACTCGAGGTT
NC001796 CGTCCTTAATTATAAATGATCTGATTTATGCTTATACCTCAAATCTAATTACTCGAGGTT
ABO12132 CGTCCTTAATTATAAATGATCTGATTTATGCTTATACCTCAAATCTAATTACTCGAGGTT
AF178655 CATCGTTAGCAATCAATCATTTAATCTACGCTTACACCTCTAATCTTATCACCCAGGGCT
178654 CATCGTTAGTAATCAATCATCTAATCTATGCTTACACCTCTAATCTTATTACCCAGGGCT
D84095 CATCTTTAGCAATCAATAATCTAATCTACGCTTACACCTCTAATCTTATTACCCAGGGCT

* *

Z11575 GTCAGGATATAGGAAAATCATATCAAGTCTTACAGATAGGGATAATAACTGTAAACTCAG
M21649 GCCAGGATATAGGAAAATCATATCAAGTATTACAGATAGGGATAATAACTGTAAACTCAG
NC001796 GTCAGGATATAGGAAAATCATACCAAGTCTTACAGGTAGGGATAATAACTGTAAACTCAG
ABO12132 GTCAGGATATAGGAAAATCATACCAAGTCTTACAGGTAGGGATAATAACTGTAAACTCAG
AF178655 GTCAAAATATAGGAAAATCTTACCAAGTACTACAAAATAGGGATAATTAATAATAATTCGG
178654 GTC AAGATATAGGAAAATCTTACCAAGTACTACAAAATAGGGATAATTAATAATAATTCGG
D84095 GTC AAGATATAGGAAAATCTTACCAAGTACTACAAAATAGGGATAATTAATAATAATTCAG

* *



Z11575 ACTTGGTACCTGACTTAAATCCTAGGATCTCTCATACTTTAACATAAAATGACAATAGGA
M21649 ACTTGGTACCTGACTTAAATCCTAGGATCTCTCATACTTTCAACATAAAATGACAATAGAA
NC001796 ACTTGGTACCTGACTTAAATCCCAGGTTCTCTCATACTTTCAACATAAAATGACAATAGGA
ABO12132 ACTTGGTACCTGACTTAAATCCCAGGTTCTCTCATACTTTCAACATAAAATGACAATAGGA
AF178655 ACCTAGTACCTGATTTAAATCCCAGAGTCACACATACATTTAATATTGATGATAATAGGA
178654 ACCTAGTACCTGATTTAAACCCCAGAGTCACACATACATTTAATATTGATGATAATAGAA
D84095 ATTTGGTACCTGATTTGAACCCCAAGAGTCACACATACATTTAATATTGATGACAATAGGA

* * ***** ** ** *

P5

Z11575 AGTCATGTTCTCTAGCACTCCTAAATACAGATGTATATCAACTGTGTTCAACTCCCAAAG
M21649 AGTCATGTTCTCTAGCACTCCTAAACACAGATGTATATCAACTGTGTTGCGACTCCCAAAG
NC001796 AGTCATGTTCTCTAGCACTCCTAAATACAGATGTATATCAACTGTGTTCAACTCCCAAAG
ABO12132 AGTCATGTTCTCTAGCACTCCTAAATACAGATGTATATCAACTGTGTTCAACTCCCAAAG
AF178655 AATCTTGCTCTCTGGCACTATTGAATACAGATGTTTATCAGTTATGCTCAACACCAAAG
178654 GATCTTGCTCTCTGGCACTATTGAATACAGATGTTTATCAGTTATGCTCAACACCAAAG
D84095 AATCCTGCTCCCTTGCACTATTGAACACAGATGTTTATCAACTATGTTCAACCCCAAAG

* *

← P4

Z11575 TTGATGAAAGATCAGATTATGCATCATCAGGCATAGAAGATATTGTACTTGATATTGTCA
M21649 TTGATGAAAGATCAGATTATGCATCATCAGGCATAGAAGATATTGTACTTGATATCGTCA
NC001796 TTGATGAAAGATCAGATTATGCATCATCAGGCATAGAAGATATTGTACTTGATATTGTCA
ABO12132 TTGATGAAAGATCAGATTATGCATCATCAGGCATAGAAGATATTGTACTTGATATTGTCA
AF178655 TTGATGAGAGATCCGATTATGCATCAACAGGTATTGAGGATATTGTACTTGACATTGTCA
178654 TTGATGAAAGATCCGATTATGCATCAACAGGTATTGAGGATATTGTACTTGACATTGTCA
D84095 TTGATGAGAGATCAGATTACGCATCAACAGGTATTGAGGACATTGTACTTGACATTGTCA

***** ***** ***** ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

P4

Z11575 ATTATGATGGTTCAATCTCAACAACAAGATTTAAGAATAATAACATAAGCTTTGATCAAC
M21649 ATCATGATGGTTCAATCTCAACAACAAGATTTAAGAACAATAATATAAGTTTTGATCAAC
NC001796 ATTATGATGGCTCAATCTCAACAACAAGATTTAAGAATAATAACATAAGCTTTGATCAAC
ABO12132 ATTATGATGGCTCAATCTCAACAACAAGATTTAAGAATAATAACATAAGCTTTGATCAAC
AF178655 CTAATAATGGATTAATTATAACAACAAGGTTTACAAATAATAATATAACTTTTGATAAAC
178654 CTAATAATGGATTAATTATAACAACAAGGTTTACAAATAATAATATAACTTTTGATAAAC
D84095 CTAGTAATGGATTAATTATAACAACAAGATTCACGAATAATAATATAACTTTTGATAAAC

* * **** * ** ***** ** * ** ***** **** ***** **

Z11575 CATATGCTGCACTATAACCCATCTGTTGGACCAGGGATATACTACAAAGGCAAAAATAATAT
M21649 CATATGCGGCATTATAACCCATCTGTTGGACCAGGGATATACTACAAAGGCAAAAATAATAT
NC001796 CCTATGCTGCACTATAACCCATCTGTTGGACCAGGGATATATTACAAAGGCAAAAATAATAT
ABO12132 CCTATGCTGCACTATAACCCATCTGTTGGACCAGGGATATATTACAAAGGCAAAAATAATAT
AF178655 CGTATGCAGCATTGTATCCATCAGTAGGACCAGGAATCTATTATAAGGGTAAAGTTATAT
178654 CGTATGCAGCATTGTATCCATCAGTGGGACCAGGAATCTATTATAAGGATAAAGTTATAT
D84095 CTTATGCAGCATTATATCCATCAGTAGGACCAGGAATATATTATAAAGACAAAGTTATCT

* ***** ** * ** ***** ** ***** ** ** * * * * * *** * * *

Z11575 TTCTCGGGTATGGAGGTCTTGAACATCCAATAAATGAGAATGTAATCTGCAACACAACCTG
M21649 TTCTCGGGTATGGAGGTCTTGAACATCCAATAAATGAGAATGCAATCTGCAACACAACCTG
NC001796 TTCTCGGGTATGGAGGTCTTGAACATCCAATAAATGAGAATGTAATCTGCAACACAACCTG
ABO12132 TTCTCGGGTATGGAGGTCTTGAACATCCAATAAATGAGAATGTAATCTGCAACACAACCTG
AF178655 TTCTCGGATATGGAGGTCTAGAGCATGAAGAAAACGGAGACGTAATATGTAATACAACCTG
178654 TTCTCGGATATGGAGGTCTAGAGCATGAAGAAAACGGAGACGTAATATGTAATACAACCTG
D84095 TCCTCGGATATGGAGGTCTAGAGCATGAAGAAAACGGGGACGTAATATGCAACACAACCTG

* ***** ***** ** ** * *** * * * ** ** ** *****

Z11575 TACTAGGTAACAAGATCTATATATATACAAGATCTACAAGTTGGCATAGCAAGTTACAAT
M21649 TACTAGGTAACAAGATCTATATATATACAAGATCTACAAGTTGGCATAGCAAGTTACAAT
NC001796 TACTAGGTAACAAGATCTATATATATACAAGATCTACAAGTTGGCATAGCAAATTACAAT
ABO12132 TACTAGGTAACAAGATCTATATATATACAAGATCTACAAGTTGGCATAGCAAATTACAAT
AF178655 TATTAGGTGACAGAATATACATATATACTAGATCCACAAGTTGGCACAGTAAATTACAGT
178654 TATTAGGTGACAGAATATACATATATACTAGATCCACAAGTTGGCACAGTAAATTACAGT
D84095 TATTAGGTGACAGAATATACATATATACTAGATCTACGAGTTGGCACAGTAAATTACAGT
** ***** ** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **
← P6

Z11575 TAGGAATAATTGATATTACTGATTACAGTGATATAAGGATAAAAATGGACATGGCATAATG
M21649 TAGGAATAATTGATATTACTGATTACAGTGATATAAGAATAAAAATGGACATGGCATAATG
NC001796 TAGGAATAATTGATATTACTGATTACAGTGATATAAGGATAAAAATGGACATGGCATAATG
ABO12132 TAGGAATAATTGATATTACTGATTACAGTGATATAAGGATAAAAATGGACATGGCATAATG
AF178655 TAGGGGTAATTGATATTTCTGATTATAATAATATAAGAATAAAATGGACTTGGCATAATG
178654 TAGGGGTAATTGATATTTCTGATTATACTAATAATAAGAATAAAATGGACTTGGCATAATG
D84095 TAGGGGTAATTGACATTTCTGATTTTAATAATATAAGAATAAAATGGACTTGGCATAATG
**** ***** ** ***** * * ***** ***** ***** *****

Z11575 TGCTATCAAGACCAGGAAACAATGAATGTCCATGGGGACATTCATGTCCAGATGGATGTA
M21649 TGCTATCAAGACCAGGAAACAATGAATGTCCATGGGGACATTCATGTCCAGATGGATGTA
NC001796 TGCTATCAAGACCAGGAAACGATGAATGTCCATGGGGACATTCATGTCCAAATGGATGTA
ABO12132 TGCTATCAAGACCAGGAAACGATGAATGTCCATGGGGACATTCATGTCCAAATGGATGTA
AF178655 TACTATCACGGCCAGGAAATGATGAATGTCCATGGGGTCATTCATGCCAGACGGATGTA
178654 TACTATCACGGCCAGGAAATGATGAATGTCCATGGGGTCATTCATGCCAGACGGATGTA
D84095 TACTATCACGGCCAGGAAATGATGAATGTCCATGGGGTCATTCATGCCAGACGGATGCA
* ***** * ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *

Z11575 TAACAGGAGTATATACTGATGCATATCCACTCAATCCCACAGGGAGCATTGTGTCATCTG
 M21649 TAACAGGAGTATATACTGATGCATATCCACTCAATCCCACAGGGAGCATTGTGTCATCTG
 NC001796 TAACAGGAGTATATACTGATGCGTATCCACTAAAATCCCACAGGGAGCATTGTGTCATCTG
 ABO12132 TAACAGGAGTATATACTGATGCGTATCCACTAAAATCCCACAGGGAGCATTGTGTCATCTG
 AF178655 TAACAGGAGTTTACACTGATGCATATCCGCTAAACCCATCGGGGAGTGTGTATCATCAG
 178654 TAACAGGAGTTTACACTGATGCATATCCGCTAAACCCATCGGGGAGTGTGTATCATCAG
 D84095 TAACAGGAGTTTACACTGATGCATATCCACTAAACCCATCAGGGAGTATTGTATCCTCAG

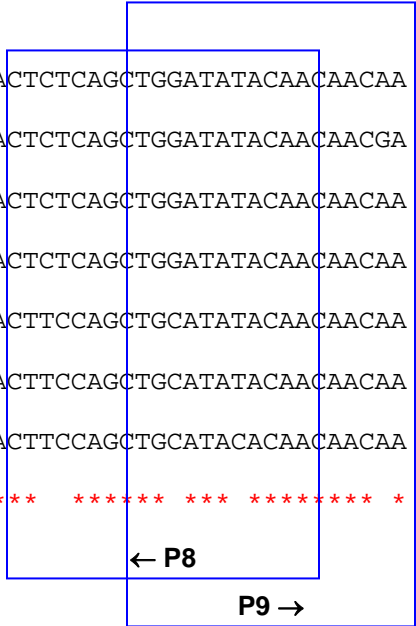
***** ** ***** ***** ** ** * ***** ***** ** ** *

Z11575 TCATATTAGACTCACAAAAATCGAGAGTGAACCCAGTCATAACTTACTCAACAGCAACCG
 M21649 TCATATTAGACTCGCAAAAAATCGAGAGTAAACCCAGTCATAACTTACTCAACATCAACTG
 NC001796 TCATACTAGACTCACAGAAAATCGAGAGTGAACCCAGTCATAACTTACTCAACAGCAACTG
 ABO12132 TCATACTAGACTCACAGAAAATCGAGAGTGAACCCAGTCATAACTTACTCAACAGCAACTG
 AF178655 TAATTCTTGACTCACAAAAGTCTAGAGAAAACCCAATCATTACCTACTCAACAGCTACAA
 178654 TAATTCTTGATTACAAAAGTCTAGAGAAAACCCAATCATTACTTACTCAACAGCTACAA
 D84095 TCATTCTTGATTACAAAATCCAGAGAAAACCCAATCATTACCTATTCAACAGCTACAA

* *

Z11575 AAAGAGTAAACGAGCTGGCCATCCTAAACAGAACA CTCTCAGCTGGATATACAACAACAA
 M21649 AAAGGGTAAACGAGCTGGCCATCCGAAACAAAACA CTCTCAGCTGGATATACAACAACGA
 NC001796 AAAGAGTAAACGAGCTGGCCATCAGAAACAGAACA CTCTCAGCTGGATATACAACAACAA
 ABO12132 AAAGAGTAAACGAGCTGGCCATCAGAAACAGAACA CTCTCAGCTGGATATACAACAACAA
 AF178655 ATAGAATAAATGAATTAGCTATATATAACAGAACA CTCTCAGCTGCATATACAACAACAA
 178654 ATAGAATAAATGAATTAGCTATATATAACAGAACA CTCTCAGCTGCATATACAACAACAA
 D84095 ATAGGGTAAATGAATTGGCTATATACAACAAGAACA CTCTCAGCTGCATACACAACAACAA

* *



Z11575 AGCA-ATCAGACAATAGACAAAAGGAAATATAAAAAACTTAGGAGCAAAGCGTGCTCGG
M21649 AGCA-ATCAGACAATAGATAAAAAGAGAAATATAAAAAACTTAGGAGCAAAGCATGCTCGA
NC001796 AGCA-ATCAGACAATGGACAAAAGGAAATATAAAAAACTTAGGAGCAAAGCGTGCTCGG
ABO12132 AGCA-ATCAGACAATGGACAAAAGGAAATATAAAAAACTTAGGAGCAAAGCGTGCTCGG
AF178655 AGGAGATGATGCAA--GATATAAAGGAATAATAAAAAACTTAGGAGAAAAGTGTGCAAGA
178654 AGGAGACGATGCAA--GATATAAAGAAATAATAAAAAACTTAGGAGAAAAGTGTGCAAGA
D84095 AGGAGATAATGCAA--GACACAAAAGAAATACAAAAAACTTAGGAGGAAAAGTGTGTACAA

** * * * * ** *

Z11575 GAAATGGACACTGAATCTAACAATGGCACTGTATCTGACATACTCTATCCTGAGTGTCCAC
M21649 AAAATGGACACTGAATCTAACAATGGCACTGTATCTGACATACTCTATCCTGAGTGTCCAC
NC001796 AAAATGGACACTGAATCTAACAATGGCACTGTATCTGACATACTCTATCCTGAGTGTCCAC
ABO12132 AAAATGGACACTGAATCTAACAATGGCACTGTATCTGACATACTCTATCCTGAGTGTCCAC
AF178655 AAAATGGACACTGAATCCCACAGCGGCACAACATCTGACATTCTGTACCCTGAAATGTCCAC
178654 AAAATGGACACCGAGTCCCACAGCGGCACAACATCTGACATTCTGTACCCTGAAATGTCCAC
D84095 GAGATGGACACCGAATCCCACAGCGGTACAACATCTGACATTCTGTATCCTGAAATGTCCAC

* *

P10

Z11575 CTTAACTCTCCTATCGTTAAAGGTAAAAATAGCACAATTACACACTATTATGAGTCTACCT
M21649 CTTAATTCTCCTATCGTTAAGGGTAAAAATAGCACAATTACACACTATTATGAGTCTACCA
NC001796 CTTAACTCTCCTATCGTTAAAGGTAAAAATAGCACAATTACACACTATTATGAGTCTACCT
ABO12132 CTTAACTCTCCTATCGTTAAAGGTAAAAATAGCACAATTACACACTATTATGAGTCTACCT
AF178655 CTCAATTCTCCTATAGTTAAAGGAAAAATAGCACAAGTGCATACAATAATGAGTTTGCC
178654 CTCAATTCTCCTATAGTTAAAGGAAAGATAGCACAAGTGCATACAATAATGAGTTTGCC
D84095 CTCAATTCTCCTATAGTTAAAGGCAAGATAGCACAAGTGCATACCATAATGAGTTTGCC

** *

← P10

Z11575	CAGC
M21649	CAGC
NC001796	CAGC
ABO12132	CAGC
AF178655	CAAC
178654	CAGC
D84095	CAAC

* * *

BLAST das seqüências de nucleotídeos da amostra DIO P3/P6 e amostra referência (SF-4) Genbank (nr. AF178655).

Homologia = 99%
Fragmneto = 989 bp

```

P3/P6: 1          ttcagagtcatggttcaaaactatatcccactatcactaacacaacaaatgtcagatctca 60
|
|
|
AF178655: 7104 ttcagagtcatggttcaaaactatatcccactatcactaacacaacaaatgtcagatctca 7163

P3/P6: 61          gaaaatttatcaatgatctaacaaataaaagagaaacatcaagaagtgccatacagagaa 120
|
|
|
AF178655: 7164 gaaaatttatcaatgatctaacaaataaaagagaaacatcaagaagtgccatacagagaa 7223

P3/P6: 121         tgactcatgatagaggtatagaaccctaaatccagacaagttctggaggtgtacatctg 180
|
|
|
AF178655: 7224 tgactcatgatagaggtatagaaccctaaatccagacaagttctggaggtgtacatctg 7283

P3/P6: 181         gtaaccatctctaacaagtagtcctaagataaggtaataaccagggccaggtttattag 240
|
|
|
AF178655: 7284 gtaaccatctctaacaagtagtcctaagataaggtaataaccagggccaggtttattag 7343

P3/P6: 241         caacatctactacagtaactggctgtattagaatcccatcgttagcaatcaatcatttaa 300
|
|
|
AF178655: 7344 caacatctactacagtaaatggctgtattagaatcccatcgttagcaatcaatcatttaa 7403

P3/P6: 301         tctacgcttacacctctaattcttatcaccagggctgtcaagatatagggaaatcttacc 360
|
|
|
AF178655: 7404 tctacgcttacacctctaattcttatcaccagggctgtcaaaatatagggaaatcttacc 7463

P3/P6: 361         aagtactacaaatagggataaataactataaaattcggacctagtagctgatttaaatccca 420
|
|
|
AF178655: 7464 aagtactacaaatagggataaataactataaaattcggacctagtagctgatttaaatccca 7523

P3/P6: 421         gagtcacacatacatttaaatattgatgataataggaaatcttgctctctggcactattga 480
|
|
|
AF178655: 7524 gagtcacacatacatttaaatattgatgataataggaaatcttgctctctggcactattga 7583

P3/P6: 481         atacagatgtttatcagttatgctcaacacccaaaagttgatgagagatccgattatgcat 540
|
|
|
AF178655: 7584 atacagatgtttatcagttatgctcaacacccaaaagttgatgagagatccgattatgcat 7643

P3/P6: 541         caacaggtattgaggatattgtacttgacattgtcactaataatggattaattataacaa 600
|
|
|
AF178655: 7644 caacaggtattgaggatattgtacttgacattgtcactaataatggattaattataacaa 7703

```

P3/P6: 601 caaggtttacaaataataatataacttttgataaacggtatgcagcattgtatccatcag 660
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AF178655: 7704 caaggtttacaaataataatataacttttgataaacggtatgcagcattgtatccatcag 7763

P3/P6: 661 taggaccaggaatctattataagggtaaagttatatttctcggatattggaggtctagagc 720
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AF178655: 7764 taggaccaggaatctattataagggtaaagttatatttctcggatattggaggtctagagc 7823

P3/P6: 721 atgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaactggttgtcctggcaaaacacagagag 780
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AF178655: 7824 atgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaactggttgtcctggcaaaacacagagag 7883

P3/P6: 781 actgtaatcaggcttcttatagcccatggttctcaaataggagaatggtaaactctatta 840
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AF178655: 7884 actgtaatcaggcttcttatagcccatggttctcaaataggagaatggtaaactctatta 7943

P3/P6: 841 ttgttgttgataaaggcatagatgcaacttttagcttgagggtgtggactattccaatga 900
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AF178655: 7944 ttgttgttgataaaggcatagatgcaacttttagcttgagggtgtggactattccaatga 8003

P3/P6: 901 gccaaaattattggggatcagaaggaagattacttttattaggtgacagaatatacatat 960
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AF178655: 8004 gccaaaattattggggatcagaaggaagattacttttattaggtgacagaatatacatat 8063

P3/P6: 961 atactagatccacaagttggcacagtaaa 989
||||||||||||||||||||||||||||||||
AF178655: 8064 atactagatccacaagttggcacagtaaa 8092

BLAST das seqüências de nucleotídeos da amostra DIO P3/P6 e amostra de bPIV-3 do Genbank (nr. AF178654).

Homologia = 98%

Fragmento = 989 bp

```

P3/P6: 1          ttcagagtcatggttcaaaactatatcccactatcactaacacaacaaatgtcagatctca 60
                |||
AF178654: 7104  ttcagagtcatggttcaaaactatatcccactatcattaacacaacaaatgtcagatctca 7163

P3/P6: 61          gaaaatttatcaatgatctaacaataaaaagagaacatcaagaagtgccaatacagagaa 120
                |||
AF178654: 7164  gaaaatttatcaatgatctaacaataaaaagagaacatcaagaagtgccaatacagagaa 7223

P3/P6: 121         tgactcatgatagaggtatagaaccctaaatccagacaagttctggaggtgtacatctg 180
                |||
AF178654: 7224  tgactcatgatagaggtatagaaccctaaatccaaacaagttctggaggtgtacatctg 7283

P3/P6: 181         gtaaccatctctaacaagtagtcctaagataaggttaataaccagggccagggtttattag 240
                |||
AF178654: 7284  gtaaccatctctaacaagtagtcctaagataaggttaataaccaggaccagggtttattag 7343

P3/P6: 241         caacatctactacagtaactggctgtattagaatcccatcgttagcaatcaatcatttaa 300
                |||
AF178654: 7344  caacatctactacagtaaatggctgtattagaattccatcgttagtaataatcaatcatctaa 7403

P3/P6: 301         tctacgcttacacctctaactcttattaccagggtgtcaagatatagggaatcttacc 360
                |||
AF178654: 7404  tctatgcttacacctctaactcttattaccagggtgtcaagatatagggaatcttacc 7463

P3/P6: 361         aagtactacaaatagggataaataactataaaattcggacctagtagctgatttaaatccca 420
                |||
AF178654: 7464  aagtactacaaatagggataaataactataaaattcggacctagtagctgatttaaaccca 7523

P3/P6: 421         gagtcacacatacatttaataattgatgataataggaaatcttgctctctggcactattga 480
                |||
AF178654: 7524  gagtcacacatacatttaataattgatgataatagaagatcttgctctctggcactattga 7583

P3/P6: 481         atacagatggtttatcagttatgctcaacacccaaaagttgatgagagatccgattatgcat 540
                |||
AF178654: 7584  atacagatggtttatcagttatgctcaacacccaaaagttgatgaaagatccgattatgcat 7643

P3/P6: 541         caacaggtattgaggatattgtacttgacattgtcactaataatggattaattataacaa 600
                |||
AF178654: 7644  caacaggtattgaggatattgtacttgacattgtcactaataatggattaattataacaa 7703

```

```

P3/P6: 601      caaggtttacaaataataatataacttttgataaacggtatgcagcattgtatccatcag 660
                |||
AF178654: 7704 caaggtttacaaataataatataacttttgataaacggtatgcagcattgtatccatcag 7763

P3/P6: 661      taggaccaggaatctattataagggtaaagttatatttctcggatattggaggtctagagc 720
                | |
AF178654: 7764 taggaccaggaatctattataagggtaaagttatatttctcggatattggaggtctagagc 7823

P3/P6: 721      atgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaactgggtgtcctggcaaacacagagag 780
                |||
AF178654: 7824 atgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaactgggtgtcctggcaaacacagagag 7883

P3/P6: 781      actgtaatcaggcttcttatagcccatgggttctcaaataggagaatggtaaactctatta 840
                |||
AF178654: 7884 actgtaatcaggcttcttatagcccatgggttctcaaataggagaatggtaaactctatta 7943

P3/P6: 841      ttgttgttgataaaggcatagatgcaacttttagcttgaggggtgtggactattccaatga 900
                |||
AF178654: 7944 ttgttgttgataaaggcatagatgcaacttttagcttgaggggtgtggactattccaatga 8003

P3/P6: 901      gccaaaattattggggatcagaaggaagattacttttattaggtgacagaatatacatat 960
                |||
AF178654: 8004 gccaaaattattggggatcagaaggaagattacttttattaggtgacagaatatacatat 8063

P3/P6: 961      atactagatccacaagttggcacagtaaa 989
                |||
AF178654: 8064 atactagatccacaagttggcacagtaaa 8092

```

BLAST das seqüências de nucleotídeos da amostra DIO P3/P6 e amostra de bPIV-3 do Genbank (nr. D84095).

Homologia = 91%
 Fragmento = 989 bp

```

P3/P6: 1      ttcagagtcaggttcaaaactatatcccactatcactaacacacaaaatgtcagatctca 60
             |||
D84095: 7128 ttcagagtcaggttcaaaactatatccattatcattaacacacaaaatgtcagatctca 7187

P3/P6: 61      gaaaatttatcaatgatctaacaataaaagagaacatcaagaagtccaatacagagaa 120
             |||
D84095: 7188 gaaaatttatcaacgatctcagcactaaaagagaacatcaagaggtaccaatacagagaa 7247

P3/P6: 121     tgactcatgatagaggtatagaaccctaaatccagacaagttctggaggtgtacatctg 180
             |||
D84095: 7248 tgactcatgatagtggtatagaacctctaaatccggacaaattctggagatgtacatctg 7307

P3/P6: 181     gtaaccatctctaacaagtagtcctaagataaggttaataccagggccagggtttattag 240
             |||
D84095: 7308 gtaatccatctttaacaagtagtcccaagataagactaataccagggccagggtttattag 7367

P3/P6: 241     caacatctactacagtaactggctgtattagaatcccatcggttagcaatcaatcatttaa 300
             |||
D84095: 7368 caacatccactactgtaaagtgctgattagactcccatcttagcaatcaataatctaa 7427

P3/P6: 301     tctacgcttacacctctaactcttatcaccagggctgtcaagatataggaaaatcttacc 360
             |||
D84095: 7428 tctacgcttacacctctaactcttattaccagggctgtcaagatataggaaaatcttacc 7487

P3/P6: 361     aagtactacaaaatagggaataattactataaattcggacctagtagctgatttaaatccca 420
             |||
D84095: 7488 aagtactacaaaatagggaataattactataaattcagatttggtacctgatttgaacccaa 7547

P3/P6: 421     gagtcacacatacatttaatttgatgataataggaaatcttgctctctggcactattga 480
             |||
D84095: 7548 gagtcacacatacatttaatttgatgacaataggaaatcctgctccttgactattga 7607

P3/P6: 481     atacagatgtttatcagttatgctcaacacccaaaagttgatgagagatccgattatgcat 540
             |||
D84095: 7608 acacagatgtttatcaactatggtcaaccccaaaaagttgatgagagatcagattacgcat 7667

P3/P6: 541     caacaggtattgaggatattgtacttgacattgtcactaataatggattaattataacaa 600
  
```

```
|||||
D84095: 7668 caacaggtattgaggacattgtacttgacattgtcactagtaatggattaattataacaa 7727

P3/P6: 601 caaggtttacaaataataatataacttttgataaacctatgcagcattgtatccatcag 660
|||||
D84095: 7728 caagattcacgaataataatataacttttgataaacctatgcagcattatatccatcag 7787

P3/P6: 661 taggaccaggaatctattataagggtaaagttatatttctcggatatggaggtctagagc 720
|||||
D84095: 7788 taggaccaggaatattataaaagacaaagttatcttctcggatatggaggtctagagc 7847

P3/P6: 721 atgaagaaaacgggagacgtaatatgtaatacaactggttgcctggcaaacacagagag 780
|||||
D84095: 7848 atgaagaaaacggggacgtaatatgcaacacaactggttgcctggcaaacacagagag 7907

P3/P6: 781 actgtaatcaggcttcttatagcccatggttctcaaataaggagaatggtaaactctatta 840
|||||
D84095: 7908 actgcaatcaggcctcttacagcccatggttctcaaataaggagaatggtaaattccatta 7967

P3/P6: 841 ttgttgttgataaaaggcatagatgcaacttttagcttgaggggtgaggactattccaatga 900
|
D84095: 7968 tcgttgttgataaaaggatagatacaaccttttagcttaagagtgtggactattccaatga 8027

P3/P6: 901 gccaaaattattggggatcagaaggaagattacttttattaggtgacagaatatacatat 960
|
D84095: 8028 gacaaaactattgggggtcagaaggaagactgcttttattaggtgacagaatatacatat 8087

P3/P6: 961 atactagatccacaagttggcacagtaaa 989
|||||
D84095: 8088 atactagatctacgagttggcacagtaaa 8116
```

BLAST das seqüências de nucleotídeos da amostra DIO P3/P6 e amostra de hPIV-3 do Genbank (nr. M18763).

Homologia = 79%
Fragmento = 647 bp

```

P3/P6: 336   tgtcaagatatagggaaatcttaccaagtactacaaatagggataaataactataaattcg 395
          ||||| ||||||| ||||||| || ||||||| ||||| ||||||| ||||| ||||| ||
M18763: 713   tgtcaggatatagggaaatcatatcaagtattacagatagggataataaactgtaaactca 772

P3/P6: 396   gacctagtacctgatttaaatcccagagtcacacatacatttaattgatgataatagg 455
          ||| | ||||||| ||||||| || | ||||| || || | ||||| |||||||
M18763: 773   gacttgtagctgacttaaatcccagagatctctcactttcaacataaatgacaatagg 832

P3/P6: 456   aatccttgctctctggcactattgaatacagatgtttatcagttatgctcaacacaaaa 515
          || | | ||||| ||||||| | ||||||| ||||| || ||||| || |||||
M18763: 833   aagtcattgttctctagcactcctaatacagatgtatatcaactgtgttcaactccaaa 892

P3/P6: 516   gttgatgagagatccgattatgcatcaacaggattaggatattgtacttgacattgtc 575
          ||||||| ||||| ||||||| ||||| || | ||||||| ||||||| |||||||
M18763: 893   gttgatgaaagatcagattatgcatcatcaggcatagaagatattgtacttgatattgtc 952

P3/P6: 576   actaataatggattaattataacaacaagggtttacaaataataataacttttgataaa 635
          | | | ||||| | ||| ||||||| ||||| ||||||| ||||||| ||
M18763: 953   aattatgatggctcaatctcaacaacaagatttaagaataataataaagttttgatcaa 1012

P3/P6: 636   ccgatgcagcattgtatccatcagtaggaccaggaatctattataagggtaaagtata 695
          || ||||| ||| | || ||||||| || ||||||| || || || || || || ||
M18763: 1013  ccttatgctgcactatacccatctgttgaccaggatataactacaaaggcaaaataata 1072

P3/P6: 696   tttctcggataggaggtctagagcatgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaact 755
          ||||||| ||||||| ||||||| || ||| | ||| | ||||| || || |||||||
M18763: 1073  tttctcgggtatggaggtcttgaacatccaataaatgagaatgtaatctgcaacacaact 1132

P3/P6: 756   ggttgtcctggcaaaacacagagagactgtaatcaggcttcttatagcccatggttctca 815
          || ||||| || ||||||| ||||||| ||||||| || ||||| ||||||| |||||
M18763: 1133  ggggtgtcccgggaaacacagagagactgcaatcaggcatctcatagtccatggttttca 1192

P3/P6: 816   aataggagaatggtaaactctattattgttggtgataaaggcatagatgcaacttttagc 875
          ||||||| ||||| ||||| || ||||||| ||||||| || | ||||| |
M18763: 1193  gataggaggatgggtcaactccatcatgtgttggtgacaaaggcttaaactcaattccaaa 1252

P3/P6: 876   ttgaggggtgtggactattccaatgagccaaaattattggggatcagaaggaagattactt 935
          ||||| ||| ||||| || | ||||| ||||||| ||||| ||||||| |||||||
M18763: 1253  ttgaaggtatggacgatctatgagacaaaattactgggggtcagaaggaaggttactt 1312

```

```
P3/P6: 936   ttattaggtgacagaatatacatatatactagatccacaagttggca 982
           || ||||| |||  || || ||||| ||||| ||||| |||||
M18763: 1313 ctactaggtacaagatctatatatatacaagatctacaagttggca 1359
```

BLAST das seqüências de nucleotídeos da amostra DIO P3/P6 e amostra de hPIV-3 do Genbank (nr. M18761).

Homologia = 80%
Fragmento = 522 bp

```

P3/P6: 336   tgtcaagatatagggaaatcttaccaagtactacaaatagggataaactataaaattcg 395
            ||||| ||||||| ||||||| || ||||||| ||||| ||||||| ||| ||| ||||| ||
M18761: 713   tgtcaggatatagggaaatcatatcaagtattacagatagggacaataaactgtaaactca 772

P3/P6: 396   gacctagtagctgatttaaaccagagtcacacatacatttaattgatgataatagg 455
            ||| | ||||||| ||||||| || || | ||||| ||||||| || ||||| |||||||
M18761: 773   gacttgtagctgacttaaaccctaggatctctcatacttttaacataaactgacaatagg 832

P3/P6: 456   aatccttgctctctggcactattgaatacagatgtttatcagttatgctcaacacaaaa 515
            || || || ||||| ||||||| || ||||||| ||||||| ||||| | || ||||| || |||||
M18761: 833   aagtcattgctctctagcactcctaaatacagatgtatatcaactgtgttcaactccaaa 892

P3/P6: 516   gttgatgagagatccgattatgcatcaacaggattgaggatattgtacttgacattgtc 575
            ||||||| ||||| ||||||| ||||| || || ||||||| ||||||| |||||||
M18761: 893   gttgatgaaagatcagattatgcatcatcaggcatagaagatattgtacttgatattgtc 952

P3/P6: 576   actaataatggattaattataacaacaagggtttacaaataataataaacttttgataaa 635
            | | | | ||||| | ||| ||||||| ||||| ||||||| ||||| ||||||| ||
M18761: 953   aattatgatggttcaatctcaacaacaagatttaagaataataacataagctttgatcaa 1012

P3/P6: 636   ccgatgcagcattgtatccatcagtaggaccaggaatctattataagggtaaagtata 695
            || ||||| ||| | || ||||||| || ||||||| || || ||||| || ||||| |||||
M18761: 1013  ccatatgctgcactatacccatctgttgaccaggatataactataaaggcaaaataata 1072

P3/P6: 696   tttctcggataggaggtctagagcatgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaact 755
            ||||||| ||||||| ||||||| || ||||| | ||||| | ||||| || ||||| |||||
M18761: 1073  tttctcgggtatggaggtcttgaacatccaataaatgagaatgtaatctgcaacacaact 1132

P3/P6: 756   ggttgcctggcaaacacagagagactgtaatcaggcttcttatagccatggttctca 815
            || ||||| || ||||||| ||||||| ||||||| || ||||| || ||||||| |||||
M18761: 1133  ggggtgcccggaaacacagagagactgtaatcaagcgtctcatagtccatggttttca 1192

P3/P6: 816   aataggagaatggtaaactctattattgttgttgataaaggc 857
            ||||||| ||||| ||||| || ||||||| |||||||
M18761: 1193  gataggaggatggtcaactccatcattgttgttgataaaggc 1234

```

BLAST das seqüências de nucleotídeos da amostra DIO P3/P6 e amostra de hPIV-3 do Genbank (nr. ABO12132).

Homologia = 80%
 Fragmento = 522 bp

```

P3/P6: 336      tgtcaagatatagggaaatcttaccagaactactacaaatagggataaactataaaattcg 395
                ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||| ||||||| ||||| ||||| ||
ABO12132: 7445  tgtcaggatatagggaaatcataccaagtcttacaggtagggataaactgtaaactca 7504

P3/P6: 396      gacctagtacctgatttaaatcccagagtcacacatacatttaattgatgataatagg 455
                ||| | ||||||| ||||||| ||| | ||||| || | || | ||||| |||||||
ABO12132: 7505  gacttggtagctgacttaaatcccaggttctctcactttcaacataaatgacaatagg 7564

P3/P6: 456      aatcttgctctctggcactattgaatacagatgtttatcagttatgctcaacacaaaa 515
                || || || ||||||| ||||||| | ||||||| ||||||| ||||| ||||| || |||||
ABO12132: 7565  aagtcagtgttctctagcactcctaaatacagatgtatatcaactgtgttcaactccaaa 7624

P3/P6: 516      gttgatgagagatccgattatgcatcaacaggtattgaggatattgtacttgacattgtc 575
                ||||||| ||||| ||||||| ||||| || || ||||||| ||||||| |||||||
ABO12132: 7625  gttgatgaaagatcagattatgcatcatcaggcatagaagatattgtacttgatattgtc 7684

P3/P6: 576      actaataatggattaattataacaacaagggtttacaataataataacttttgataaa 635
                | | || ||||| | ||| ||||||| ||||| ||||||| ||||| ||||||| ||
ABO12132: 7685  aattatgatggctcaatctcaacaacaagatttaagaataataacataagctttgatcaa 7744

P3/P6: 636      ccgatgcagcattgtatccatcagtaggaccaggaatctattataagggttaaagttata 695
                || ||||||| ||| | || ||||||| || ||||||| || ||||||| || ||||| |||||
ABO12132: 7745  ccctatgctgcactataacctctgttgaccagggatattacaaaggcaaaataata 7804

P3/P6: 696      tttctcggatatggaggtctagagcatgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaact 755
                ||||||| ||||||| ||||||| || ||||| | ||||| | ||||||| || |||||||
ABO12132: 7805  tttctcgggtatggaggtcctgaacatccaataaatgagaatgtaactctgcaacacaact 7864

P3/P6: 756      ggttgctcctggcaaaacacagagagactgtaatcaggcttcttatagcccatggttctca 815
                | |||||| || ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
ABO12132: 7865  gagtgtcccgggaaaacacagagagactgcaatcaggcatcttatagtcctatggttttca 7924

P3/P6: 816      aataggagaatggtaaactctattattggtggtgataaaggc 857
                ||||||| ||||| ||||| || ||||||| |||||||
ABO12132: 7925  gataggaggatggtcaactccatcattggtggtgataaaggc 7966
  
```


BLAST das seqüências de nucleotídeos da amostra DIO P3/P6 e amostra de hPIV-3 do Genbank (nr. Z11575).

Homologia = 79%
Fragmento = 522 bp

```

P3/P6: 336   tgtcaagatatagggaaatcttaccaagtactacaaatagggataattactataaattcg 395
          ||||| ||||||| ||||||| || ||||||| ||||| ||||||| ||||| ||||| ||
Z11575: 7445 tgtcaggatatagggaaatcatatcaagtcttacagatagggataataactgtaaactca 7504

P3/P6: 396   gacctagtacctgatttaaatcccagagtcacacatacatttaattgatgataatagg 455
          ||| | ||||||| ||||||| || || | ||||||| ||||||| || ||||| |||||||
Z11575: 7505 gacttggtagctgacttaaatcctaggatctctcacactttaacataaatgacaatagg 7564

P3/P6: 456   aaatcttgctctctggcactattgaatacagatgtttatcagttatgctcaacacaaaa 515
          || || | ||||||| ||||||| | ||||||| ||||||| ||||| | || ||||||| || |||
Z11575: 7565 aagtcatggttctctagcactcctaaatacagatgtatatcaactgtgttcaactcccaaa 7624

P3/P6: 516   gttgatgagagatccgattatgcatcaacaggtattgaggatattgtacttgacattgtc 575
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||| || || ||||||| ||||||| |||||||
Z11575: 7625 gttgatgaaagatcagattatgcatcatcaggcatagaagatattgtacttgatattgtc 7684

P3/P6: 576   actaataatggattaattataacaacaagggtttacaataataatataacttttgataaa 635
          | | | | ||||| | ||| ||||||| ||||| ||||||| ||||| ||||||| ||
Z11575: 7685 aattatgatggttcaatctcaacaacaagatttaagaataataacataagctttgatcaa 7744

P3/P6: 636   ccgatgcagcattgtatccatcagtaggaccaggaatctattataagggtaaagttata 695
          || ||||||| ||| | || ||||||| || ||||||| || || || || || || || ||
Z11575: 7745 ccatatgctgcactatacccatctgttgaccagggatataactacaaaggcaaaataata 7804

P3/P6: 696   tttctcgggatatggaggcttagagcatgaagaaaacggagacgtaatatgtaatacaact 755
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||| | ||||| || || || || || || || ||
Z11575: 7805 tttctcgggtatggaggcttgaacatccaataaatgagaatgtaatctgcaacacaact 7864

P3/P6: 756   ggttgtcctggcaaaacacagagagactgtaatcaggttcttatagcccatggttctca 815
          || || || || ||||||| ||||||| ||||||| || || || || || || || ||
Z11575: 7865 ggggtgccccgggaaacacagagagactgtaatcaagcgtctcatagtccatggttctca 7924

P3/P6: 816   aataggagaatggtaaactctattattgttggtgataaaggc 857
          ||||||| ||||||| ||||| || ||||||| |||||||
Z11575: 7925 gataggaggatggtcaactccatcattgttggtgataaaggc 7966

```