



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA APARECIDA CORREA XAVIER

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA
EM BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL:
UM ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO RETROSPECTIVO**

Londrina
2021

ANA APARECIDA CORREA XAVIER

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA
EM BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL:
UM ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO RETROSPECTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley.

Londrina
2021

ANA APARECIDA CORREA XAVIER

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA
EM BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL:
UM ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO RETROSPECTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador: Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr Werner Okano
Instituto Tecnologia e Desenvolvimento
Econômico e Social - ITEDES

Prof. Dr Julio Augusto Naylor Lisboa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2021.

Dedico esse trabalho a minha família que dão luz a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que me apoiam em tudo sempre, que me dão suporte, inspiração, força para continuar e melhorar cada dia, além da imensa alegria. Eu realmente não sei o que eu seria sem vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley, sempre aberto às ideias malucas e disposto a tirar minhas infinitas dúvidas sempre acompanhado daquela gargalhada. Sou grata pelo privilégio de ter convivido e aprendido com o senhor.

Às professoras Ana Paula F.R.L. Bracarense e Giovana W. Di Santis, que me acompanharam durante a residência, compartilhando seus conhecimentos tão importantes para minha evolução profissional.

Aos professores da UEL, que me acompanharam, sempre incentivando e ensinando sobre a vivência profissional e acadêmica.

Aos funcionários da UEL, sempre dispostos a nos amparar e ajudar para que as coisas aconteçam.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Laboratório de Anatomia Patológica, onde tive a oportunidade de aprender muito sobre a patologia, uma área tão encantadora da medicina veterinária.

À Universidade Estadual no Norte do Paraná e professores, onde foi minha primeira “casa acadêmica”, na qual, tenho muito carinho e saudades.

A todos os meus amigos, que sempre estão comigo nas tempestades e bonanças, que nunca mediram esforços para me ajudar, me acolher e representam pra mim o amor.

Ao meu noivo Guilherme, que me acompanha com carinho e paciência nessa jornada da vida.

À minha cachorrinha Morena que me traz momentos de risada e descontração, importantes para mim nesse período tão marcante em minha vida.

A todos que de alguma forma me ajudaram com apoio no trabalho, incentivos, ideias, sugestões e críticas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) -
Código de Financiamento 001 e número do processo 88882.344404/2019-01.

...MUITO OBRIGADO!

“Crescer significa mudar e mudar envolve riscos, uma passagem do conhecido para o desconhecido.”

- Autor desconhecido

XAVIER, Ana Aparecida Correa. **Ocorrência do vírus da febre catarral maligna em bovinos do estado do Paraná, sul do Brasil: um estudo imuno-histoquímico retrospectivo.** 2021. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A febre catarral maligna (FCM) é uma doença infecciosa viral causada por diversos agentes do grupo do complexo de vírus da febre catarral maligna (VFCM). No Brasil, gammaherpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2), até o momento, é o único agente desse complexo associado ao desenvolvimento de FCM em ruminantes. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência do VFCM nos bovinos do estado do Paraná entre 2010 a 2019, demonstrar a distribuição geográfica da ocorrência do VFCM, caracterizar os achados histopatológicos nos rins dos bovinos infectados pelo VFCM, além de associar as lesões histológicas encontradas com a presença intralésional do vírus identificado por ensaios imuno-histoquímicos. O diagnóstico da infecção foi determinado pela imunorreatividade positiva para os antígenos intralésionais nos tecidos renais de bovinos através de ensaios imuno-histoquímicos utilizando um anticorpo monoclonal que detecta todos os membros do grupo de VFCM. Os antígenos intracitoplasmáticos de VFCM foram identificados em 39,6% (n=44) dos 111 rins de bovinos avaliados durante o período de 10 anos. As taxas de morbidade, mortalidade e letalidade foram 5,2%, 3,6% e 86,5%, respectivamente, com a predominância de casos na mesorregião Norte Central. Não foram identificados predominância sexual, racial e sazonalidade significativas, porém, bovinos com idade igual ou menor de 12 meses foram mais frequentemente acometidos. Nefrite intersticial linfocítica (93,2%; 41/44), degeneração vascular renal (84,1%; 37/44) e degeneração balonosa dos túbulos renais (81,8%; 36/44) foram os achados histopatológicos mais frequentemente observados em associação à infecção imunorreatividade positiva pelo VFCM. Os resultados sugerem que os bovinos foram infectados pelo VFCM, provavelmente OvHV-2, sendo endêmico no estado do Paraná. A utilização de um diagnóstico *in situ* resultou numa quantidade maior de casos de infecção do que foi anteriormente descrito e o rim deve ser coletado quando houver suspeita de infecção por OvHV-2 em bovinos. Adicionalmente, alterações degenerativas renais devem ser consideradas no diagnóstico histológico da infecção pelo VFCM em bovinos.

Palavras-chave: epidemiologia; anticorpo monoclonal MAb-15A; histopatologia; doença renal.

XAVIER, Ana Aparecida Correa. **Occurrence of malignant cattle fever virus in cattle from Paraná state, southern Brazil: a retrospective immunohistochemical study.** 2021. 91 p. Dissertation (Master's Science degree in Health Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Malignant Catarrhal Fever (FCM) is a viral infectious disease caused by several agents of the Malignant Catarrhal Fever Virus (MCFV) complex group. In Brazil, gammaherpesvirus ovine-2 (OvHV-2), is the only agent of this complex associated with the development of MCF in ruminants. The objectives of this study were to determine the prevalence of MCFV in cattle in the state of Paraná between 2010 and 2019, to demonstrate the geographic distribution of the occurrence of MCFV, to characterize the histopathological findings in the kidneys of bovines infected with MCFV, and to associating the histological lesions found with the intralesional identification of MCFV antigens by immunohistochemistry. The diagnosis of the infection was determined by positive immunoreactivity for intralesional antigens in renal tissues of cattle using an immunohistochemical assay with a monoclonal antibody that detects all members of the MCFV. Intracytoplasmic MCFV antigens were identified on 39.6% (n = 44) of the 111 bovine kidneys evaluated athwart the 10-year period. The morbidity, mortality and lethality rates were 5.2%, 3.6% and 86.5%, respectively, with the predominance of cases in the North Central Paranaense mesoregion. Significant differences in sexual, cattle breeds, and seasonal predominance were not identified; however, calves with 12 months of age or younger were more frequently affected. Lymphocytic interstitial nephritis (93.2%; 41/44), renal vascular degeneration (84.1%; 37/44) and ballooning degeneration of the renal tubules (81.8%; 36/44) were principal histopathological findings in association with positive immunoreactivity to MCFV. The results suggest that the cattle were infected with a MCFV, probably OvHV-2, and MCFV is endemic in state of Paraná. The usage of *in situ* diagnosis has resulted in a greater number of cases of MCF than previously described and the kidney should be collected in cases of suspected infection with OvHV-2 in cattle. Additionally, renal degenerative changes should be considered in the histological diagnosis of MCFV-induced infections in cattle.

Key-words: epidemiology; monoclonal antibody MAb-15A; histopathology; renal disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição por faixa etária dos bovinos infectados pelo VFCM (n=44).....	66
Figura 2 – Distribuição geográfica da ocorrência de bovinos infectados pelo VFCM nas mesorregiões do estado do Paraná (n=44)	67
Figura 3 – Frequência dos achados histopatológicos observados nos rins de bovinos infectados pelo VFCM (n=44) do estado do Paraná.	68
Figura 4 – Achados histopatológicos observados nos rins de bovinos infectados com o VFCM	69
Figura 5 – Achados imuno-histoquímicos observados nos rins de bovinos infectados pelo VFCM	70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados epidemiológicos dos bovinos infectados pelo VFCM (n=44) do Estado do Paraná entre 2010 a 2019 71
- Tabela 2** - Frequência das manifestações clínicas observadas em bovinos infectados com o VFCM (n=44) do estado do Paraná..... 73
- Tabela 3** - Frequência das alterações macroscópicas observadas em bovinos infectados pelo VFCM (n=44) do estado do Paraná 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FCM	Febre Catarral Maligna
VFCM	Vírus da Febre Catarral Maligna
FCM-OA	Febre Catarral Maligna ovino-associada
FCM-GA	Febre Catarral Maligna gnu-associada
IHQ	Imuno-histoquímica
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia / Polymerase Chain Reaction
ISH	Hibridização <i>in situ</i> / Hybridization <i>in situ</i>
AIHV-1	Alcelaphine gammaherpesvirus tipo1
OvHV-2	Gammaherpesvírus ovino tipo 2
CpHV-2	Herpesvirus caprino tipo-2
IBR	Rinotraqueíte bovina infecciosa
BVD	Diarreia viral bovina
DRB	Doença respiratória bovina
BoHV-5	Herpes vírus bovino tipo 5
H&E	Hematoxilina e Eosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	ETIOLOGIA DA FEBRE CATARRAL MALIGNA	16
2.2	TRANSMISSÃO DA FEBRE CATARRAL MALIGNA ASSOCIADA AOS OVINOS	16
2.3	FORMAS CLÍNICAS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA.....	17
2.4	ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA	19
2.4.1	Lesões Macroscópicas	19
2.4.2	Lesões Microscópicas	20
2.5	DIAGNÓSTICO DA FEBRE CATARRAL MALIGNA.....	23
3	REFERÊNCIAS	26
4	HIPÓTESE	35
5	OBJETIVO	36
5.1	OBJETIVO GERAL.....	36
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
6	ARTIGO – OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA EM BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL: UM ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO RETROSPECTIVO	37
7	REFERÊNCIAS	56
8	CONCLUSÃO	75
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
10	ANEXO I	77
11	ANEXO II	88

1 1 INTRODUÇÃO

2 A produção pecuária no Brasil tem grande importância
3 econômica, pois somente no primeiro semestre de 2020, a quantidade total de
4 bovinos abatidos, inspecionados pelos serviços de inspeção sanitária, foi de 14,5
5 milhões de cabeças (IBGE, 2020). Além disso, de janeiro a março de 2018 foram
6 exportadas aproximadamente 490 mil toneladas de produtos derivados de carne
7 bovina (ABIEC, 2018). O estado do Paraná abateu cerca de 810 mil cabeças de
8 gado no ano de 2020 (IBGE, 2020). O Produto Interno Bruto (PIB) da pecuária
9 corresponde a 31% do PIB do agronegócio brasileiro e apresenta um
10 faturamento de bilhões de reais (ABIEC, 2018). Estes são números significativos
11 para a economia nacional e, portanto, doenças que acometem esses animais
12 tornam-se um problema do ponto de vista econômico, existindo uma
13 preocupação na prevenção e controle de doenças, que possam trazer possíveis
14 perdas de animais e na produção, acarretando prejuízos na bovinocultura (Rech
15 *et al.*, 2005).

16 A Febre Catarral Maligna (FCM) é uma doença infecciosa de
17 origem viral, pansistêmica, linfoproliferativa, que acomete principalmente
18 bovinos e outros animais biungulados com ocorrência esporádica (O'Toole and
19 Li, 2014). Apesar de altas taxas de letalidade em bovinos, estimam-se baixas
20 perdas financeiras relacionadas com a FCM, quando considera-se média de
21 morbidade de 5,6% no Brasil (Headley *et al.*, 2020b). Entretanto, a média dessa
22 taxa foi calculada baseada nos estudos brasileiros, que descreveram a doença
23 somente na forma de surtos esporádicos e estudos experimentais. Ainda, alguns
24 autores sugerem que a FCM seja subnotificada e subdiagnosticada (O'Toole and

1 Li, 2014). Portanto, há especulações sobre maiores taxas de infecção e, com
2 isso, os aspectos econômicos referentes aos gastos com a FCM poderiam ser
3 diferentes.

4 A FCM é uma enfermidade causada por vários agentes do grupo
5 de vírus pertencentes à subfamília Gammaherpesviridae, sendo dois destes
6 mais amplamente estudados: o alcelaphine gammaherpesvirus tipo-1 (AIHV-1)
7 e o gammaherpesvírus ovino tipo-2 (OvHV-2) que, respectivamente,
8 caracterizam duas síndromes de importância epidemiológica: a FCM gnu-
9 associada (FCM-GA) e a FCM ovino-associada (FCM-OA) (O'Toole and Li,
10 2014). A FCM-GA tem *Connochaetes* spp., conhecido popularmente como gnus,
11 como portadores assintomáticos do AIHV-1 e causa a doença nos ruminantes da
12 África e nos ruminantes selvagens no mundo todo. A FCM-OA tem os ovinos
13 como hospedeiros reservatórios do OvHV-2, e acomete espécies suscetíveis,
14 como bovinos, bisões e cervídeos em todo o mundo (O'Toole and Li, 2014). No
15 Brasil somente OvHV-2 foi descrito até o momento com distribuição em todas as
16 regiões do país (Headley *et al.*, 2020b).

17 As manifestações clínicas induzidas por ambos os vírus nos
18 hospedeiros susceptíveis são semelhantes (Plowright, 1990), podendo
19 apresentar diferentes formas clínicas (OIE, 2013), dentre elas, síndrome
20 neurológica (Martins *et al.*, 2017). Além disso, a proximidade e o contato com
21 ovinos são considerados importantes fatores de risco no desenvolvimento da
22 FCM-OA nos ruminantes (Berezowski *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008b). No estado
23 do Paraná, há presença de rebanhos de ovinos (IBGE, 2020) em áreas com
24 ocorrência de síndromes neurológicas nos bovinos (Queiroz *et al.*, 2018). Tendo
25 em conta essa interação entre os rebanhos das diferentes espécies especula-se

1 que a FCM-AO possa ser uma importante doença endêmica no estado.

2 O diagnóstico presuntivo da FCM pode ser feito associando as
3 manifestações clínicas ao histórico de proximidade com o hospedeiro
4 reservatório (O'Toole and Li, 2014). No Brasil, o uso de ensaios moleculares,
5 como a reação de polimerase em cadeia (PCR) juntamente com a histopatologia
6 são frequentemente usados para diagnóstico definitivo da OvHV-2 (Headley *et*
7 *al.*, 2020b). O exame histopatológico identifica achados indicativos/sugestivos da
8 doença (O'Toole and Li, 2014), sendo o rim importante órgão de escolha para
9 essa avaliação, pois, a nefrite intersticial linfocítica com vasculite é um achado
10 histológico comumente encontrado em casos de FCM de estudos brasileiros
11 (Headley *et al.*, 2020b). Ainda, lesões vasculares e degeneração balonosa do
12 epitélio tubular renal e uroepitélio também foram achados histopatológicos em
13 rins de ruminantes infectados pelo OvHV-2 (O'Toole *et al.*, 2002; O'Toole *et al.*,
14 2007). Além disso, a imunorreatividade positiva para o vírus da febre catarral
15 maligna (VFCM) foi encontrada nesses locais utilizando um anticorpo
16 monoclonal (MAb-15A) padronizado para ensaios imuno-histoquímicos (Headley
17 *et al.*, 2020c), sendo um interessante método de diagnóstico *in situ* para a
18 investigação da participação do sistema urinário na doença.

19 A evolução da biologia molecular permitiu a progressão nos
20 conhecimentos relacionados à infecção, eliminação, transmissão e identificação
21 dos VFCM (O'Toole and Li, 2014). Mas, ainda assim, na literatura há escassez
22 de estudos epidemiológicos da FCM-OA. Consequentemente, estudos
23 epidemiológicos associados aos métodos de diagnóstico *in situ* são oportunos
24 para a identificação de casos de FCM, podendo fornecer informações
25 relacionadas à patogênese, prevalência/ocorrência, e distribuição da doença.

1 Os objetivos deste estudo foram: determinar a prevalência do
2 VFCM em bovinos e a distribuição geográfica da ocorrência no estado do
3 Paraná; caracterizar os achados histopatológicos nos rins de bovinos infectados
4 pelo VFCM; e associar as lesões histológicas encontradas com a presença
5 intralesional do VFCM identificado por ensaios imuno-histoquímicos.

1 2 REFERENCIAL TEÓRICO

2 2.1 ETIOLOGIA DA FEBRE CATARRAL MALIGNA

3 A FCM é uma doença pansistêmica que afeta principalmente
4 bovinos e outros ruminantes (Li *et al.*, 2014; O'Toole and Li, 2014). A doença é
5 causada por vários agentes da subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero
6 *Macavírus*, os quais foram reorganizados recentemente. Atualmente, há dez
7 membros pertencentes ao grupo do complexo de vírus associados à Febre
8 Catarral Maligna (VFCM) (Coulter *et al.*, 2001; O'Toole and Li, 2014). As
9 principais espécies patogênicas, relacionadas ao desenvolvimento da doença
10 clínica são: o alcelaphine gammaherpesvirus tipo 1 (AIHV-1), gammaherpesvírus
11 ovino tipo 2 (OvHV-2) e herpesvirus caprino tipo-2 (CpHV-2) (O'Toole and Li,
12 2014).

13 AIHV-1 tem maior importância nos países onde há populações
14 de *Connochaetes* spp (gnus), frequentemente nos países da África e nos
15 parques zoológicos (Russell, 2018; Russell *et al.*, 2009). OvHV-2 tem distribuição
16 mundial e, no Brasil, é o único agente etiológico descrito. Os ovinos são um
17 importante fator na propagação do vírus, sendo considerados portadores
18 assintomáticos (O'Toole and Li, 2014; Russell, 2018; Russell *et al.*, 2009).

19 2.2 TRANSMISSÃO DA FEBRE CATARRAL MALIGNA ASSOCIADA AOS OVINOS

20 Animais clinicamente infectados não transmitem o vírus a
21 hospedeiros suscetíveis (Constable *et al.*, 2016). A transmissão da febre catarral
22 maligna ovino-associada (FCM-OA) nos bovinos ocorre, principalmente, por
23 aerossóis, secreções oculares e nasais de ovinos (Baxter *et al.*, 1997; Li *et al.*,

1 2004). A proximidade de bovinos com ovelhas na época de parição e cordeiros
2 entre 6 a 9 meses são considerados fatores de maior risco para o
3 desenvolvimento da doença (Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 1998). Apesar de não
4 encontrar relatos ou estudos da transmissão através da urina em animais
5 naturalmente infectados, existe a confirmação da presença do DNA viral do
6 OvHV-2 na bexiga de coelhos experimentalmente infectados (Li *et al.*, 2011).
7 Além disso, altos títulos de OvHV-2 foram detectados no trato gastrointestinal de
8 ovelhas naturalmente infectadas e no trato genital de carneiros (Hüssy *et al.*,
9 2002). Ainda, existem evidências da transmissão transplacentária da FCM em
10 hospedeiros suscetíveis (O'Toole *et al.*, 1997; Plowright, 1965), sendo que um
11 dos estudos relata a presença do DNA do OvHV-2 nos tecidos com lesões
12 histopatológicas típicas da FCM de uma vaca e seu feto (Headley *et al.*, 2015a).
13 Coletivamente, esses dados sugerem outras possíveis vias de eliminação e/ou
14 transmissão do vírus, como a urinária e entérica, mas ainda parecem ter pouca
15 influência na epidemiologia da FCM.

16 2.3 FORMAS CLÍNICAS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA

17 A manifestação “cabeça-e-olho” é a forma clínica da FCM mais
18 frequentemente observada no Brasil e em outros países, sendo facilmente
19 diagnosticada clinicamente (Headley *et al.*, 2020b; O'Toole and Li, 2014).
20 Entretanto, há várias formas clínicas como manifestações agudas (Liggitt *et al.*,
21 1978; Schultheiss *et al.*, 1998) e crônicas (O'Toole *et al.*, 1997; O'Toole *et al.*,
22 1995). A Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE, 2013) caracteriza
23 outras formas clínicas em: hiperaguda, alimentar, neurológica e cutânea, termos
24 arraigados (O'Toole and Li, 2014). Na forma “cabeça-e-olho”, os bovinos podem

1 apresentar febre alta, lesões oculares, depressão, linfadenopatia, dispneia, e
2 secreções profusas nasais e oculares variando entre serosa e mucopurulenta
3 (O'Toole and Li, 2014). As lesões frequentemente encontradas são a opacidade
4 de córnea e ulcerações nasais e orais (Headley *et al.*, 2020b), além de sinais
5 clínicos como cegueira, apatia e salivação excessiva; essa última possivelmente
6 ocorre por consequência das lesões orais. Lesões de pele, quando presentes,
7 podem ser ajudar na suspeita de FCM (O'Toole and Li, 2014) e são
8 caracterizadas por áreas extensas ou restritas de ulcerações e necrose da pele,
9 alopecia, espessamento, crostas e hiperqueratose nas regiões de escroto,
10 períneo, vulva, úbere, tetos e parte interna dos membros (Li *et al.*, 2003;
11 Plowright, 1990).

12 Nos casos de FCM aguda pode haver febre, dispneia e diarreia
13 com duração de dois a três dias (Constable *et al.*, 2016). Nestes casos, os sinais
14 clínicos da forma “cabeça-e-olho” são ausentes ou menos evidentes (Plowright,
15 1990). As manifestações crônicas são clinicamente caracterizadas por
16 emagrecimento progressivo, salivação, distúrbios neurológicos, cegueira,
17 opacidade de córnea, epífora, ulceração e secreção nasal e blefaroespasmos que
18 foram observados por 40 dias, três meses e até três anos (Lemos *et al.*, 2005;
19 Macêdo *et al.*, 2007; O'Toole *et al.*, 1997; O'Toole *et al.*, 1995). Na síndrome
20 neurológica podem ser observados tremores musculares, incoordenação,
21 pressão e desvio de cabeça, opistótono, nistagmo, andar em círculos,
22 movimentos de pedalagem, agressividade, decúbito esternal evoluindo para
23 decúbito lateral e depressão (Headley SA *et al.*, 2013; Lemos *et al.*, 2005;
24 Plowright, 1990) .

1 2.4 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA

2 2.4.1 Lesões Macroscópicas

3 Em uma comparação entre estudos de casos de FCM no Brasil
4 foi observado que as lesões macroscópicas mais importantes encontradas nos
5 bovinos doentes foram: linfadenopatia generalizada, nefrite intersticial crônica e
6 opacidade de córnea (Headley *et al.*, 2020b). A nefrite intersticial pode ser vista
7 como múltiplos focos esbranquiçados no parênquima renal devido ao acúmulo
8 intersticial de células inflamatórias (Baptista and Guidi, 1988; Headley *et al.*,
9 2012; O'Toole *et al.*, 1995). A opacidade de córnea ocorre por acúmulo de células
10 inflamatórias, podendo ser confundida com ceratoconjuntivite contagiosa (Van
11 Metre D, 2008). Outras lesões identificadas com muita frequência foram:
12 abomasite ulcerativa, glossite, estomatite e esofagite (Headley *et al.*, 2020b;
13 O'Toole *et al.*, 2002); alterações na cavidade oral principalmente acompanhadas
14 de ulcerações podem ser prontamente confundidas com outras doenças
15 infecciosas mais comuns, como rinotraqueíte infecciosa (IBR), diarreia viral
16 bovina (BVD) e febre aftosa (Headley *et al.*, 2020b). Outras alterações
17 encontradas foram: conjuntivite, pneumonia intersticial e traqueite ulcerativa
18 (Headley *et al.*, 2020b). Embora a pneumonia intersticial seja frequentemente
19 observada na FCM (Baptista and Guidi, 1988; Headley *et al.*, 2012; Li *et al.*,
20 2008a), a participação do OvHV-2 no desenvolvimento da doença respiratória
21 bovina (DRB) não está totalmente esclarecida.

22

1 2.4.2 Lesões Microscópicas

2 Nos casos da FCM associados ao OvHV-2 e AIHV-1 é comum
3 observar a “tríade” de achados histopatológicos: vasculite, proliferação linfoide
4 (linfadenopatia hiperplásica) e necrose do epitélio do trato gastrointestinal
5 (O'Toole and Li, 2014). A alteração morfológica microscópica característica da
6 FCM nos bovinos é a vasculite linfocítica necrotizante disseminada (Headley *et*
7 *al.*, 2020b; O'Toole and Li, 2014). Na FCM aguda, as arteriopatias proliferativas
8 concêntricas geralmente estão ausentes, sendo a vasculite a lesão
9 predominante, e o contrário ocorre com bovinos afetados pela FCM aguda que
10 se recuperaram (O'Toole *et al.*, 1995). Esses dados sugerem que os efeitos do
11 dano vascular ocorram progressivamente (Headley *et al.*, 2020b). As alterações
12 vasculares são consistentes no diagnóstico histopatológico da FCM e variam de
13 alterações fibrinoides, vasculite, arteriopatia, hipertrofia endotelial e obliteração
14 vascular presentes em diversos órgãos como os pulmões, baço, linfonodos, rins,
15 olho e rete mirabile carotídea (Headley *et al.*, 2020b; Liggitt and DeMartini, 1980;
16 O'Toole *et al.*, 1997). A alteração fibrinoide (antes denominada de
17 degeneração/necrose fibrinoide) é uma lesão circunferencial e transmural
18 afetando a parede dos vasos, sendo substituída por um material eosinofílico
19 quando corado com hematoxilina-eosina (H&E) (Brown CC, 2007). Na vasculite
20 observa-se o infiltrado inflamatório na camada íntima, média e/ou adventícia dos
21 vasos, frequentemente composto por linfócitos e plasmócitos, e ocasionalmente
22 por macrófagos, neutrófilos e mastócitos (Liggitt and DeMartini, 1980). A
23 arteriopatia é caracterizada por quatro características distintas: espessamento
24 concêntrico marcado da camada íntima devido à proliferação subendotelial de
25 células fusiformes; matriz intercelular abundante na camada íntima; atenuação

1 segmentar ou perda completa da túnica média; ruptura multifocal da lâmina
2 elástica interna (O'Toole *et al.*, 1995). A obliteração vascular é caracterizada pelo
3 espessamento da parede de artérias, principalmente de médio calibre, por
4 hiperplasia da camada íntima, resultando em obliteração do lúmen vascular
5 (O'Toole *et al.*, 1997).

6 A nefrite intersticial linfocítica é uma alteração histológica
7 frequentemente diagnosticada nos casos de FCM no Brasil (Headley *et al.*
8 (2020b), sendo essa lesão comumente associada à infecção pelo VFCM. Ainda,
9 antígenos de OvHV-2 identificados por imuno-histoquímica (IHQ) já foram
10 detectados nas células epiteliais tubulares renais e endotélio de capilares renais
11 de bovinos naturalmente infectados (Headley *et al.*, 2020c). Lesões no sistema
12 urinário são constantemente descritas nos estudos sobre a FCM, como por
13 exemplo em bisões e outros ruminantes selvagens. Uma característica
14 diagnóstica consistentemente utilizada é a degeneração do uroepitélio na pelve
15 renal, ureteres, bexiga e uretra (O'Toole and Li, 2014). No estado do Espírito
16 Santo, um bezerro apresentou áreas multifocais de necrose do epitélio tubular
17 renal, essas lesões foram associadas a arterite linfoplasmocitária observada nos
18 rins (Carmo *et al.*, 2011). Entretanto, um surto de FCM na Nova Zelândia
19 identificou necrose do epitélio transicional da bexiga dos bovinos sem a
20 observação da necrose nas paredes dos vasos renais (James *et al.*, 1975).
21 Coletivamente, esses dados corroboram que o sistema urinário frequentemente
22 apresente lesões histológicas associadas à infecção por VFCM. Portanto, o rim
23 é um órgão necessário na avaliação microscópica.

24 Outra lesão histológica associada ao OvHV-2 identificada com
25 muita frequência foi a meningoencefalite não supurativa (Headley *et al.*, 2020b).

1 Com isso, a FCM tem um importante papel como diferencial nas doenças
2 neurológicas dos bovinos, dentre elas, a meningoencefalite por herpes vírus
3 bovino tipo-5 (BoHV-5) frequente causa infecciosa de distúrbios neurológicos
4 nos bovinos (Queiroz *et al.*, 2018). Ambas as doenças podem gerar inflamação
5 no sistema nervoso central observados na histologia (Headley *et al.*, 2020b; Rissi
6 *et al.*, 2006).

7 Alterações inflamatórias no fígado e pulmão e lesões oculares
8 também foram frequentes nos bovinos do Brasil infectados pelo OvHV-2
9 (Headley *et al.*, 2020b). Antígenos de OvHV-2 foram identificados nas células
10 epiteliais do ducto biliar no fígado de bovinos naturalmente infectados (Headley
11 *et al.*, 2020c). Provavelmente, a hepatite linfocítica portal tenha origem extra-
12 hepática, na qual, possivelmente os leucócitos sejam provenientes do intestino
13 acometendo o fígado via espaço portal (Headley *et al.*, 2020b). Sabe-se que a
14 transmissão principal ocorre por aerossóis e que o pulmão é o local inicial de
15 replicação viral (Cunha *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008a). Ainda, diversos padrões de
16 pneumonia foram associados a infecções pelo OvHV-2 (Headley *et al.*, 2020c; Li
17 *et al.*, 2005), sugerindo que o VFCM possivelmente esteja associado ao
18 desenvolvimento de doenças respiratórias. Já as lesões oculares são diversas
19 como edema de córnea, uveíte, ceratite, conjuntivite e trombose que ocorrem
20 por um conjunto de alterações vasculares e epiteliais, além da reação
21 inflamatória local (Van Metre D, 2008; Zemljič *et al.*, 2012).

22

23

1 2.5 DIAGNÓSTICO DA FEBRE CATARRAL MALIGNA

2 Diversas doenças podem ser potenciais diagnósticos
3 diferenciais da FCM. Quando há presença de lesões orais podem-se considerar
4 a BVD, peste bovina, febre aftosa e estomatite vesicular. Já quando manifesta a
5 síndrome neurológica devem-se considerar o BoHV-5, raiva e meningoencefalite
6 trombótica (Russell, 2018).

7 As manifestações clínicas características da doença juntamente
8 com os dados epidemiológicos de proximidade com ovinos são úteis no
9 diagnóstico presuntivo da FCM (O'Toole and Li, 2014). Os animais mortos
10 suspeitos devem ser submetidos aos exames necroscópico e histopatológico
11 para identificar achados característicos indicativos da doença (O'Toole and Li,
12 2014). No entanto, a detecção de anticorpos e/ou DNA viral são eficientes na
13 identificação dos VFCM e estão se tornando métodos de escolha para o
14 diagnóstico comprobatório (Russell, 2018). Os diagnósticos laboratoriais
15 geralmente são feitos a partir de amostras de tecidos frescos ou congelados e
16 secreções ou sangue (Russell, 2018).

17 Três anos depois do primeiro diagnóstico molecular de FCM foi
18 desenvolvida uma técnica de PCR para detectar DNA de OvHV-2 de ruminantes
19 com manifestações clínicas (Baxter *et al.*, 1993). Ensaio de PCR foram
20 desenvolvidos para distinguir entre AIHV-1 e OvHV-2 em hospedeiros naturais e
21 espécies suscetíveis (Flach *et al.*, 2002). Um estudo elaborou uma análise
22 quantitativa (qPCR) para detectar e mensurar o número de cópias de DNA do
23 OvHV-2 em ovelhas (Hüssy *et al.*, 2001). Ainda, um ensaio de PCR multiplex foi
24 produzido para diferenciar entre cinco agentes virais associados à FCM (Cunha
25 *et al.*, 2009). Recentemente, foi desenvolvido um PCR digital em gotas (ddPCR)

1 detectando o DNA de OvHV-2 em secreções nasais, oculares, leite e sangue de
2 bovinos e ovinos (Pinheiro de Oliveira *et al.*, 2019). A hibridização *in situ*, é uma
3 técnica recente que permitiu detectar, nos tecidos lesionados, sequências
4 específicas de DNA somente do OvHV-2, com alta especificidade e sem reação
5 cruzada com os outros VFCM (Pesavento *et al.*, 2018).

6 Um teste ELISA foi desenvolvido para a detecção de um epítopo
7 comum em todos os VFCM e empregado no soro de ruminantes selvagens e
8 domésticos (Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1994). A imunofluorescência demonstra
9 vários antígenos em células infectadas com AIHV-1; os anticorpos que reagem
10 no teste se desenvolvem em bovinos durante o período de incubação e,
11 posteriormente, no curso clínico da doença (Russell *et al.*, 2012). Uma
12 característica marcante da FCM era a falta de um método diagnóstico que
13 detectasse antígenos virais nas lesões, ou seja, um método diagnóstico *in situ*
14 (Russell, 2018). Entretanto recentemente, Headley *et al.* (2020c) padronizaram
15 a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) a partir de blocos de tecidos parafinados
16 usando o anticorpo monoclonal (MAb-15A); antes usados exclusivamente na
17 identificação dos VFCM em ensaios sorológicos (Li *et al.*, 1994). A detecção
18 eficiente de antígenos de VFCM no citoplasma de células em diferentes tecidos,
19 torna essa técnica valiosa para estudos retrospectivos de blocos arquivados e
20 identificação intralesional do VFCM.

21 O diagnóstico definitivo da FCM comumente é feito pela
22 combinação de ensaios moleculares e/ou sorológicos com a histopatologia e
23 suspeita clínica (O'Toole and Li, 2014). A combinação de técnicas modernas de
24 biologia molecular seria interessante, pois a qPCR demonstraria a quantidade
25 de DNA viral presente nos tecidos que, juntamente com os ensaios IHQ,

- 1 evidenciaria a existência do vírus intralesional, podendo revelar informações
- 2 oportunas sobre a doença, como o grau das lesões comparados com carga viral.

1 3 REFERÊNCIAS

- 2 ABIEC. (2018). Brazilian livestock profile. Brazilian Beef Exporters Association.
- 3 Baptista, F. and Guidi, P. (1988). Febre catarral maligna no estado do Paraná. *Hora Vet.*,
4 **45**, 33-37.
- 5 Baxter, S. I., Pow, I., Bridgen, A. and Reid, H. W. (1993). PCR detection of the sheep-
6 associated agent of malignant catarrhal fever. *Archives Virology*, **132**, 145-159.
- 7 Baxter, S. I., Wiyono, A., Pow, I. and Reid, H. W. (1997). Identification of *ovine*
8 *herpesvirus-2* infection in sheep. *Archives Virology*, **142**, 823-831.
- 9 Bedelian, C., Nkedianye, D. and Herrero, M. (2007). Maasai perception of the impact and
10 incidence of malignant catarrhal fever (MCF) in southern Kenya. *Preventive*
11 *Veterinary Medicine*, **78**, 296-316.
- 12 Berezowski, J. A., Appleyard, G. D., Crawford, T. B., Haigh, J., Li, H., Middleton, D.
13 M., O'Connor, B. P., West, K. and Woodbury, M. (2005). An outbreak of sheep-
14 associated malignant catarrhal fever in bison (*Bison bison*) after exposure to sheep
15 at a public auction sale. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **17**, 55-
16 58.
- 17 Cleaveland, S., Kusiluka, L., Bell, C., Kuwai, J. O. and Kazwala, R. (2001). Assessing
18 the impact of malignant catarrhal fever in Ngorongoro District, Tanzania. *Animal*
19 *Health Programme, Department for International Development, Tanzania*.
- 20 Constable, P., Hinchcliff, K., Sd, D. and Gruenberg, W. (2016). *Veterinary Medicine: A*
21 *textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*.
- 22 Coulter, L. J., Wright, H. and Reid, H. W. (2001). Molecular genomic characterization of
23 the viruses of malignant catarrhal fever. *Journal of Comparative Pathology*, **124**,
24 2-19.
- 25 Cunha, C., Otto, L., Taus, N., Knowles, D. and Li, H. (2009). Development of a multiplex

- 1 real-time PCR for detection and differentiation of malignant catarrhal fever
2 viruses in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 2586-2589.
- 3 Cunha, C. W., Gailbreath, K. L., O'Toole, D., Knowles, D. P., Schneider, D. A., White,
4 S. N., Taus, N. S., Davies, C. J., Davis, W. C. and Li, H. (2012). Ovine herpesvirus
5 2 infection in American bison: virus and host dynamics in the development of
6 sheep-associated malignant catarrhal fever. *Veterinary Microbiology*, **159**, 307-
7 319.
- 8 Flach, E. J., Reid, H., Pow, I. and Klemm, A. (2002). Gamma herpesvirus carrier status of
9 captive artiodactyls. *Research in Veterinary Science*, **73**, 93-99.
- 10 Garmatz, S. L., Irigoyen, L. F., Rech, R. R., Brown, C. C., Zhang, J. and Barros, C. S. L.
11 (2004). Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: transmissão
12 experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. *Pesquisa*
13 *Veterinária Brasileira*, **24**, 93-103.
- 14 Headley SA, Lisbôa JAN and JTT, F. (2013). Ovine herpesvirus type-2 induced
15 malignant catarrhal fever in a heifer. *Semina: ciências agrárias*, **34(6,S2)**, 3903–
16 3908.
- 17 Headley, S. A., Müller, M. C., Oliveira, T. E. S., Barros Gil Duarte, C. A., Valente
18 Pereira, P. F., Vieira, M. V., Cunha, C. W., Flores, E. F., Lisbôa, J. A. N. and
19 Pretto-Giordano, L. G. (2020a). Diphtheric aspergillosis tracheitis with
20 gastrointestinal dissemination secondary to viral infections in a dairy calf.
21 *Microbial Pathogenesis*, **149**, 104497.
- 22 Headley, S. A., Oliveira, T. E. S. and Cunha, C. W. (2020b). A review of the
23 epidemiological, clinical, and pathological aspects of malignant catarrhal fever in
24 Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **51**, 1405-1432.
- 25 Headley, S. A., Oliveira, T. E. S., Li, H., Lisbôa, J. A. N., Queiroz, G. R., Fritzen, J. T.

- 1 T., Flores, E. F., Alfieri, A. A. and Cunha, C. W. (2020c). Immunohistochemical
2 detection of intralesional antigens of ovine gammaherpesvirus-2 in cattle with
3 sheep-associated malignant catarrhal fever. *Journal of Comparative Pathology*,
4 **174**, 86-98.
- 5 Headley, S. A., Pimentel, L. A., Oliveira, V. H., Toma, H. S., Alfieri, A. F., Carvalho, A.
6 M., dos Santos, M. D. and Alfieri, A. A. (2015a). Transplacental transmission of
7 ovine herpesvirus-2 in cattle with sheep-associated malignant catarrhal fever.
8 *Journal of Comparative Pathology*, **153**, 206-211.
- 9 Headley, S. A., Pimentel, L. A., Oliveira, V. H., Toma, H. S., Alfieri, A. F., Carvalho, A.
10 M., dos Santos, M. D. and Alfieri, A. A. (2015b). Transplacental transmission of
11 Ovine Herpesvirus 2 in cattle with sheep-associated malignant catarrhal fever.
12 *Journal of Comparative Pathology*, **153**, 206-211.
- 13 Headley, S. A., Sousa, I. K., Minervino, A. H., Barros, I. O., Barrêto Júnior, R. A., Alfieri,
14 A. F., Ortolani, E. L. and Alfieri, A. A. (2012). Molecular confirmation of ovine
15 herpesvirus 2 induced malignant catarrhal fever lesions in cattle from Rio Grande
16 do Norte, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **32**, 1213-1218.
- 17 Hüssy, D., Janett, F., Albin, S., Stäuber, N., Thun, R. and Ackermann, M. (2002).
18 Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma
19 herpesvirus 2. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 4700-4704.
- 20 Hüssy, D., Stäuber, N., Leutenegger, C., Rieder, S. and Ackermann, M. (2001).
21 Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication
22 in sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**, 123-128.
- 23 IBGE. (2020). Instituto brasileiro de geografia e estatística. , Vol. 2020,
24 <https://sidra.ibge.gov.br/>.
- 25 Lemos, R. A. A. d., Rech, R. R., Guimarães, E. B., Kadri, A. and Dutra, I. d. S. (2005).

- 1 Febre catarral maligna em bovinos do Mato Grosso do Sul e de São Paulo. *Ciência*
2 *Rural*, **35**, 932-934.
- 3 Li, H., Cunha, C. W., Davies, C. J., Gailbreath, K. L., Knowles, D. P., Oaks, J. L. and
4 Taus, N. S. (2008a). Ovine herpesvirus 2 replicates initially in the lung of
5 experimentally infected sheep. *Journal of General Virology*, **89**, 1699-1708.
- 6 Li, H., Cunha, C. W., Gailbreath, K. L., O'Toole, D., White, S. N., Vanderplasschen, A.,
7 Dewals, B., Knowles, D. P. and Taus, N. S. (2011). Characterization of ovine
8 herpesvirus 2-induced malignant catarrhal fever in rabbits. *Veterinary*
9 *Microbiology*, **150**, 270-277.
- 10 Li, H., Cunha, C. W., Taus, N. S. and Knowles, D. P. (2014). Malignant catarrhal fever:
11 inching toward understanding. *Annual Review of Animal Biosciences*, **2**, 209-233.
- 12 Li, H., Gailbreath, K., Bender, L. C., West, K., Keller, J. and Crawford, T. B. (2003).
13 Evidence of three new members of malignant catarrhal fever virus group in
14 muskox (*Ovibos moschatus*), Nubian ibex (*Capra nubiana*), and gemsbok (*Oryx*
15 *gazella*). *Journal of Wildlife Diseases*, **39**, 875-880.
- 16 Li, H., Karney, G., O'Toole, D. and Crawford, T. B. (2008b). Long distance spread of
17 malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. *Canadian*
18 *Veterinary Journal*, **49**, 183-185.
- 19 Li, H., McGuire, T. C., Müller-Doblies, U. U. and Crawford, T. B. (2001). A simpler,
20 more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for
21 detection of antibody to malignant catarrhal fever viruses. *Journal of Veterinary*
22 *Diagnostic Investigation*, **13**, 361-364.
- 23 Li, H., O'Toole, D., Kim, O., Oaks, J. L. and Crawford, T. B. (2005). Malignant catarrhal
24 fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2.
25 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **17**, 171-175.

- 1 Li, H., Shen, D. T., Knowles, D. P., Gorham, J. R. and Crawford, T. B. (1994).
2 Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in
3 sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever
4 virus. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 1674-1679.
- 5 Li, H., Snowder, G., O'Toole, D. and Crawford, T. B. (1998). Transmission of ovine
6 herpesvirus 2 in lambs. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 223-226.
- 7 Li, H., Taus, N. S., Lewis, G. S., Kim, O., Traul, D. L. and Crawford, T. B. (2004).
8 Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode
9 for transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 5558-5564.
- 10 Liggitt, H. D. and DeMartini, J. C. (1980). The pathomorphology of malignant catarrhal
11 fever. I. Generalized lymphoid vasculitis. *Veterinary Pathology*, **17**, 58-72.
- 12 Liggitt, H. D., DeMartini, J. C., McChesney, A. E., Pierson, R. E. and Storz, J. (1978a).
13 Experimental transmission of malignant catarrhal fever in cattle: gross and
14 histopathologic changes. *American Journal of Veterinary Research*, **39**, 1249-
15 1257.
- 16 Liggitt, H. D., DeMartini, J. C., McChesney, A. E., Pierson, R. E. and Storz, J. (1978b).
17 Experimental transmission of malignant catarrhal fever in cattle: gross and
18 histopathologic changes. *American Journal of Veterinary Research*, **39**, 1249-
19 1257.
- 20 Lucena, R. B., Pierezan, F., Kommers, G. D., Irigoyen, L. F., Figuera, R. A. and Barros,
21 C. S. L. (2010). Doenças de bovinos no sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesquisa*
22 *Veterinária Brasileira*, **30**, 428-434.
- 23 Macêdo, J. T. S. A., Riet-Correa, F., Simões, S. V. D., Dantas, A. F. M. and Nobre, V.
24 M. T. (2007). Febre catarral maligna em bovinos na Paraíba. *Pesquisa Veterinária*
25 *Brasileira*, **27**, 277-281.

- 1 Martins, M. d. S. N., Castro, A. M. M. G. d., Lima, M. d. S., Pinto, V. d. S. C., Silva, T.
2 G. d., Fava, C. D., Depes, C. R., Okuda, L. H. and Pituco, E. M. (2017). Malignant
3 catarrhal fever in brazilian cattle presenting with neurological syndrome.
4 *Brazilian Journal of Microbiology*, **48**, 366-372.
- 5 Mendonça, F. S., Dória, R. G. S., Schein, F. B., Freitas, S. H., Nakazato, L., Boabaid, F.
6 M., Paula, D. A. J., Dutra, V. and Colodel, E. M. (2008). Febre catarral maligna
7 em bovinos no estado de Mato Grosso. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **28**, 155-
8 160.
- 9 Mlilo, D., Mhlanga, M., Mwembe, R., Sisito, G., Moyo, B. and Sibanda, B. (2015). The
10 epidemiology of malignant catarrhal fever (MCF) and contribution to cattle losses
11 in farms around Rhodes Matopos National Park, Zimbabwe. *Tropical Animal*
12 *Health and Production*, **47**, 989-994.
- 13 Moore, D. A., Kohrs, P., Baszler, T., Faux, C., Sathre, P., Wenz, J. R., Eldridge, L. and
14 Li, H. (2010). Outbreak of malignant catarrhal fever among cattle associated with
15 a state livestock exhibition. *Journal of the American Veterinary Medical*
16 *Association*, **237**, 87-92.
- 17 O'Toole, D. and Li, H. (2014). The pathology of malignant catarrhal fever, with an
18 emphasis on ovine herpesvirus 2. *Veterinary Pathology*, **51**, 437-452.
- 19 O'Toole, D., Li, H., Miller, D., Williams, W. R. and Crawford, T. B. (1997a). Chronic
20 and recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle.
21 *Veterinary Record*, **140**, 519-524.
- 22 O'Toole, D., Li, H., Miller, D., Williams, W. R. and Crawford, T. B. (1997b). Chronic
23 and recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle.
24 *Veterinary Record*, **140**, 519-524.
- 25 O'Toole, D., Li, H., Roberts, S., Rovnak, J., DeMartini, J., Cavender, J., Williams, B. and

- 1 Crawford, T. (1995). Chronic generalized obliterative arteriopathy in cattle: a
2 sequel to sheep-associated malignant catarrhal fever. *Journal of Veterinary*
3 *Diagnostic Investigation*, **7**, 108-121.
- 4 O'Toole, D., Li, H., Sourk, C., Montgomery, D. L. and Crawford, T. B. (2002). Malignant
5 catarrhal fever in a bison (*Bison bison*) feedlot, 1993-2000. *Journal of Veterinary*
6 *Diagnostic Investigation*, **14**, 183-193.
- 7 O'Toole, D., Taus, N. S., Montgomery, D. L., Oaks, J. L., Crawford, T. B. and Li, H.
8 (2007). Intra-nasal inoculation of American bison (*Bison bison*) with ovine
9 herpesvirus-2 (OvHV-2) reliably reproduces malignant catarrhal fever.
10 *Veterinary Pathology*, **44**, 655-662.
- 11 OIE. (2013a). Malignant catarrhal fever. Technical disease cards., Vol. 2020,
12 <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/technical-disease-cards>.
- 13 OIE. (2013b). Malignant catarrhal fever. Technical disease cards., Vol. 2020.
- 14 Oliveira, R. A. M., Lorenzetti, E., Alfieri, A. A. and Lisbôa, J. A. N. (2015). Prevalência
15 das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no estado do
16 Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **67**, 1217-1225.
- 17 Orono, S. A., Gitao, G. C., Mpatwenumugabo, J. P., Chepkwony, M., Mutisya, C.,
18 Okoth, E., Bronsvoort, B. M. C., Russell, G. C., Nene, V. and Cook, E. A. J.
19 (2019). Field validation of clinical and laboratory diagnosis of wildebeest
20 associated malignant catarrhal fever in cattle. *BMC Veterinary Research*, **15**, 69.
- 21 Pesavento, P. A., Cunha, C. W., Li, H., Jackson, K. and O'Toole, D. (2018). *In situ*
22 hybridization for localization of ovine herpesvirus 2, the agent of sheep-associated
23 malignant catarrhal fever, in formalin-fixed tissues. *Veterinary Pathology*, **56**, 78-
24 86.
- 25 Pesavento, P. A., Dange, R. B., Ferreras, M. C., Dasjerdi, A., Pérez, V., LaRoca, A.,

- 1 Silván, J. B., Diab, S., Jackson, K., Phillips, I. L., Li, H., Cunha, C. W. and
2 Wessels, M. (2019). Systemic necrotizing vasculitis in sheep is associated with
3 ovine herpesvirus 2. *Veterinary Pathology*, **56**, 87-92.
- 4 Pinheiro de Oliveira, T. F., Laguardia-Nascimento, M., Xavier, F. G., do Amaral Pinto,
5 C., Ferreira, L. R., de Castro Campos de Souza, I., Hammerschmitt, M. E.,
6 Bianchi, R. M., Wronski, J. G., Etges, R. N., Rigon, G. M., Camargos, M. F.,
7 Júnior, A. V. R. and Fonseca Junior, A. A. (2019). Quantification of ovine
8 herpesvirus 2 by digital PCR in an outbreak of malignant catarrhal fever. *Archives*
9 *of Virology*, **164**, 3045-3050.
- 10 Plowright, W. (1965). Malignant catarrhal fever in east Africa: I.—Behaviour of the virus
11 in free-living populations of blue wildebeest (*Gorgon taurinus taurinus*,
12 *Burchell*). *Research in Veterinary Science*, **6**, 56-68.
- 13 Plowright, W. (1990). Malignant catarrhal fever virus. In: *Virus Infections of Ruminants*,
14 Z. Dinter, Morein, B., Ed, Elsevier Science, New York, NY, pp. 123–150.
- 15 Preliasco, M., Easton, M. C., Paullier, C., Rivero, R., Moraes, D. F. S. D., Godoy, I.,
16 Dutra, V. and Nakazato, L. (2013). Diagnóstico de febre catarral maligna em
17 bovinos do Uruguai. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **33**, 52-56.
- 18 Queiroz, G. R., Oliveira, R. A. M. d., Flaiban, K. K. M. C., Santis, G. W. D., Bracarense,
19 A. P. F. R. L., Headley, S. A., Alfieri, A. A. and Lisbôa, J. A. N. (2018).
20 Diagnóstico diferencial das doenças neurológicas dos bovinos no estado do
21 Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **38**, 1264-1277.
- 22 Rech, R. R., Schild, A. L., Driemeier, D., Garmatz, S. L., Oliveira, F. N., Riet-Correa, F.
23 and Barros, C. S. L. (2005). Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do
24 Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,
25 **25**, 97-105.

- 1 Reid, H. W., Buxton, D., Berrie, E., Pow, I. and Finlayson, J. (1984). Malignant catarrhal
2 fever. *Veterinary Record*, **114**, 581-583.
- 3 Rissi, D. R., Oliveira, F. N., Rech, R. R., Pierezan, F., Lemos, R. A. A. and Barros, C. S.
4 L. (2006). Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em
5 bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesquisa*
6 *Veterinária Brasileira*, **26**, 123-132.
- 7 Rosa, H. J. D. and Bryant, M. J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small*
8 *Ruminant Research*, **48**, 155-171.
- 9 Rossiter, P. B. (1981). Antibodies to malignant catarrhal fever virus in sheep sera. *Journal*
10 *of Comparative Pathology*, **91**, 303-311.
- 11 Russell, G. (2018). Malignant catarrhal fever. Manual of diagnostic tests and vaccines for
12 terrestrial animals 2018. , O.-W. O. A. Health, Ed, pp. 1-12.
- 13 Russell, G. C., Benavides, J., Grant, D., Todd, H., Deane, D., Percival, A., Thomson, J.,
14 Connelly, M. and Haig, D. M. (2012). Duration of protective immunity and
15 antibody responses in cattle immunised against alcelaphine herpesvirus-1-induced
16 malignant catarrhal fever. *Veterinary Research*, **43**, 51.
- 17 Russell, G. C., Stewart, J. P. and Haig, D. M. (2009). Malignant catarrhal fever: a review.
18 *Veterinary Journal*, **179**, 324-335.
- 19 Schultheiss, P. C., Collins, J. K., Austgen, L. E. and DeMartini, J. C. (1998). Malignant
20 catarrhal fever in bison, acute and chronic cases. *J Vet Diagn Invest*, **10**, 255-262.
- 21 Van Metre D, T. B., Whitlock RH (2008). Malignant catarrhal fever. In: *Diseases of dairy*
22 *cattle*, P. S. Divers TJ, Ed, Saunders Elsevier, St Louis, pp. 276–279
- 23 Zemljič, T., Pot, S. A., Haessig, M. and Spiess, B. M. (2012). Clinical ocular findings in
24 cows with malignant catarrhal fever: ocular disease progression and outcome in
25 cases (2007-2010). *Veterinary Ophthalmology*, **15**, 46-52.

1 4 HIPÓTESE

- 2 O vírus da febre catarral maligna ocorre de modo
- 3 endêmico no Paraná, sendo o rim um órgão apropriado para estabelecer
- 4 diagnóstico associando exame histopatológico e imuno-histoquímico.

1 5 OBJETIVO

2 5.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar a ocorrência do vírus da febre catarral maligna em
4 bovinos autopsiados do estado do Paraná por meio de exame imuno-
5 histoquímico.

6

7 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 8 • Fornecer dados epidemiológicos sobre a ocorrência do vírus da febre
9 catarral maligna em bovinos no estado do Paraná;
- 10 • Caracterizar os achados histopatológicos nos rins de bovinos infectados
11 pelo VFCM;
- 12 • Determinar se a técnica de imuno-histoquímica é eficiente em estudos
13 retrospectivos utilizando blocos de tecidos parafinados para diagnosticar
14 VFCM nos tecidos de bovinos.
- 15 • Fazer associação entre as técnicas de diagnóstico: histopatologia e
16 imuno-histoquímica.

1 **6 ARTIGO – OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE CATARRAL MALIGNA EM**
2 **BOVINOS DO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL: UM ESTUDO IMUNO-**
3 **HISTOQUÍMICO RETROSPECTIVO – JOURNAL OF COMPARATIVE**
4 **PATHOLOGY**

5 **Ocorrência do Vírus da Febre Catarral Maligna em bovinos do estado do**
6 **Paraná, Sul do Brasil: um estudo imuno-histoquímico retrospectivo***

7

8 **Occurrence of Malignant Cattle Fever Virus in cattle from Paraná state, Southern**
9 **Brazil: a retrospective immunohistochemical study**

10

11 Ana Aparecida Correa Xavier¹, Júlio Augusto Naylor Lisbôa,²

12 Cristina Wetzel Cunha,³ Selwyn Arlington Headley^{1,4}

13

14 ¹Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva,
15 Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Campus
16 Universitário, Londrina, Paraná, Brasil.

17 ²Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade
18 Estadual de Londrina (UEL), Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil.

19 ³Animal Disease Research Unit, Agricultural Research Service, United States
20 Department of Agriculture, Pullman, WA, USA.

21 ⁴Comparative Pathology Shared Resources Laboratory, Masonic Cancer Center,
22 University of Minnesota, Saint Paul, MN, USA. Autor de correspondência: e-mail:

23 sheadley@umn.edu / selwyn.headley@uel.br

24

25 *Parte da dissertação de mestrado da primeira autora (AACX).

RESUMO

1
2 A febre catarral maligna (FCM) é uma doença infecciosa viral causada por diversos
3 agentes do grupo do complexo de vírus da febre catarral maligna (VFCM). No Brasil,
4 gammaherpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2), até o momento, é o único agente desse
5 complexo associado ao desenvolvimento de FCM em ruminantes. O objetivo desse estudo
6 foi determinar a prevalência do VFCM nos bovinos do estado do Paraná entre 2010 a
7 2019, demonstrar a distribuição geográfica da ocorrência do VFCM, caracterizar os
8 achados histopatológicos nos rins dos bovinos infectados pelo VFCM, além de associar
9 as lesões histológicas encontradas com a presença intralésional do vírus identificado por
10 ensaios imuno-histoquímicos. O diagnóstico da infecção foi determinado pela
11 imunorreatividade positiva para os antígenos intralésionais nos tecidos renais de bovinos
12 através de ensaios imuno-histoquímicos utilizando um anticorpo monoclonal que detecta
13 todos os membros do grupo de VFCM. Os antígenos intracitoplasmáticos de VFCM
14 foram identificados em 39,6% (n=44) dos 111 rins de bovinos avaliados durante o período
15 de 10 anos. As taxas de morbidade, mortalidade e letalidade foram 5,2%, 3,6% e 86,5%,
16 respectivamente, com a predominância de casos na mesorregião Norte Central. Não
17 foram identificadas predominância sexual, racial e sazonalidade significativas, porém,
18 bovinos com idade igual ou menor de 12 meses foram mais frequentemente acometidos.
19 Nefrite intersticial linfocítica (93,2%; 41/44), degeneração vascular renal (84,1%; 37/44)
20 e degeneração balonosa dos túbulos renais (81,8%; 36/44) foram os achados
21 histopatológicos mais frequentemente observados em associação à infecção
22 imunorreatividade positiva pelo VFCM. Os resultados sugerem que os bovinos foram
23 infectados pelo VFCM, provavelmente OvHV-2, sendo endêmico no estado do Paraná.
24 A utilização de um diagnóstico in situ resultou numa quantidade maior de casos de
25 infecção do que foi anteriormente descrito e o rim deve ser coletado quando houver
26 suspeita de infecção por OvHV-2 em bovinos. Adicionalmente, alterações degenerativas
27 renais devem ser consideradas no diagnóstico histológico da infecção pelo VFCM em
28 bovinos.

29

30 **PALAVRAS-CHAVE:** anticorpo monoclonal MAb-15A; doença renal; epidemiologia;
31 histopatologia.

ABSTRACT

1
2 Malignant Catarrhal Fever (FCM) is a viral infectious disease caused by several agents
3 of the Malignant Catarrhal Fever Virus (MCFV) complex group. In Brazil,
4 gammaherpesvirus ovine-2 (OvHV-2), is the only agent of this complex associated with
5 the development of MCF in ruminants. The objectives of this study were to determine the
6 prevalence of MCFV in cattle in the state of Paraná between 2010 and 2019, to
7 demonstrate the geographic distribution of the occurrence of MCFV, to characterize the
8 histopathological findings in the kidneys of bovines infected with MCFV, and to
9 associating the histological lesions found with the intralesional identification of MCFV
10 antigens by immunohistochemistry. The diagnosis of the infection was determined by
11 positive immunoreactivity for intralesional antigens in renal tissues of cattle using an
12 immunohistochemical assay with a monoclonal antibody that detects all members of the
13 MCFV. Intracytoplasmic MCFV antigens were identified on 39.6% (n = 44) of the 111
14 bovine kidneys evaluated athwart the 10-year period. The morbidity, mortality and
15 lethality rates were 5.2%, 3.6% and 86.5%, respectively, with the predominance of cases
16 in the North Central Paranaense mesoregion. Significant differences in sexual, cattle
17 breeds, and seasonal predominance were not identified; however, calves with 12 months
18 of age or younger were more frequently affected. Lymphocytic interstitial nephritis
19 (93.2%; 41/44), renal vascular degeneration (84.1%; 37/44) and ballooning degeneration
20 of the renal tubules (81.8%; 36/44) were principal histopathological findings in
21 association with positive immunoreactivity to MCFV. The results suggest that the cattle
22 were infected with a MCFV, probably OvHV-2, and MCFV is endemic in state of Paraná.
23 The usage of in situ diagnosis has resulted in a greater number of cases of MCF than
24 previously described and the kidney should be collected in cases of suspected infection
25 with OvHV-2 in cattle. Additionally, renal degenerative changes should be considered in
26 the histological diagnosis of MCFV-induced infections in cattle.

27

28 **Kew words:** epidemiology, MAb-15A monoclonal antibody, histopathology, renal
29 disease.

1 INTRODUÇÃO

2 A Febre Catarral Maligna (FCM) é uma enfermidade infecciosa viral,
3 pansistêmica, linfoproliferativa e frequentemente letal (Russell *et al.*, 2009). Atualmente,
4 há 10 vírus que fazem parte do complexo de vírus da febre catarral maligna (VFCM) da
5 subfamília *Gammaherpesvirinae*, porém, somente dois destes são comuns e mais
6 amplamente estudados juntamente com seus respectivos hospedeiros reservatórios:
7 alcelaphine herpesvirus tipo 1 (AIHV-1) e gammaherpesvírus ovino tipo 2 (OvHV-2)
8 (O'Toole and Li, 2014). A infecção natural por OvHV-2 tem distribuição mundial e ocorre
9 principalmente nos hospedeiros suscetíveis como bovinos, bisões e cervídeos, sendo
10 conhecido como a forma da FCM-ovino associado (FCM-OA), em que os ovinos são
11 hospedeiros reservatórios (Coulter *et al.*, 2001; O'Toole and Li, 2014; Russell *et al.*,
12 2009).

13 A transmissão da FCM-OA ocorre principalmente por aerossóis, secreções
14 oculares e nasais de cordeiros jovens e também pode ser propagado através de fômites
15 e/ou ingestão de pastagens ou água contaminadas, sendo a proximidade com os ovinos
16 considerado um importante fator de risco para os bovinos (Baxter *et al.*, 1997; Constable
17 *et al.*, 2016; Li *et al.*, 1998). No Brasil, somente OvHV-2 foi descrito até o momento com
18 distribuição em todas as regiões do país (Headley *et al.*, 2020b).

19 Apesar de não encontrados relatos ou estudos da transmissão através da urina nos
20 animais naturalmente infectados, existe a confirmação da presença do DNA viral em
21 bexiga de coelhos experimentalmente infectados (Li *et al.*, 2011), sugerindo-se que o
22 sistema urinário possa ser uma possível via de eliminação do vírus. Ainda, existem alguns
23 estudos demonstrando a possibilidade de transmissão transplacentária (O'Toole *et al.*,
24 1997; Plowright, 1965; Rossiter, 1981), sendo corroborado por um estudo do nosso grupo
25 que encontrou lesões histológicas típicas da FCM e o DNA do OvHV-2 em uma vaca

1 infectada e seu feto (Headley *et al.*, 2015b).

2 Dados epidemiológicos demonstraram que o rim é frequentemente afetado pelo
3 VFCM (Headley *et al.*, 2020b), e portanto, um importante órgão de escolha para a
4 caracterização do agente, já que frequentemente são encontrados nefrite intersticial
5 linfocítica e vasculite como achados microscópicos associados à infecção por VFCM
6 (Headley *et al.*, 2020b). Recentemente, foi padronizado um método de diagnóstico *in situ*
7 para a identificação de antígenos de OvHV-2 pela imuno-histoquímica (IHQ), utilizando
8 o anticorpo monoclonal MAb-15A (Headley *et al.* (2020c), que pode identificar todos os
9 tipos de VFCM (Li *et al.*, 1994).

10 Uma revisão que avaliou todos os estudos publicados sobre a FCM no Brasil
11 estimou uma taxa média de morbidade de 5,6% (Headley *et al.*, 2020b). Taxas
12 semelhantes de FCM têm sido informadas em outras partes do mundo, incluindo no
13 distrito de Ngorongoro na Tanzânia (5,6-6,2%) (Cleaveland *et al.*, 2001) e no sul do
14 Quênia (3-7%) (Bedelian *et al.*, 2007). Esse índice reduzido de FCM pode ser atribuído
15 ao fato de que não existe um sistema de notificação obrigatória da doença, além do sub-
16 diagnóstico pela falta de testes sensíveis, específicos e acessíveis (O'Toole and Li, 2014).
17 Adicionalmente, a subnotificação poderia estar relacionada à ocorrência de casos de
18 bovinos sobreviventes das infecções agudas que permanecem infectados (O'Toole *et al.*,
19 1997; O'Toole *et al.*, 1995), podendo resultar em número menor de casos publicados.
20 Dessa forma, talvez as taxas de morbidade e mortalidade sejam mais elevadas do que
21 descritas. Além disso, não foi encontrada investigação retrospectiva para avaliar a
22 ocorrência de FCM e/ou infecção pelo VFCM em bovinos. Consequentemente, o objetivo
23 deste estudo é determinar a ocorrência de VFCM em bovinos e sua distribuição geográfica
24 no estado do Paraná.

25

1

2 MATERIAL E MÉTODO

3 ANIMAIS, LOCAL DE ESTUDO E CRITÉRIO DE INCLUSÃO

4 Foi realizado um estudo retrospectivo entre janeiro de 2010 e dezembro de 2019
5 dos exames histopatológicos e necroscópicos de bovinos, provenientes dos arquivos do
6 Laboratório de Patologia Animal, Universidade Estadual de Londrina (LAP-UDEL).
7 Somente foram incluídos no estudo, bovinos que possuíam requisição dos exames e
8 blocos de tecidos parafinados dos rins, sendo o material relativo a esses casos recuperados
9 dos arquivos.

10 A partir dos blocos de tecido renal parafinado, lâminas histológicas foram
11 reprocessadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para reavaliação. Os achados
12 histopatológicos foram comparados com a imunorreatividade positiva para o VFCM,
13 sendo observada pelo menos uma ou mais alterações renais típicas da infecção por OvHV-
14 2 (Headley *et al.*, 2020b; Headley *et al.*, 2020c; O'Toole and Li, 2014), incluindo a
15 alteração fibrinoide, vasculite, degeneração vascular, nefrite intersticial linfocítica,
16 degeneração balonosa dos túbulos renais e/ou uroepitélio, oclusão dos vasos e esclerose
17 glomerular.

18 As fichas clínicas dos animais foram recuperadas e os dados relacionados à
19 procedência, evolução clínica, idade, sexo e raça dos animais foram coletados e tabulados.
20 A determinação da faixa etária dos animais foi realizada conforme descrito por Lucena *et*
21 *al.* (2010), sendo subdivididos em grupos: recém-nascido (até 1 dia após o nascimento),
22 bezerro (2 dias até 12 meses), jovem (13 a 24 meses), adulto jovem (25 meses até 5 anos),
23 adulto (6 a 10 anos). Além disso, a data na qual o animal foi submetido à análise *post-*
24 *mortem* foi utilizada para determinar a estação do ano da infecção pelo VFCM.

1

2 CARACTERIZAÇÃO IHQ DE ANTÍGENOS DE MCFV

3 Fragmentos em blocos parafinados dos tecidos renais de bovinos foram
4 submetidos a ensaios imuno-histoquímicos (IHQ) para detectar a presença intralesional
5 de antígenos do VFCM. Os ensaios IHQ foram realizados conforme a técnica descrita por
6 Headley *et al.* (2020c) utilizando o anticorpo monoclonal MAb-15A (1: 400) que detecta
7 epítomos de todos os membros do complexo de VFCM (Li *et al.*, 1994). Os controles
8 positivos consistiram de tecidos parafinados de uma vaca que apresentava os antígenos
9 da OvHV-2 identificados por IHQ e o DNA viral confirmado por PCR (Queiroz *et al.*,
10 2018). Os controles negativos, utilizados em todos os ensaios IHQ para avaliar a
11 qualidade, consistiam na substituição do anticorpo primário (MAb-15A) por diluente nos
12 cortes de tecido parafinado do mesmo animal descrito acima.

13

14

15 RESULTADOS

16 DADOS BIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

17 Entre 2010 a 2019, 111 amostras de rins de bovinos de diferentes idades foram
18 submetidas ao LAP/UEL. Desses, os rins de 39,6% (44/111) bovinos apresentaram
19 imunorreatividade positiva ao VFCM pela MAb-15A (Tabela 1). A faixa etária dos
20 animais com imunorreatividade positiva para o VFCM variou de 1 dia a 8 anos, sendo
21 que 45,4% (20/44) eram terneiros (Figura 1). Quanto ao sexo dos bovinos infectados por
22 VFCM, 45,4% (20/44) eram fêmeas, 50% (22/44) machos; em 4,5% (2/44) dos animais
23 não havia essa informação nos relatórios. Embora os dados de todos os animais não

1 estivessem presentes, estimou-se que a mediana da taxa de morbidade foi de 5,2%,
2 mortalidade de 3,6% e letalidade média em 86,5% (Tabela 1).

3 Os bovinos de corte representaram 54,5% (24/44) dos animais infectados pelo
4 VFCM (Tabela 1); as raças frequentes foram a Nelore (29,5%; 13/44) e a Angus (11,4%;
5 5/44); as demais foram: Senepol (6,8%; 3/44), Brahaman (2,3%; 1/44), Red Angus (2,3%;
6 1/44) e Tabapuã (2,3%; 1/44). Os bovinos de leite contribuíram para 20,5% (9/44) dos
7 casos, sendo os mais frequentes da raça Holandesa (11,4%; 5/44) e Girolando (4,5%;
8 2/44). Adicionalmente, os antígenos de VFCM foram identificados em 25% (11/44) dos
9 bovinos mestiços.

10 Quando as estações do ano foram consideradas (Tabela 1) não teve associação
11 estatística ($p=0,4808$) pelo Teste de Qui-quadrado com o percentual de infecção. A
12 quantidade de animais infectados pelo VFCM foi observada durante o outono foi de
13 34,1% (15/44), no inverno 31,8% (14/44), na primavera 22,7 % (10/44) e verão 11,4%
14 (5/44).

15 A localização geográfica das origens dos bovinos pelas mesorregiões do estado
16 do Paraná está apresentada na Figura 2. Observou-se que quase a metade (47,7%; 21/44)
17 dos casos diagnosticados foram oriundos da mesorregião Norte Central Paranaense,
18 sendo 40,9% (18/44) destes da região de Londrina e municípios arredores (Tabela 1). As
19 outras mesorregiões com maior frequência foram a Noroeste (15,9%; 7/44) seguida pela
20 Centro Ocidental Paranaense (11,4%; 5/44). Poucos casos foram oriundos do Norte
21 Pioneiro (9,1%; 4/44), Centro Oriental (2,3%; 1/44), e Centro-Sul Paranaense (2,3%;
22 1/44). Ainda, a origem de cinco animais não foi informada.

23 O contato de bovinos com ovinos foi relatado em apenas cinco das propriedades.
24 Entretanto, em três propriedades encontravam-se equinos e em outras duas havia a criação
25 de suínos concomitantes na mesma propriedade em que ocorreram os casos de bovinos

1 infectados pelo VFCM.

2

3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS BOVINOS INFECTADOS PELO VFCM

4 A evolução clínica mediana descrita foi de 4 dias, com variação entre 1 e 30 dias
5 (Tabela 1). Dentre os 44 bovinos infectados pelo VFCM, as frequências das
6 manifestações clínicas estão apresentadas na Tabela 2. Os sinais clínicos frequentemente
7 descritos foram o decúbito (n=24), seguido por apatia, depressão e paresia flácida de
8 membros (n=15), incoordenação motora (n=14), diarreia e febre (n=13), atonia ou
9 hipomotilidade ruminal (n=12) e cegueira (n=11). Manifestações clínicas moderadamente
10 frequentes incluíram dispneia (n=7), fezes ressecadas, lesões cutâneas, secreção nasal e
11 sialorreia (n=6). Alterações clínicas infrequentes consistiam em emagrecimento (n=5),
12 aborto (n=4) e opacidade da córnea (n=2) entre outras (Tabela 2).

13

14 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS ENCONTRADAS NOS BOVINOS INFECTADOS PELO VFCM

15 A frequência dos achados macroscópicos encontrados nos animais infectados pelo
16 VFCM (n=44) está apresentada na Tabela 3, sendo que os frequentes foram enterite
17 (n=19), seguido por abomasite ou abomasite ulcerativa (n=14), palidez muscular (n=10),
18 edema pulmonar (n=10) e congestão encefálica (n=8). Alterações moderadamente
19 frequentes incluíram pneumonia (n=7), congestão renal (n=6) e linfonodomegalia (n=5).
20 Algumas das lesões macroscópicas infrequentes eram infarto renal, hemorragia e
21 consolidação pulmonar (n=4), encefalomalácia (n=2) e necrose esofágica (n=1).

22

1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E IMUNORREATIVIDADE PARA VFCM

2 Imunorreatividade intracitoplasmática positiva para o VFCM foi identificada
3 principalmente nas células epiteliais dos túbulos renais de todos os bovinos infectados
4 (Figura 5 A-F), além de uroepitélio e capilares. Os achados histopatológicos mais
5 frequentemente observados nos rins dos animais com imunorreatividade positiva para o
6 VFCM são representados na Figura 3, sendo caracterizados predominantemente por
7 nefrite intersticial linfocítica (93,2%; 41/44; Figura 4-C e 4-D), degeneração vascular
8 (84,1%; 37/44; Figura 4-E) e degeneração balonosa dos túbulos renais (81,1%; 36/44;
9 Figura 4-A e 4-B) e uroepitélio (22,7%; 10/44; Figura 4-F). Vasculite (2,3%; 1/44),
10 esclerose glomerular (15,9%; 7/44) e oclusão dos vasos (9,1%; 4/44) foram as alterações
11 histológicas pouco frequentes, enquanto a alteração fibrinoide foi observada em apenas
12 4,5% (2/44) dos animais avaliados.

13

14 DISCUSSÃO

15 Os dados desse estudo demonstraram que a técnica de IHQ foi eficiente para
16 identificar os antígenos intracitoplasmáticos e intralesionais do VFCM em tecidos renais
17 de bovinos. Atualmente, somente o OvHV-2 foi diagnosticado em ruminantes com FCM
18 no Brasil (Headley *et al.*, 2020b; Headley *et al.*, 2020c). Adicionalmente, o anticorpo
19 utilizado nos ensaios de IHQ durante esse estudo poderia identificar qualquer um dos
20 agentes pertencentes ao complexo do VFCM (Li *et al.*, 1994) e foi confirmada sua
21 eficiência na identificação de antígenos intralesionais de OvHV-2 em bovinos com FCM
22 (Headley *et al.*, 2020c). Entretanto, haverá a necessidade de uma análise complementar,
23 possivelmente, molecular para identificar o vírus associado a infecção pelo VFCM nos
24 bovinos infectados nesse estudo. No entanto, estudos já identificaram antígenos
25 intralesionais por IHQ de um VFCM em bovino com doença pulmonar (Headley *et al.*,

1 2020a), e estudos em andamento têm demonstrado a participação de um VFCM,
2 provavelmente, OvHV-2, no desenvolvimento de pneumonia em bovinos (Oliveira et al,
3 artigo em preparação). Considerando tudo isso, é altamente provável que o vírus
4 identificado nesses animais seja OvHV-2.

5

6 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

7 Os dados desse estudo demonstraram que a taxa de infecção pelo VFCM foi de
8 39,6% (44/111), sendo menor que taxa de infecção por OvHV-2 de 70% (21/30) detectado
9 por CI-ELISA ou PCR realizado em um rebanho de gado leiteiro sem sinais clínicos de
10 FCM no Colorado-EUA (Powers *et al.*, 2005), assim como, em um estudo epidemiológico
11 utilizando diagnóstico sorológico e molecular realizado no Quênia, que identificou taxas
12 de infecção de 94% por PCR e 63% por sorologia em bovinos com manifestações clínicas
13 da FCM (Orono *et al.*, 2019). Entretanto, no oeste dos Estados Unidos a taxa de infecção
14 pelo VFCM em bisões confinados foi de 36,3% (93/256), valor aproximado ao
15 encontrado nesse estudo (O'Toole *et al.*, 2002). Enquanto no Brasil, a doença tem a taxa
16 média de morbidade estimada em 5,6% (818/14.521) a partir de uma revisão dos casos
17 de FCM publicados no país e de 16,3% (60/367) atribuídos ao estado do Paraná (Headley
18 *et al.*, 2020b). É importante ressaltar que há distinção entre doença e infecção, dado que
19 animais suscetíveis infectados pelo VFCM nem sempre apresentam as manifestações
20 clínicas da doença. Considerando isso, a variação dessas taxas de ocorrência em
21 diferentes partes do mundo seja em razão dos estudos avaliarem as taxas da doença ou
22 das infecções latentes e/ou subclínicas. Ainda, há evidências de que níveis significativos
23 de infecção subclínica ou latente estão presentes em bovinos e bisões normais
24 (Cleaveland *et al.*, 2001) e infecções por FCM podem ser mantidas em rebanhos de gado
25 sem contato próximo com ovinos (Yeşilbağ, 2007). Além disso, a diferença entre as taxas

1 poderia estar relacionada ao método de diagnóstico utilizado em cada estudo, pois em
2 muitos casos no Brasil o diagnóstico foi baseado nas alterações histológicas típicas da
3 infecção induzida por OvHV-2 somente nos bovinos sintomáticos. Entretanto, a diferença
4 demonstra que o diagnóstico *in situ* utilizado nesse estudo é preciso, resultando em uma
5 taxa de infecção mais elevada quando comparado com a taxa média de morbidade no
6 Brasil, sugerindo que a taxa real de infecção no rebanho bovino brasileiro seja maior do
7 que publicado, contribuindo assim para a subnotificação da FCM (O'Toole and Li, 2014).

8 Durante todos os 10 anos desse estudo, havia pelo menos dois bovinos infectados
9 anualmente com o VFCM, demonstrando que a doença é endêmica nos bovinos do estado
10 do Paraná. Deve ser salientado ainda que apenas 6,8% (3/44) dos animais tinham o
11 diagnóstico de FCM nos laudos arquivados e que 95,4% (42/44) dos animais infectados
12 pelo VFCM não apresentaram lesões histológicas clássicas da doença, por exemplo, a
13 vasculite e alteração fibrinoide dos vasos (Liggitt and DeMartini, 1980; O'Toole and Li,
14 2014). Portanto, mais estudos são necessários para a investigação da relação entre
15 infecção pelo VFCM subclínica e/ou latente e desenvolvimento de doença clínica.

16 O mapeamento da distribuição da FCM no Paraná, nunca feito anteriormente,
17 demonstrou que existem animais infectados pelo VFCM em diversas mesorregiões do
18 estado. Contudo, a distribuição dos casos não foi uniforme, sendo um fator limitante
19 observado neste estudo retrospectivo, no qual, não havia a representatividade homogênea
20 de exames avaliados em todas as mesorregiões. Número expressivo de casos (21/44;
21 47,7%) foi oriundo do Norte Central Paranaense, com porcentagem elevada proveniente
22 da região de Londrina e municípios arredores (18/44; 40,9%). Possivelmente, isso é
23 devida à localização geográfica do LAP-UEL na mesorregião Norte Central.
24 Adicionalmente, muitos dos bovinos com imunorreatividade positiva para o VFCM
25 foram oriundos de um estudo de doença neurológica de bovinos que demonstrou que a

1 maior porcentagem dos animais avaliados veio dessa mesorregião (Queiroz *et al.*, 2018).
2 Finalmente, esses resultados sugerem que VFCM talvez seja uma das infecções mais
3 frequentes em bovinos no estado do Paraná, porém, pouco diagnosticado.

4 Neste estudo não houve predileção sexual significativa nos bovinos infectados
5 pelo VFCM; dados semelhantes foram descritos (Constable *et al.*, 2016; Garmatz *et al.*,
6 2004; Rech *et al.*, 2005), sugerindo que não há predisposição sexual relacionado à
7 infecção por VFCM. Entretanto, maior número de bovinos de corte foi infectado pelo
8 VFCM em relação aos bovinos leiteiros e mestiços nesse estudo. Dados semelhantes
9 foram identificados nos casos de FCM em bovinos nos relatos brasileiros (Headley *et al.*,
10 2020b); a maior ocorrência de infecção em bovinos de corte em relação a leite talvez seja
11 diretamente relacionada à maior frequência de avaliações patológicas realizadas em
12 bovinos de corte. Adicionalmente, já foi documentada que os bovinos são igualmente
13 susceptíveis, independentemente da raça, à infecção por VFCM (Constable *et al.*, 2016;
14 Moore *et al.*, 2010). Ainda a predominância de bovinos de corte infectados pelo VFCM
15 no Estado do Paraná poderia estar relacionada com a bovinocultura paranaense, onde nas
16 mesorregiões Noroeste, Norte Central e Norte Pioneiro concentram mais da metade
17 (52,3%) da população de bovinos de corte do estado (Oliveira *et al.*, 2015), enquanto que
18 nas mesorregiões Oeste, Sudoeste e Centro Sul, há predominância bovinocultura leiteira
19 (IBGE, 2020). Conseqüentemente, a maior quantidade de resultados positivos em bovinos
20 de corte nesse estudo talvez seja diretamente relacionada à localização geográfica do
21 LAP-UEL.

22 A idade dos bovinos com imunorreatividade positiva variou de 1 dia a 8 anos,
23 porém a ocorrência desta enfermidade foi maior em animais com até 12 meses, período
24 diferente daquele descrito no Rio Grande do Sul (Rech *et al.*, 2005) em que os surtos
25 ocorreram predominantemente em animais de 18 meses a 4 anos, com predomínio de

1 animais com 2 anos de idade. Assim como, casos ocorridos do Mato Grosso, no qual os
2 bovinos tinham entre 8 meses a 4 anos, sendo um dos surtos com animais de 2 a 3 anos
3 (Mendonça *et al.*, 2008). Em contrapartida, O'Toole and Li (2014) descrevem que a FCM
4 geralmente afeta bovinos jovens de 8 a 24 meses.

5 Não houve predominância de bovinos infectados pelo VFCM em nenhuma
6 estação do ano. Entretanto, notou-se um maior número de animais infectados durante o
7 outono (15/44; 34,1%) e inverno (14/44; 31,8%); que contrasta com estudos anteriores
8 feitos no Brasil em que maior número de casos de FCM foram observados
9 predominantemente no verão (8/14; 57%) (Mendonça *et al.*, 2008) e na primavera
10 (133/222; 60%) (Rech *et al.*, 2005). Adicionalmente, são diferentes da sazonalidade
11 descrita no verão no Uruguai (18/38; 47%) (Preliasco *et al.*, 2013) e Zimbabwe (Mlilo *et*
12 *al.*, 2015). Talvez a sazonalidade da ocorrência de FCM seja diretamente relacionada a
13 período gestacional do hospedeiro do VFCM em diferentes partes do mundo e não com
14 o fotoperíodo característico das estações do ano. O maior pico das infecções por OvHV-
15 2 ocorre durante a estação de parição de ovinos (O'Toole and Li, 2014), período em que
16 os bovinos têm maior risco de se infectar devido ao contato com ovinos nessa época
17 (Baxter *et al.*, 1997; Reid *et al.*, 1984). Adicionalmente, os cordeiros de 6 a 9 meses de
18 idade são considerados como os principais disseminadores do vírus (Li *et al.*, 2008b; Li
19 *et al.*, 1998) para bovinos suscetíveis. Além disso, em ambientes subtropicais, os ovinos
20 podem apresentar poliestro intermitente ou sazonalidade reprodutiva, podendo também
21 ter outros fatores moduladores da estação reprodutiva (Rosa and Bryant, 2003). No
22 entanto, autores descrevem que FCM-OA ocorre durante todo o ano (Barnard BJ, 1994).
23 Ainda, há descrição da ocorrência de casos de FCM sem a presença de ovinos próximos
24 e que as infecções pelo VFCM podem ser mantidas em rebanhos de ruminantes
25 suscetíveis, portanto deve ser lembrado que a interação direta entre bovinos e ovinos não

1 é absolutamente necessária para a disseminação do OvHV-2 (Li *et al.*, 2008b; Yeşilbağ,
2 2007).

3

4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

5 Durante esse estudo a mediana da evolução clínica dos animais com
6 imunorreatividade positiva para o VFCM foi 4 dias, sugerindo uma infecção aguda
7 (Liggitt *et al.*, 1978; Van Metre D, 2008); dados semelhantes foram descritos quando
8 todos os casos de FCM em bovinos no Brasil foram comparados (Headley *et al.*, 2020b).
9 Coletivamente, esses resultados sugerem que bovinos no Brasil são mais frequentemente
10 acometidos pela manifestação aguda da FCM.

11 Existem diversas apresentações clínicas associadas à FCM em bovinos como a
12 forma “cabeça-e-olho”, aguda e crônica (Headley *et al.*, 2020b; O'Toole and Li, 2014).
13 No entanto, estudos corroboram que infecções não letais ou subclínicas ocorram em
14 ruminantes suscetíveis assintomáticos/normais (Cleaveland *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1996;
15 Powers *et al.*, 2005). Nesse estudo, as manifestações clínicas frequentemente descritas
16 foram decúbito, apatia, depressão, paresia flácida de membros, incoordenação motora,
17 febre e cegueira, esses sinais clínicos podem ser observados em um amplo espectro de
18 doenças tornando difícil o diagnóstico clínico, mas correspondem com as manifestações
19 neurológicas observadas na FCM (Headley SA *et al.*, 2013; Headley *et al.*, 2020c; Lemos
20 *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2017; O'Toole and Li, 2014). Entretanto, lesões oculares
21 (como a opacidade da córnea) e secreções oculares e nasais que são frequentemente
22 observadas na FCM (O'Toole and Li, 2014) não foram frequentemente observadas nesse
23 estudo, que provavelmente poderia estar relacionada à redução do número de casos
24 diagnosticados clinicamente. Alternativamente, quando ocorrem as manifestações
25 clínicas clássicas da FCM em bovinos, há correlação direta entre o diagnóstico clínico e

1 laboratorial (Orono *et al.*, 2019).

2 A diarreia e atonia ou hipomotilidade ruminal também foram manifestações
3 clínicas frequentes observadas durante esse estudo, podendo ser observadas em bovinos
4 com a forma alimentar da FCM (Plowright, 1990). Adicionalmente, bovinos com
5 manifestações clínicas de diarreia foram simultaneamente infetados pela BVDV e OvHV-
6 2 (Headley *et al.*, 2020a) e diarreia foi uma manifestação muito frequente descrita em
7 bovinos com FCM no Brasil (Headley *et al.*, 2020b). Ainda, 150 bisões do oeste dos
8 Estados Unidos morreram por uma síndrome entérica fatal causada pelo OvHV-2
9 (O'Toole *et al.*, 2002). Conseqüentemente, esses dados sugerem que a FCM deveria ser
10 incluída no diagnóstico diferencial de doenças do trato digestório de bovinos.

11

12 ACHADOS PATOLÓGICOS

13 As principais alterações macroscópicas observadas foram a enterite (19/44;
14 43,2%), abomasite/abomasite ulcerativa (14/44; 31,8%), entre outros achados afetando
15 principalmente trato digestório, respiratório, sistema nervoso central, urinário, linfático e
16 musculoesquelético. Uma comparação de estudos brasileiros sobre FCM em bovinos
17 encontrou achados macroscópicos similares (Headley *et al.*, 2020b); lesões intestinais são
18 frequentemente relatadas em bovinos infetados por OvHV-2 (Headley *et al.*, 2020c;
19 Liggitt *et al.*, 1978; O'Toole *et al.*, 1997). Adicionalmente, os pré-estômagos e abomaso
20 de bovinos com FCM comumente apresentam ulcerações (O'Toole *et al.*, 2002).
21 Complementando isso, altas quantidades de DNA de OvHV-2 foram amplificadas do
22 intestino (Pesavento *et al.*, 2019) e abomaso (Hüssy *et al.*, 2002) de ovelhas, sugerindo
23 uma possível transmissão fecal-oral (Hüssy *et al.*, 2002). Existe a hipótese de que haja
24 alguma participação do trato gastrointestinal na patogênese da FCM (Headley *et al.*,
25 2020c), portanto, estudos futuros ajudariam a elucidar o papel do intestino e abomaso na

1 disseminação e/ou manutenção do VFCM. Consequentemente, as alterações digestórias
2 macroscópicas observadas em bovinos com FCM devem ser consideradas no diagnóstico
3 diferencial para as doenças intestinais de bovinos, particularmente, a BVD.

4 A nefrite intersticial linfocítica foi a alteração histológica mais frequentemente
5 observada durante esse estudo; resultados semelhantes foram descritos quando as
6 alterações histológicas de bovinos com FCM no Brasil foram comparadas (Headley *et al.*,
7 2020b). Adicionalmente, essas alterações renais são frequentes em bovinos com FCM no
8 mundo todo (O'Toole and Li, 2014), com a amplificação do DNA do OvHV-2 (Garmatz
9 *et al.*, 2004; Headley *et al.*, 2012). Outros achados frequentes no rim foram as lesões
10 degenerativas vasculares; as alterações vasculares associadas à infecção por OvHV-2 são
11 variadas, incluindo hipertrofia endotelial, obliteração vascular, angiopatia e alteração
12 fibrinoide (Liggitt and DeMartini, 1980; O'Toole *et al.*, 1997; O'Toole *et al.*, 1995).
13 Adicionalmente, a degeneração balonosa dos túbulos renais e uroepitélio da papila renal
14 foram comumente vistas neste trabalho, um achado interessante também encontrado em
15 outros estudos nos rins (Headley *et al.*, 2020c) e no epitélio do ureter e uretra (O'Toole *et*
16 *al.*, 2002; O'Toole *et al.*, 2007). Deve ser salientado que não houve padrão na colheita dos
17 tecidos; portanto, alguns rins não tinham uroepitélio no corte histológico e,
18 consequentemente, as alterações degenerativas nesse local poderiam ter sido diferentes
19 do que as encontradas nesse estudo. Coletivamente esses dados sugerem que os rins são
20 úteis no diagnóstico da FCM nos bovinos naturalmente infectados através de ensaios IHQ
21 associados a lesões inflamatórias e degenerativas.

22 Houve algumas limitações durante esse estudo retrospectivo que devem ser
23 considerados durante a interpretação dos resultados. Por ser um estudo retrospectivo, não
24 houve padronização na coleta de órgãos na necropsia, como consequência nem sempre
25 os rins foram colhidos para o processamento histológico ou o rim coletado não continha

1 o uroepitélio para avaliação. Assim, mais animais poderiam ter sido incluídos no estudo
2 e os resultados poderiam ter sido diferentes. Adicionalmente, não foi possível a realização
3 de análise molecular, pois na maioria das vezes, fragmentos do tecido renal não foram
4 armazenados adequadamente durante a avaliação post-mortem dos animais. Acreditamos
5 que o tutor do animal e/ou responsável pela coleta dos dados epidemiológicos, poderia
6 ter esquecido de fatos importantes para o estudo específico, pois não houve padronização
7 do inquérito epidemiológico. Entretanto, os dados apresentados representam os dados
8 encontrados durante o estudo retrospectivo.

9

10 CONCLUSÃO

11 A utilização de método de diagnóstico *in situ* por meio de tecidos parafinados
12 possibilitou a identificação de um número maior de animais infectados pelo VFCM nos
13 rins de bovinos. Os dados demonstraram que o rim é um importante órgão no diagnóstico
14 patológico da VFCM por IHQ, com os principais achados histológicos sendo nefrite
15 intersticial linfocítica e alterações degenerativas vasculares e tubulares. Adicionalmente,
16 a ocorrência de VFCM dos bovinos acometidos no Paraná é endêmica, sem predisposição
17 racial, sexual e sazonalidade.

18

19

20 AGRADECIMENTOS

21 Os autores são gratos pelo anticorpo monoclonal contra o VFCM (MAb-15A) usado
22 durante esta investigação, gentilmente cedido pelo Departamento de Agricultura dos
23 Estados Unidos da América, Pullman, Washington, Estados Unidos da América. Xavier,
24 A.A.C. é bolsista da Agência federal de Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de
25 Nível Superior (CAPES; Brasil). Lisbôa, JAN e Headley, SA são bolsista de CNPq.

1 CONFLITO DE INTERESSES

- 2 Os autores declararam não haver potenciais conflitos de interesse com relação à pesquisa,
3 autoria e/ou publicação deste artigo.

1 7 REFERÊNCIAS

- 2 ABIEC. (2018). Brazilian livestock profile. Brazilian Beef Exporters Association.
- 3 Baptista, F. and Guidi, P. (1988). Febre catarral maligna no estado do Paraná. *Hora Vet.*,
4 **45**, 33-37.
- 5 Barnard BJ, v. d. L. J., Mushi EZ. (1994). Malignant catarrhal fever. In: *Infectious*
6 *Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, G. T. JA
7 Coetzer, RC Tustin, Ed, pp. 946–957.
- 8 Baxter, S. I., Pow, I., Bridgen, A. and Reid, H. W. (1993). PCR detection of the sheep-
9 associated agent of malignant catarrhal fever. *Archives Virology*, **132**, 145-159.
- 10 Baxter, S. I., Wiyono, A., Pow, I. and Reid, H. W. (1997). Identification of *ovine*
11 *herpesvirus-2* infection in sheep. *Archives Virology*, **142**, 823-831.
- 12 Bedelian, C., Nkedianye, D. and Herrero, M. (2007). Maasai perception of the impact and
13 incidence of malignant catarrhal fever (MCF) in southern Kenya. *Preventive*
14 *Veterinary Medicine*, **78**, 296-316.
- 15 Berezowski, J. A., Appleyard, G. D., Crawford, T. B., Haigh, J., Li, H., Middleton, D.
16 M., O'Connor, B. P., West, K. and Woodbury, M. (2005). An outbreak of sheep-
17 associated malignant catarrhal fever in bison (*Bison bison*) after exposure to sheep
18 at a public auction sale. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **17**, 55-
19 58.
- 20 Brown CC, B. D., Barker IK. (2007). Alimentary system. In: *Pathology of Domestic*
21 *Animals*, M. MG, Ed, Vol. Vol 2, Saunders Elsevier, UK, pp. 152–159.
- 22 Carmo, P., Oliveira, K., Barioni, G., Oliveira-Filho, J. and Souza, T. (2011). Malignant
23 Catarrhal Fever in a Calf in Espírito Santo State, Brazil: Report of the First Case.
24 *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, **4**.
- 25 Cleaveland, S., Kusiluka, L., Bell, C., Kuwai, J. O. and Kazwala, R. (2001). Assessing

- 1 the impact of malignant catarrhal fever in Ngorongoro District, Tanzania. *Animal*
2 *Health Programme, Department for International Development, Tanzania.*
- 3 Constable, P., Hinchcliff, K., Sd, D. and Gruenberg, W. (2016). *Veterinary Medicine: A*
4 *textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.*
- 5 Coulter, L. J., Wright, H. and Reid, H. W. (2001). Molecular genomic characterization of
6 the viruses of malignant catarrhal fever. *Journal of Comparative Pathology*, **124**,
7 2-19.
- 8 Cunha, C., Otto, L., Taus, N., Knowles, D. and Li, H. (2009). Development of a multiplex
9 real-time PCR for detection and differentiation of malignant catarrhal fever
10 viruses in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 2586-2589.
- 11 Cunha, C. W., Gailbreath, K. L., O'Toole, D., Knowles, D. P., Schneider, D. A., White,
12 S. N., Taus, N. S., Davies, C. J., Davis, W. C. and Li, H. (2012). Ovine herpesvirus
13 2 infection in American bison: virus and host dynamics in the development of
14 sheep-associated malignant catarrhal fever. *Veterinary Microbiology*, **159**, 307-
15 319.
- 16 Flach, E. J., Reid, H., Pow, I. and Klemm, A. (2002). Gamma herpesvirus carrier status of
17 captive artiodactyls. *Research in Veterinary Science*, **73**, 93-99.
- 18 Garmatz, S. L., Irigoyen, L. F., Rech, R. R., Brown, C. C., Zhang, J. and Barros, C. S. L.
19 (2004). Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: transmissão
20 experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. *Pesquisa*
21 *Veterinária Brasileira*, **24**, 93-103.
- 22 Headley SA, Lisbôa JAN and JTT, F. (2013). Ovine herpesvirus type-2 induced
23 malignant catarrhal fever in a heifer. *Semina: ciências agrárias*, **34**, 3903–3908.
- 24 Headley, S. A., Müller, M. C., Oliveira, T. E. S., Barros Gil Duarte, C. A., Valente
25 Pereira, P. F., Vieira, M. V., Cunha, C. W., Flores, E. F., Lisbôa, J. A. N. and

- 1 Pretto-Giordano, L. G. (2020a). Diphtheric aspergillosis tracheitis with
2 gastrointestinal dissemination secondary to viral infections in a dairy calf.
3 *Microbial Pathogenesis*, **149**, 104497.
- 4 Headley, S. A., Oliveira, T. E. S. and Cunha, C. W. (2020b). A review of the
5 epidemiological, clinical, and pathological aspects of malignant catarrhal fever in
6 Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **51**, 1405-1432.
- 7 Headley, S. A., Oliveira, T. E. S., Li, H., Lisbôa, J. A. N., Queiroz, G. R., Fritzen, J. T.
8 T., Flores, E. F., Alfieri, A. A. and Cunha, C. W. (2020c). Immunohistochemical
9 detection of intralesional antigens of ovine gammaherpesvirus-2 in cattle with
10 sheep-associated malignant catarrhal fever. *Journal of Comparative Pathology*,
11 **174**, 86-98.
- 12 Headley, S. A., Pimentel, L. A., Oliveira, V. H., Toma, H. S., Alfieri, A. F., Carvalho, A.
13 M., dos Santos, M. D. and Alfieri, A. A. (2015a). Transplacental transmission of
14 ovine herpesvirus-2 in cattle with sheep-associated malignant catarrhal fever.
15 *Journal of Comparative Pathology*, **153**, 206-211.
- 16 Headley, S. A., Pimentel, L. A., Oliveira, V. H., Toma, H. S., Alfieri, A. F., Carvalho, A.
17 M., dos Santos, M. D. and Alfieri, A. A. (2015b). Transplacental transmission of
18 Ovine Herpesvirus 2 in cattle with sheep-associated malignant catarrhal fever.
19 *Journal of Comparative Pathology*, **153**, 206-211.
- 20 Headley, S. A., Sousa, I. K., Minervino, A. H., Barros, I. O., Barrêto Júnior, R. A., Alfieri,
21 A. F., Ortolani, E. L. and Alfieri, A. A. (2012). Molecular confirmation of ovine
22 herpesvirus 2 induced malignant catarrhal fever lesions in cattle from Rio Grande
23 do Norte, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **32**, 1213-1218.
- 24 Hüßy, D., Janett, F., Albin, S., Stäuber, N., Thun, R. and Ackermann, M. (2002).
25 Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma

- 1 herpesvirus 2. *Journal of clinical microbiology*, **40**, 4700-4704.
- 2 Hüseyin, D., Stäuber, N., Leutenegger, C., Rieder, S. and Ackermann, M. (2001).
3 Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication
4 in sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**, 123-128.
- 5 IBGE. (2020). Instituto brasileiro de geografia e estatística. , Vol. 2020,
6 <https://sidra.ibge.gov.br/>.
- 7 James, M. P., Neilson, F. J. A. and Stewart, W. J. (1975). An epizootic of malignant
8 catarrhal fever. *New Zealand Veterinary Journal*, **23**, 9-12.
- 9 Lemos, R. A. A. d., Rech, R. R., Guimarães, E. B., Kadri, A. and Dutra, I. d. S. (2005).
10 Febre catarral maligna em bovinos do Mato Grosso do Sul e de São Paulo. *Ciência*
11 *Rural*, **35**, 932-934.
- 12 Li, H., Cunha, C. W., Davies, C. J., Gailbreath, K. L., Knowles, D. P., Oaks, J. L. and
13 Taus, N. S. (2008a). Ovine herpesvirus 2 replicates initially in the lung of
14 experimentally infected sheep. *The Journal of general virology*, **89**, 1699-1708.
- 15 Li, H., Cunha, C. W., Gailbreath, K. L., O'Toole, D., White, S. N., Vanderplasschen, A.,
16 Dewals, B., Knowles, D. P. and Taus, N. S. (2011). Characterization of ovine
17 herpesvirus 2-induced malignant catarrhal fever in rabbits. *Veterinary*
18 *Microbiology*, **150**, 270-277.
- 19 Li, H., Cunha, C. W., Taus, N. S. and Knowles, D. P. (2014). Malignant catarrhal fever:
20 inching toward understanding. *Annual Review of Animal Biosciences*, **2**, 209-233.
- 21 Li, H., Gailbreath, K., Bender, L. C., West, K., Keller, J. and Crawford, T. B. (2003).
22 Evidence of three new members of malignant catarrhal fever virus group in
23 muskox (*Ovibos moschatus*), Nubian ibex (*Capra nubiana*), and gemsbok (*Oryx*
24 *gazella*). *Journal of wildlife diseases*, **39**, 875-880.
- 25 Li, H., Karney, G., O'Toole, D. and Crawford, T. B. (2008b). Long distance spread of

- 1 malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. *Canadian*
2 *Veterinary Journal*, **49**, 183-185.
- 3 Li, H., McGuire, T. C., Müller-Doblies, U. U. and Crawford, T. B. (2001). A simpler,
4 more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for
5 detection of antibody to malignant catarrhal fever viruses. *Journal of Veterinary*
6 *Diagnostic Investigation*, **13**, 361-364.
- 7 Li, H., O'Toole, D., Kim, O., Oaks, J. L. and Crawford, T. B. (2005). Malignant catarrhal
8 fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2.
9 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **17**, 171-175.
- 10 Li, H., Shen, D. T., Jessup, D. A., Knowles, D. P., Gorham, J. R., Thorne, T., O'Toole,
11 D. and Crawford, T. B. (1996). Prevalence of antibody to malignant catarrhal
12 fever virus in wild and domestic ruminants by competitive-inhibition ELISA.
13 *Journal of Wildlife Diseases*, **32**, 437-443.
- 14 Li, H., Shen, D. T., Knowles, D. P., Gorham, J. R. and Crawford, T. B. (1994).
15 Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in
16 sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever
17 virus. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 1674-1679.
- 18 Li, H., Snowder, G., O'Toole, D. and Crawford, T. B. (1998). Transmission of ovine
19 herpesvirus 2 in lambs. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 223-226.
- 20 Li, H., Taus, N. S., Lewis, G. S., Kim, O., Traul, D. L. and Crawford, T. B. (2004).
21 Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode
22 for transmission. *Journal of clinical microbiology*, **42**, 5558-5564.
- 23 Liggitt, H. D. and DeMartini, J. C. (1980). The pathomorphology of malignant catarrhal
24 fever. I. Generalized lymphoid vasculitis. *Veterinary Pathology*, **17**, 58-72.
- 25 Liggitt, H. D., DeMartini, J. C., McChesney, A. E., Pierson, R. E. and Storz, J. (1978).

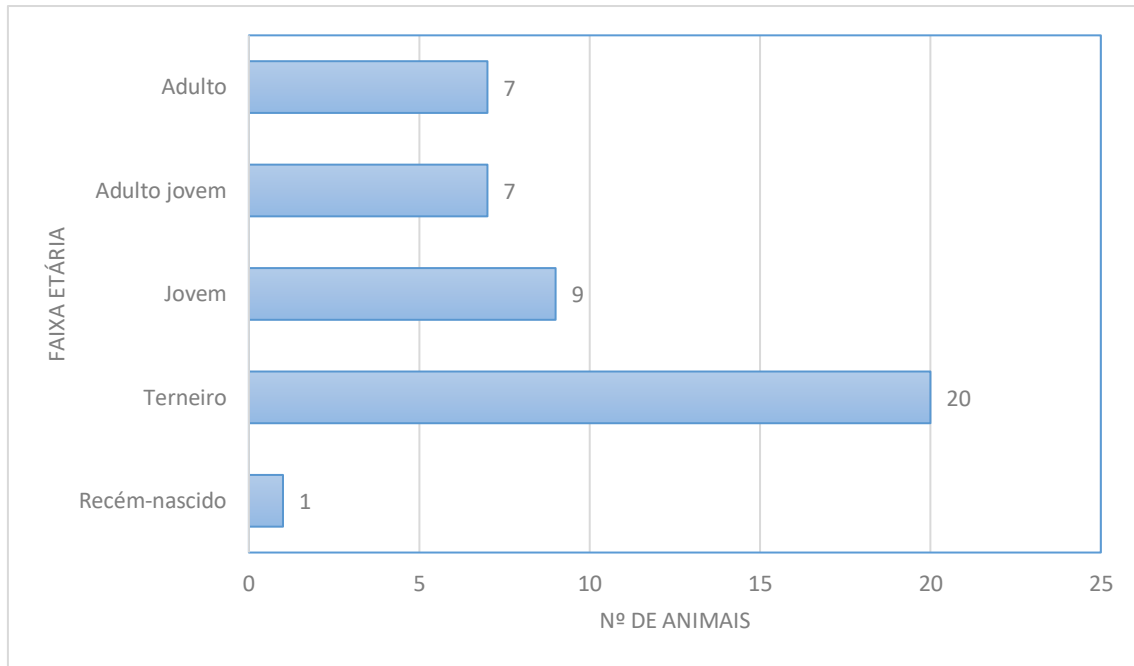
- 1 Experimental transmission of malignant catarrhal fever in cattle: gross and
2 histopathologic changes. *American journal of veterinary research*, **39**, 1249-
3 1257.
- 4 Lucena, R. B., Pierezan, F., Kommers, G. D., Irigoyen, L. F., Figuera, R. A. and Barros,
5 C. S. L. (2010). Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesquisa*
6 *Veterinária Brasileira*, **30**, 428-434.
- 7 Macêdo, J. T. S. A., Riet-Correa, F., Simões, S. V. D., Dantas, A. F. M. and Nobre, V.
8 M. T. (2007). Febre catarral maligna em bovinos na Paraíba. *Pesquisa Veterinária*
9 *Brasileira*, **27**, 277-281.
- 10 Martins, M. d. S. N., Castro, A. M. M. G. d., Lima, M. d. S., Pinto, V. d. S. C., Silva, T.
11 G. d., Fava, C. D., Depes, C. R., Okuda, L. H. and Pituco, E. M. (2017). Malignant
12 catarrhal fever in brazilian cattle presenting with neurological syndrome.
13 *Brazilian Journal of Microbiology*, **48**, 366-372.
- 14 Mendonça, F. S., Dória, R. G. S., Schein, F. B., Freitas, S. H., Nakazato, L., Boabaid, F.
15 M., Paula, D. A. J., Dutra, V. and Colodel, E. M. (2008). Febre catarral maligna
16 em bovinos no estado de Mato Grosso. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **28**, 155-
17 160.
- 18 Mlilo, D., Mhlanga, M., Mwembe, R., Sisito, G., Moyo, B. and Sibanda, B. (2015). The
19 epidemiology of malignant catarrhal fever (MCF) and contribution to cattle losses
20 in farms around Rhodes Matopos National Park, Zimbabwe. *Tropical animal*
21 *health and production*, **47**, 989-994.
- 22 Moore, D. A., Kohrs, P., Baszler, T., Faux, C., Sathre, P., Wenz, J. R., Eldridge, L. and
23 Li, H. (2010). Outbreak of malignant catarrhal fever among cattle associated with
24 a state livestock exhibition. *Journal of the American Veterinary Medical*
25 *Association*, **237**, 87-92.

- 1 O'Toole, D. and Li, H. (2014). The pathology of malignant catarrhal fever, with an
2 emphasis on ovine herpesvirus 2. *Veterinary Pathology*, **51**, 437-452.
- 3 O'Toole, D., Li, H., Miller, D., Williams, W. R. and Crawford, T. B. (1997). Chronic and
4 recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. *Veterinary*
5 *Record*, **140**, 519-524.
- 6 O'Toole, D., Li, H., Roberts, S., Rovnak, J., DeMartini, J., Cavender, J., Williams, B. and
7 Crawford, T. (1995). Chronic generalized obliterative arteriopathy in cattle: a
8 sequel to sheep-associated malignant catarrhal fever. *Journal of Veterinary*
9 *Diagnostic Investigation*, **7**, 108-121.
- 10 O'Toole, D., Li, H., Sourk, C., Montgomery, D. L. and Crawford, T. B. (2002). Malignant
11 catarrhal fever in a bison (*Bison bison*) feedlot, 1993-2000. *Journal of Veterinary*
12 *Diagnostic Investigation*, **14**, 183-193.
- 13 O'Toole, D., Taus, N. S., Montgomery, D. L., Oaks, J. L., Crawford, T. B. and Li, H.
14 (2007). Intra-nasal inoculation of American bison (*Bison bison*) with ovine
15 herpesvirus-2 (OvHV-2) reliably reproduces malignant catarrhal fever.
16 *Veterinary Pathology*, **44**, 655-662.
- 17 OIE. (2013). Malignant catarrhal fever. Technical disease cards., Vol. 2020,
18 <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/technical-disease-cards>.
- 19 Oliveira, R. A. M., Lorenzetti, E., Alfieri, A. A. and Lisbôa, J. A. N. (2015). Prevalência
20 das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no Estado do
21 Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **67**, 1217-1225.
- 22 Orono, S. A., Gitao, G. C., Mpatwenumugabo, J. P., Chepkwony, M., Mutisya, C.,
23 Okoth, E., Bronsvort, B. M. C., Russell, G. C., Nene, V. and Cook, E. A. J.
24 (2019). Field validation of clinical and laboratory diagnosis of wildebeest
25 associated malignant catarrhal fever in cattle. *BMC Veterinary Research*, **15**, 69.

- 1 Pesavento, P. A., Cunha, C. W., Li, H., Jackson, K. and O'Toole, D. (2018). *In situ*
2 hybridization for localization of ovine herpesvirus 2, the agent of sheep-associated
3 malignant catarrhal fever, in formalin-fixed tissues. *Veterinary Pathology*, **56**, 78-
4 86.
- 5 Pesavento, P. A., Dange, R. B., Ferreras, M. C., Dasjerdi, A., Pérez, V., LaRoca, A.,
6 Silván, J. B., Diab, S., Jackson, K., Phillips, I. L., Li, H., Cunha, C. W. and
7 Wessels, M. (2019). Systemic necrotizing vasculitis in sheep is associated with
8 ovine herpesvirus 2. *Veterinary Pathology*, **56**, 87-92.
- 9 Pinheiro de Oliveira, T. F., Laguardia-Nascimento, M., Xavier, F. G., do Amaral Pinto,
10 C., Ferreira, L. R., de Castro Campos de Souza, I., Hammerschmitt, M. E.,
11 Bianchi, R. M., Wronski, J. G., Etges, R. N., Rigon, G. M., Camargos, M. F.,
12 Júnior, A. V. R. and Fonseca Junior, A. A. (2019). Quantification of ovine
13 herpesvirus 2 by digital PCR in an outbreak of malignant catarrhal fever. *Archives*
14 *Virology*, **164**, 3045-3050.
- 15 Plowright, W. (1965). Malignant catarrhal fever in east Africa: I.—Behaviour of the virus
16 in free-living populations of blue wildebeest (*Gorgon taurinus taurinus*,
17 *Burchell*). *Research in Veterinary Science*, **6**, 56-68.
- 18 Plowright, W. (1990). Malignant catarrhal fever virus. In: *Virus Infections of Ruminants*,
19 Z. Dinter, Morein, B., Ed, Elsevier Science, New York, NY, pp. 123–150.
- 20 Powers, J. G., VanMetre, D. C., Collins, J. K., Dinsmore, R. P., Carman, J., Patterson, G.,
21 Brahmhatt, D. and Callan, R. J. (2005). Evaluation of ovine herpesvirus type 2
22 infections, as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain
23 reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever.
24 *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **227**, 606-611.
- 25 Preliasco, M., Easton, M. C., Paullier, C., Rivero, R., Moraes, D. F. S. D., Godoy, I.,

- 1 Dutra, V. and Nakazato, L. (2013). Diagnóstico de febre catarral maligna em
2 bovinos do Uruguai. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **33**, 52-56.
- 3 Queiroz, G. R., Oliveira, R. A. M. d., Flaiban, K. K. M. C., Santis, G. W. D., Bracarense,
4 A. P. F. R. L., Headley, S. A., Alfieri, A. A. and Lisbôa, J. A. N. (2018).
5 Diagnóstico diferencial das doenças neurológicas dos bovinos no estado do
6 Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **38**, 1264-1277.
- 7 Rech, R. R., Schild, A. L., Driemeier, D., Garmatz, S. L., Oliveira, F. N., Riet-Correa, F.
8 and Barros, C. S. L. (2005). Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do
9 Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,
10 **25**, 97-105.
- 11 Reid, H. W., Buxton, D., Berrie, E., Pow, I. and Finlayson, J. (1984). Malignant catarrhal
12 fever. *Veterinary Record*, **114**, 581-583.
- 13 Rissi, D. R., Oliveira, F. N., Rech, R. R., Pierezan, F., Lemos, R. A. A. and Barros, C. S.
14 L. (2006). Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em
15 bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesquisa*
16 *Veterinária Brasileira*, **26**, 123-132.
- 17 Rosa, H. J. D. and Bryant, M. J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small*
18 *Ruminant Research*, **48**, 155-171.
- 19 Rossiter, P. B. (1981). Antibodies to malignant catarrhal fever virus in sheep sera. *Journal*
20 *of Comparative Pathology*, **91**, 303-311.
- 21 Russell, G. (2018). Malignant catarrhal fever. Manual of diagnostic tests and vaccines for
22 terrestrial animals 2018. , O.-W. O. A. Health, Ed, pp. 1-12.
- 23 Russell, G. C., Benavides, J., Grant, D., Todd, H., Deane, D., Percival, A., Thomson, J.,
24 Connelly, M. and Haig, D. M. (2012). Duration of protective immunity and
25 antibody responses in cattle immunised against alcelaphine herpesvirus-1-induced

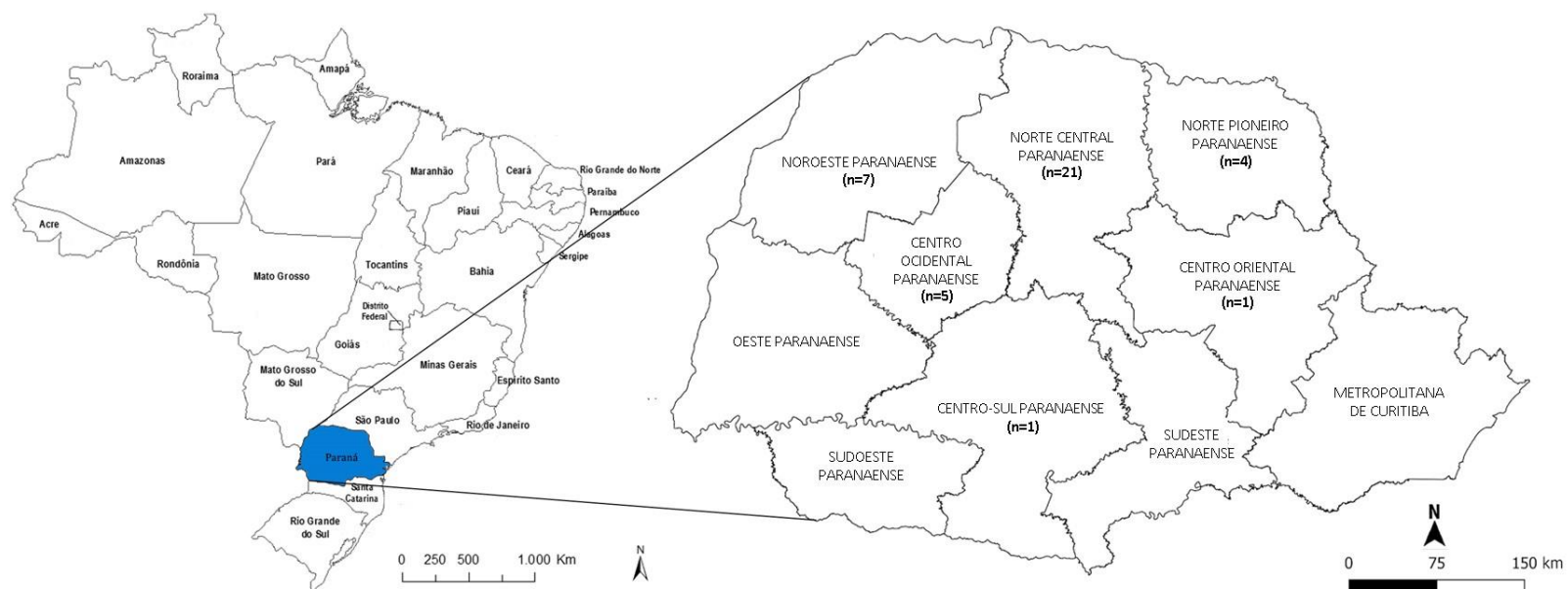
- 1 malignant catarrhal fever. *Veterinary Research*, **43**, 51.
- 2 Russell, G. C., Stewart, J. P. and Haig, D. M. (2009). Malignant catarrhal fever: a review.
3 *Veterinary Journal*, **179**, 324-335.
- 4 Schultheiss, P. C., Collins, J. K., Austgen, L. E. and DeMartini, J. C. (1998). Malignant
5 catarrhal fever in bison, acute and chronic cases. *Journal of Veterinary Diagnostic*
6 *Investigation*, **10**, 255-262.
- 7 Van Metre D, T. B., Whitlock RH (2008). Malignant catarrhal fever. In: *Diseases of dairy*
8 *cattle*, P. S. Divers TJ, Ed, Saunders Elsevier, St Louis, pp. 276–279
9
- 10 Yeşlbağ, K. (2007). Seroprevalence of malignant catarrhal fever-related
11 gammaherpesviruses in domestic ruminants in Turkey. *Tropical Animal Health*
12 *and Production*, **39**, 363-368.
- 13 Zemljič, T., Pot, S. A., Haessig, M. and Spiess, B. M. (2012). Clinical ocular findings in
14 cows with malignant catarrhal fever: ocular disease progression and outcome in
15 25 cases (2007-2010). *Veterinary ophthalmology*, **15**, 46-52.
16



17

18 Figura 1 – Distribuição por faixa etária dos bovinos infectados pelo VFCM (n=44).

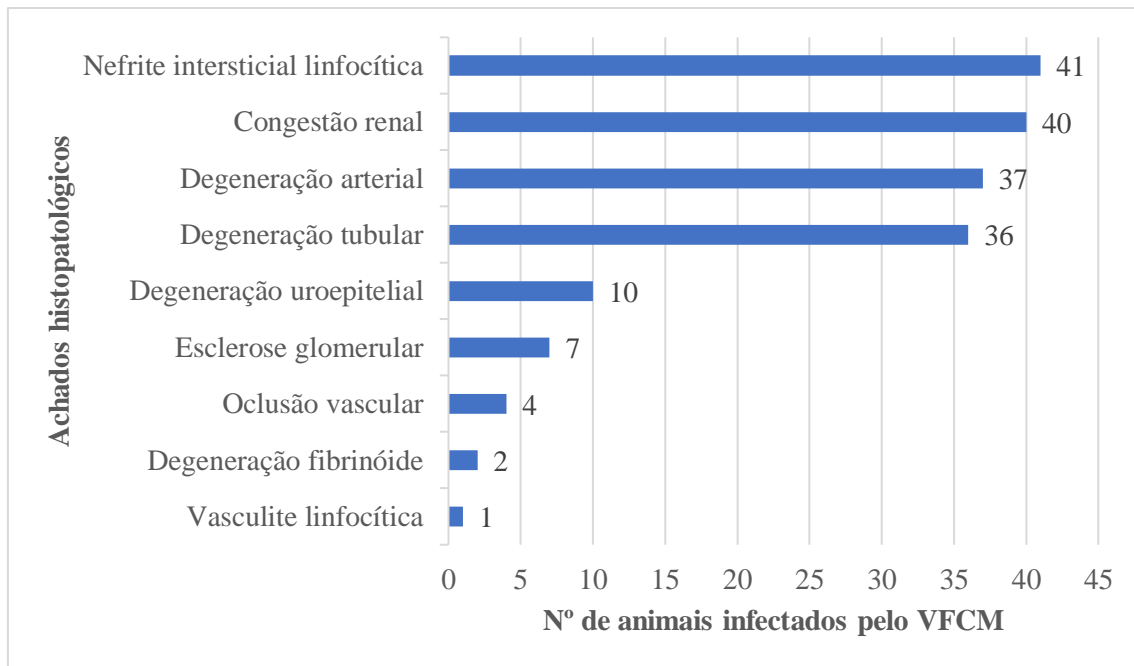
19



20

21 Figura 2 - Distribuição geográfica da ocorrência de bovinos infectados pelo VFCM nas mesorregiões do estado do Paraná (n=44)^a.

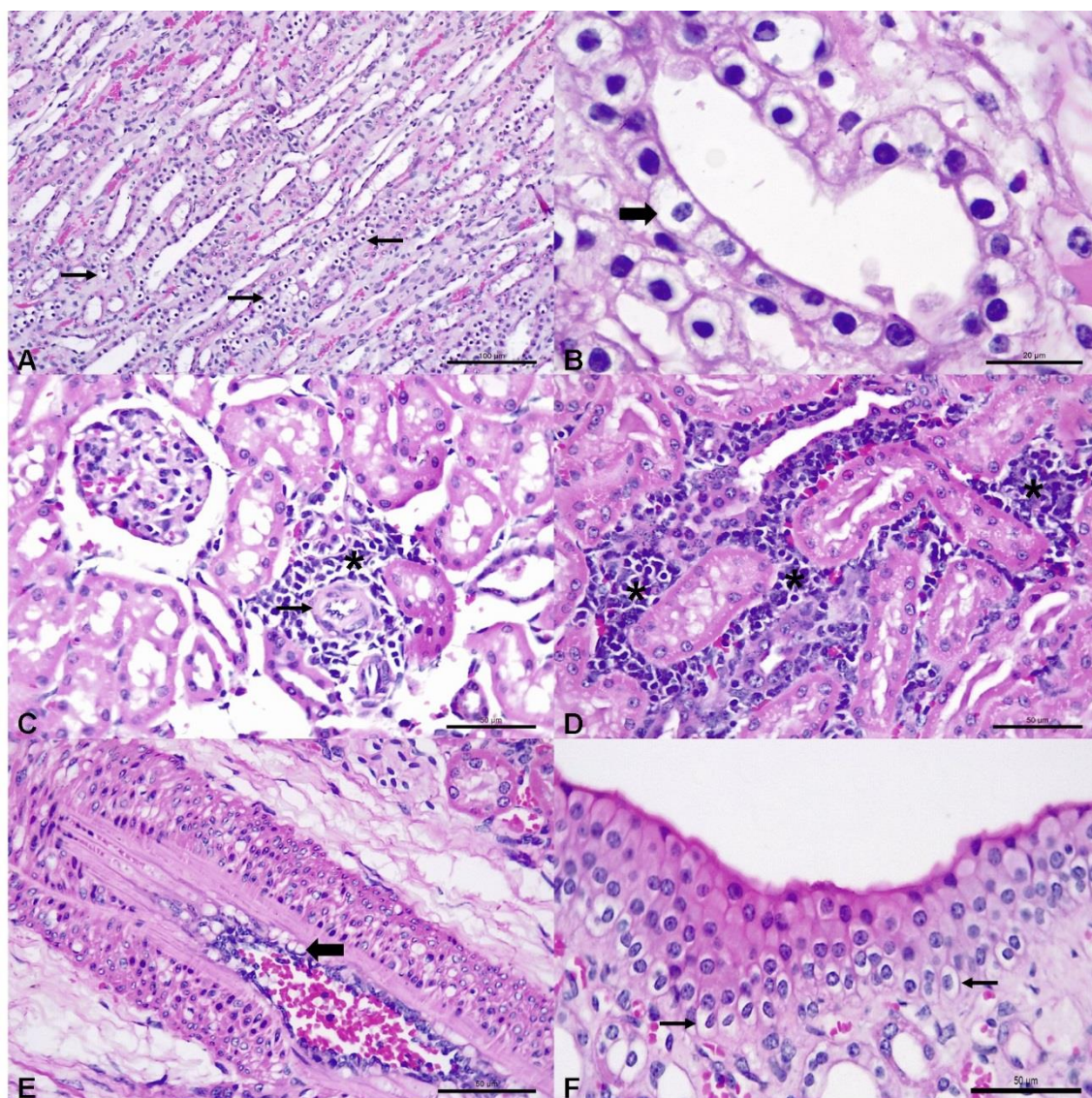
22 ^aA localização geográfica da origem de cinco bovinos infectados pelo VFCM não foi informada nos relatórios.



23

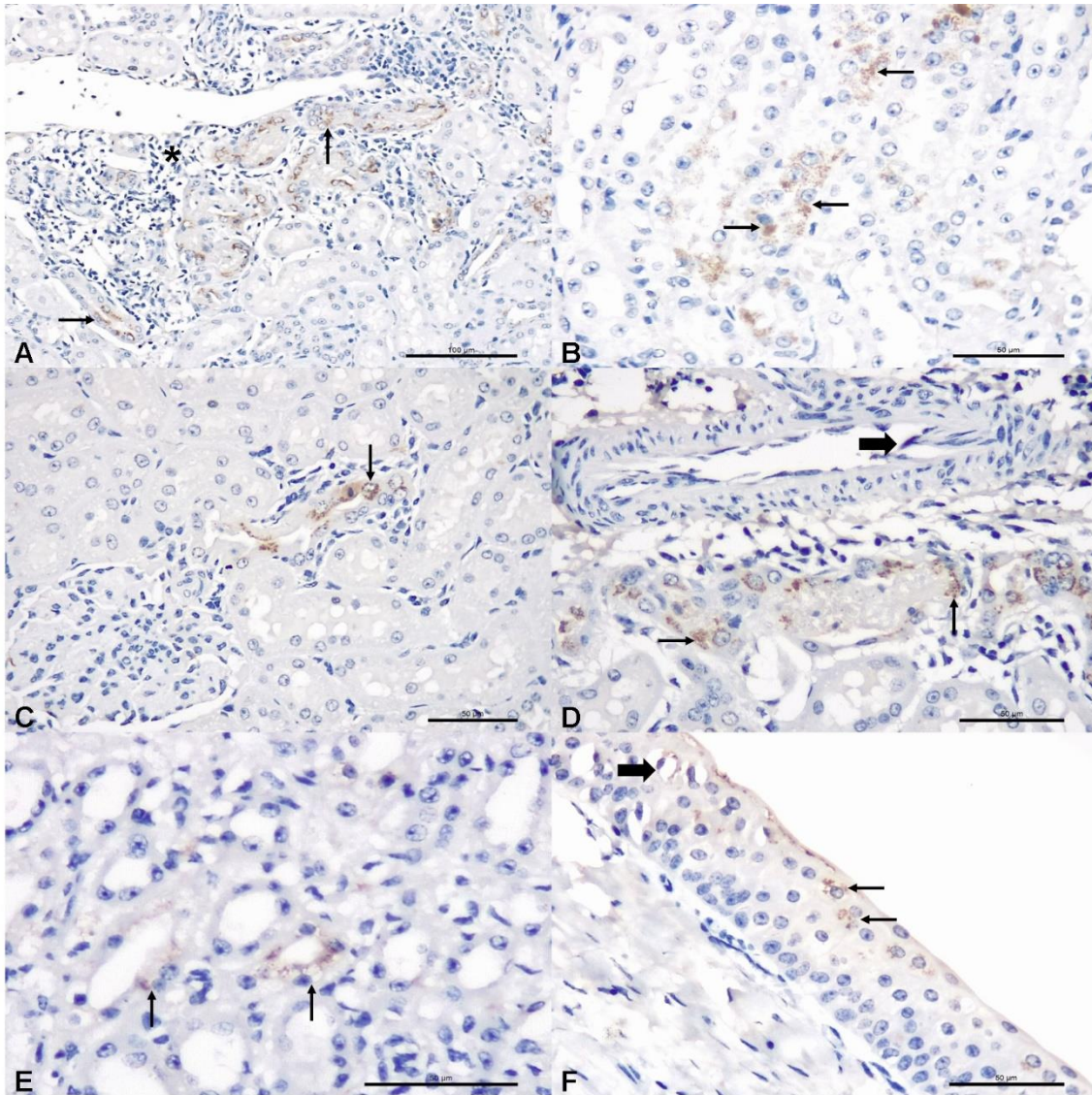
24 Figura 3 – Frequência dos achados histopatológicos observados nos rins de bovinos
25 infectados pelo VFCM (n=44) do estado do Paraná.

26



27

28 Figura 4 - Achados histopatológicos observados nos rins de bovinos infectados com o
 29 VFCM. A: Observaram-se túbulos e ductos com degeneração balonosa (setas) na camada
 30 medular renal; B: O maior aumento da imagem anterior demonstrando um túbulo renal
 31 com células epiteliais (seta) exibindo degeneração balonosa. C: Observa-se a nefrite
 32 linfocítica intersticial (asterisco) circundando uma arteríola (seta); D: Aumento maior
 33 demonstrando a nefrite intersticial linfocítica (asteriscos) ao redor de túbulos contorcidos;
 34 E: Artéria com endotélio exibindo degeneração (seta); F: Na papila renal, observa-se
 35 degeneração balonosa (setas) do uroepitélio ; Coloração de Hematoxilina e Eosina (A-F).
 36 Bar, A 100 µm; B 20 µm; C-F 50 µm.



37

38 Figura 5- Achados imuno-histoquímicos observados nos rins de bovinos infectados pelo
 39 VFCM. A: Observam-se focos de nefrite intersticial linfocítica (asterisco) circundando
 40 túbulos renais com imunorreatividade positiva (seta) ao VFCM; B: Observa-se
 41 degeneração balonosa nos túbulos renais imunomarcados (setas); C: Na camada cortical
 42 renal, nota-se imunorreatividade positiva nas células epiteliais (seta) de um túbulo renal;
 43 D: Demonstração de uma artéria apresentando proeminência focal do endotélio para o
 44 lúmen vascular (seta grossa) adjacente à células epiteliais tubulares renais com
 45 imunorreatividade positiva (seta fina) para o VFCM; E: Em maior aumento, observam-
 46 se túbulos renais com células epiteliais degeneradas exibindo imunorreatividade positiva
 47 (setas finas) para o VFCM.; F: Na papila renal, uroepitélio apresentando degeneração
 48 balonosa (seta grossa) e imunorreatividade positiva para o VFCM (setas finas);
 49 Imunoperoxidase contra corado com hematoxilina (A-F). Bar, A-B 100μm; C-F 50μm.

50 Tabela 1 - Dados epidemiológicos dos bovinos infectados pelo VFCM (n=44) do Estado do Paraná entre 2010 a 2019

Cidade de origem	Estação do ano	Sexo	Idade (anos)	Raça	Evolução clínica (dias)	Tipo de morte	Animais					
							Doentes	Mortos	Total ^e	Morbidade (%)	Mortalidade (%)	Letalidade (%)
Alto do Paraná	Outono	F	1,25	Nelore	4	S	3	3	N.I.	-	-	100
Amaporã	Outono	M	9 dias	Nelore ^{a,c}	8	S	2	2	700	0,3	0,3	100
Apucarana	Outono	F	4	Nelore	6	S	4	1	110	3,6	0,9	25
Arapongas	Inverno	F	6	Tabapuã	1	N	3	2	81	3,7	2,5	66,7
Araruna	Primavera	M	1,5	Nelore ^b	1	N	45	41	156	28,8	26,3	91,1
Assaí	Primavera	F	1	Angus ^a	30	S	5	3	120	4,2	2,5	60
Bandeirantes	Verão	M	1,25	Nelore	3	S	1	1	73	1,4	1,4	100
Bela Vista do Paraíso	Inverno	F	10 dias	Girolando	9	N	1	1	12	8,3	8,3	100
Bela Vista do Paraíso ^f	Primavera	F	40 dias	Girolando	15	N	2	1	N.I.	-	-	50
Cambé	Inverno	M	1	Red Angus	15	S	4	4	N.I.	-	-	100
Cambé	Outono	M	0,75	Mestiço ^{a,c}	10	N	3	3	17	17,6	17,6	100
Cruzeiro do Oeste ^g	Primavera	M	0,8	Nelore	1	S	1	1	120	0,8	0,8	100
Goioerê	Inverno	F	5	Nelore	15	S	11	11	263	4,2	4,2	100
Cornélio Procópio	Outono	F	5	Nelore	2	S	7	7	231	3	3	100
Floraí	Inverno	F	1,6	Mestiço ^b	20	S	3	2	29	10,3	6,9	66,7
Guarapuava	Primavera	M	1	Angus	5	S	4	3	63	6,3	4,8	75
Ibiporã	Primavera	M	1 dia	Senepol	1	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
Iguaraçu	Verão	F	3	Mestiço	4	N	3	3	20	15	15	100
Iretama	Outono	F	17 dias	Angus	17	S	1 ^d	1	60	-	1,7	-
Loanda	Outono	M	2	Nelore	2	N	4	4	300	1,3	1,3	100
Londrina	Inverno	F	6	Nelore	2	S	1	1	700	0,1	0,1	100
Londrina	Verão	F	4,5	Jersey	10	N	2	2	11	18,2	18,2	100
Londrina	Primavera	M	30 dias	Holandês	20	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
Londrina	Outono	F	4 dias	Brahaman	2	N	4	4	12	33,3	33,3	100
Londrina	Outono	F	3,5	Mestiço	2	N	1	1	4	25	25	100

Londrina	Outono	F	0,36	Senepol	5	S	1 ^d	1	N.I.	-	-	-
Londrina	Inverno	M	12 dias	Holandês	2	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
Londrina	Outono	M	1,6	Nelore	3	N	5	4	150	3,3	2,7	80
Marialva	Inverno	M	6	Gir	5	S	10	1	N.I.	-	-	10
Maringá	Primavera	M	1	Nelore	4	S	19	18	309	6,1	5,8	94,7
Moreira Sales	Inverno	F	8	Nelore	4	S	9	8	1500	0,6	0,5	88,9
Ortigueira	Outono	F	2	Nelore	15	S	2	2	152	1,3	1,3	100
Paranavaí	Inverno	F	8	Nelore	3	S	18	N.I.	200	9	-	-
Paranavaí	Inverno	M	0,75	Mestiço	1	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
Rolândia	Verão	M	8 dias	Holandês ^a	4	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
Rolândia	Outono	M	16 dias	Holandês ^a	10	S	N.I.	1	N.I.	-	-	-
Roncador	Inverno	F	6	Holandês ^b	5	S	4	4	35	11,4	11,4	100
São Jerônimo da Serra	Primavera	M	0,66	Nelore	3	S	19	19	30	63,3	63,3	100
Terra Rica	Primavera	M	1,25	Angus	1	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
N.I.	Inverno	M	7	Mestiço	N.I.	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
N.I.	Inverno	M	2 dias	Angus	N.I.	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
N.I.	Outono	M	3,3	Mestiço	N.I.	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
N.I.	Verão	N.I.	20 dias	Senepol	20	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
N.I.	Outono	N.I.	Adulto	Mestiço	N.I.	N	N.I.	1	N.I.	-	-	-
Total					-	-	202	171	5458	-	-	-
Mediana/Média					4	-	-	-	-	5,2	3,6	86,5

51 Nota: ^aOvinos, ^bEquinos, ^cSuíños em contato com bovinos na mesma propriedade rural; ^dVários animais doentes (quantidade indefinida); ^eNúmero total de
52 bovinos em risco; ^fCaso publicado em Microbial Pathogenseis. 2020; 149:104497.; ^gCaso publicado em J. Comp. Path. 2020; 174:86-98.; N.I., não informado;
53 M, macho; F, fêmea; S, sacrifício; N, natural.

- 1 Tabela 2 - Frequência das manifestações clínicas observadas em bovinos infectados com o
 2 VFCM (n=44) do estado do Paraná

Frequente	Razoavelmente frequente	Infrequente
Decúbito (n=24)	Diminuição tônus cauda (n=10)	Agressividade (n=5)
Apatia (n=15)	Anorexia (n=9)	Emagrecimento (n=5)
Depressão (n=15)	Tremores (n=9)	Nasceu fraco (n=5)
Paresia flácida (n=15)	Dispneia (n=7)	Abortos (n=4)
Incoordenação motora (n=14)	Desvio de cabeça (n=6)	Andar em círculos (n=4)
Diarreia (n=13)	Fezes ressecadas (n=6)	Língua flácida (n=4)
Febre (n=13)	Fraqueza muscular (n=6)	Midríase (n=3)
Atonia/hipomotilidade ruminal (n=12)	Lesões cutâneas (n=6)	Nistagmo (n=3)
Cegueira (n=11)	Secreção nasal (n=6)	Opistótono (n=3)
Enoftalmia (n=11)	Sialorreia (n=6)	Taquipneia (n=3)
	Hipotermia (n=6)	Vocalização (n=3)
		Aumento articular (n=2)
		Claudicação (n=2)
		Esclera hiperêmica (n=2)
		Movimentos de pedalagem (n=2)
		Opacidade de córnea (n=2)
		Timpanismo (n=2)
		Trismo mandibular (n=2)
		Urina escura (n=2)
		Estomatite (n=1)
		Hípópio (n=1)
		Odor fétido na boca (n=1)
		Prolapso retal (n=1)
		Tenesmo (n=1)
		Úlcera da córnea (n=1)

3

4

- 1 Tabela 3 - Frequência das alterações macroscópicas observadas em bovinos infectados pelo
 2 VFCM (n=44) do estado do Paraná

Frequente	Razoavelmente frequente	Infrequente
Enterite (n=19)	Pneumonia (n=7)	Infarto renal (n=4)
Abomasite/abomasite ulcerativa (n=14)	Congestão renal (n=6)	Hemorragia pulmonar (n=4)
Palidez musculatura (n=10)	Degeneração hepática (n=6)	Consolidação pulmonar (n=4)
Edema pulmonar (n=10)	Hemorragia cardíaca (n=6)	Fígado alaranjado (n=3)
Congestão encefálica (n=8)	Congestão hepática (n=5)	Hemorragia renal (n=3)
	Linfonomegalia (n=5)	Hiperplasia esplênica (n=3)
	Esplenomegalia (n=5)	Miocardite (n=3)
		Nefrite (n=3)
		Hemorragia encefálica (n=3)
		Úlcera ruminal (n=2)
		Edema barbela (n=2)
		Onfaloflebite (n=2)
		Encefalomalácia (n=2)
		Fígado friável (n=2)
		Estomatite (n=2)
		Linfadenite (n=2)
		Ruminite fúngica (n=2)
		Cistite hemorrágica (n=2)
		Edema epiglote (n=1)
		Uveíte (n=1)
		Rim edematoso (n=1)
		Poliartrite (n=1)
		Hepatomegalia (n=1)
		Fibrose hepática (n=1)
		Gangrena seca pele (n=1)
		Icterícia (n=1)
		Palidez visceral (n=1)
		Diminuição polpa branca baço (n=1)
		Endocardiose (n=1)
		Edema encefálico (n=1)
		Rinite hemorrágica (n=1)
		Hemorragia hepática (n=1)
		Necrose esofágica (n=1)
		Traqueíte fúngica (n=1)
		Serosite hemorrágica (n=1)

1 **8 CONCLUSÃO**

2 O Paraná apresentou taxa de infecção pelo VFCM maior em
3 comparação com a média de morbidade estimada no Brasil da FCM, mostrando que
4 o vírus é endêmico no estado.

5 O método imuno-histoquímico foi efetivo na identificação de antígenos
6 de VFCM em rins com alterações histológicas típicas de FCM.

7 Os bovinos provavelmente foram infectados pelo OvHV-2.

1 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 Os dados desse estudo demonstram que VFCM é endêmico em
3 algumas mesorregiões do estado do Paraná, principalmente, nos bezerros até 1 ano
4 de idade, sem predisposição racial e sexual.

5 Embora a FCM seja causada por diversos agentes do complexo de
6 VFCM, somente a ocorrência do OvHV-2 foi relatada até o momento no Brasil,
7 portanto, provavelmente os bovinos deste estudo estavam infectados pelo OvHV-2.

8 Os achados histopatológicos observados nesse estudo são típicos de
9 infecção por OvHV-2. Adicionalmente, as alterações degenerativas observadas nos
10 rins associadas à detecção intralesional de antígenos virais reforçam a participação
11 do sistema urinário na patogênese dessa doença.

12 A técnica de imuno-histoquímica foi efetiva na evidenciação de
13 antígenos do VFCM nos tecidos renais. Isso permitiu a identificação de um maior
14 número de bovinos infectados e ainda possibilitou associar lesões histológicas
15 observadas nos rins à infecção pelo VFCM. Demonstrando ser uma técnica de
16 diagnóstico *in situ* eficiente em estudos retrospectivos usando blocos de tecido
17 parafinados, sendo o rim um órgão útil no diagnóstico imuno-histoquímico da infecção
18 pelo VFCM.

19 A constatação de maior número de animais infectados pelo VFCM
20 corrobora que a infecção seja subdiagnosticada e subnotificada no Brasil. Entretanto,
21 mais estudos retrospectivos, utilizando métodos de diagnósticos mais específicos,
22 devem ser feitos nas demais regiões do Brasil para que a real prevalência da FCM
23 e/ou infecção pelo VFCM sejam conhecidas.

1 10 ANEXO I

2 Instrução para os autores da revista Journal of Comparative Pathology



JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.1
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0021-9975

DESCRIPTION

The *Journal of Comparative Pathology* is an International, English language, peer-reviewed journal which publishes full length articles, short papers and review articles of high scientific quality on all aspects of the **pathology** of the **diseases** of domesticated and other **vertebrate animals**.

Articles on human diseases are also included if they present features of special interest when viewed against the general background of **vertebrate pathology**.

AUDIENCE

Research Workers in Veterinary Pathology and all those interested in the pathology of diseases of domesticated and other vertebrate animals.

IMPACT FACTOR

2019: 0.994 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

S. Kennedy, Belfast, United Kingdom

Editorial Board

C. Benazzi, Bologna, Italy

R. J. Blundell, Liverpool, United Kingdom

M.P. Dagleish, Edinburgh, United Kingdom

R.W. Else, Edinburgh, United Kingdom

M.T. Fox, Hatfield, United Kingdom

R.P. Kitching, Abbotsford, BC, Canada

K. Osterrieder, Berlin, Germany

1

V. Perez, Leon, Spain
K.C. Smith, Hertfordshire, United Kingdom
D. Werling, Hertfordshire, United Kingdom
J.A. Wright, Hertfordshire, United Kingdom

Editorial Advisers

C. Acin, Zaragoza, Spain
J. Baily, Stirling, United Kingdom
W. Baumgärtner, Hannover, Germany
J. Benavides, Leon, Spain
D. Buxton, Borthwick, United Kingdom
P. J. Canfield, Sydney, NSW, Australia
C. Cantile, Pisa, Italy
J.P. Cassidy, Dublin, Ireland
J. Del-Pozo, Edinburgh, United Kingdom
K. Dittmer, Wellington, New Zealand
J. Dykstra, Saint Paul, Minnesota, United States
G. Foster, Inverness, United Kingdom
M. Garcia Hartmann, Mougins, France
L. González, Huesca, Spain
L. Good, London, United Kingdom
R. Klopfeisch, Berlin, Germany
R. Kock, Hertfordshire, United Kingdom
G.D. Kommers, SANTA MARIA, Brazil
M. Krockenberger, Sydney, New South Wales, Australia
T. Kuiken, Rotterdam, Netherlands
R. Lindberg, Uppsala, Sweden
A. Malbon, Midlothian, United Kingdom
J. Mansell, College Station, TX, United States
M. Marcondes, Presidente Prudente, Brazil
E. McInnes, Warfield, United Kingdom
H. Nakayama, Tokyo, Japan
M.G. O'Sullivan, Minneapolis, MN, United States
G.R. Pearson, Bristol, United Kingdom
A. Pospischil, Zurich, Switzerland
S.L. Priestnall, Hatfield, United Kingdom
A.N. Rycroft, Hatfield, United Kingdom
C. Scudamore, North Mymms, United Kingdom
B.J. Sheahan, Dublin, Ireland
A. Sukura, Helsinki, Finland
B. Ytrehus, Uppsala, Sweden

2

GUIDE FOR AUTHORS

Notes for Contributors

Scope

The *Journal of Comparative Pathology* exists to publish articles recording research and original scientific findings relevant to the diseases of domesticated and other vertebrate animals. Articles on diseases of man are also appropriate if they present features of special interest when viewed against the general background of vertebrate pathology.

In addition, the Journal may publish Short Papers. These are intended to include reports of small completed investigations, new techniques or case descriptions. They should not have the subdivisions of a full length paper, but should include a brief summary and essential references. They would normally not exceed a word limit of 2000 and should include no more than four supportive figures (as individual images not composites of multiple images) or tables. Such submissions should be clearly marked 'Short Paper'. Single case reports will be accepted only if they make a significant contribution to knowledge.

The Journal publishes Review Articles on topics of broad interest from invited authors with acknowledged expertise in their field. Unsolicited Review Articles will be considered, but authors intending to prepare a review should first contact the Editor-in-Chief to discuss their proposal for a review article.

The Journal will publish Mini Reviews on topical subjects that fall within the overall scope of the Journal. A Mini Review will summarize in succinct fashion the key points related to (for example) the pathogenesis and pathology of a disease process and provide a cutting edge overview of current research and future research directions related to that disease or subject area. Mini Reviews will normally be commissioned by the Editor of the Journal, but unsolicited contributions will be considered and subjected to the normal peer review process.

- A Mini Review will be restricted to a 1,750 to 2,000 word limit (not including summary and references) and key points may be made by the use of bullet points.
- A Mini Review will be supported by no more than 10 key current references. References need not be cited within the text in standard Journal format, but can appear as a list of Key References.
- A Mini Review should be supported by between four to six photographic images (e.g. of gross or microscopical pathology or diagrammatic summaries of key disease mechanisms).
- A Mini Review must have a standard Summary (abstract) with four suggested key words.
- A Mini Review should follow the general Journal format for title, authors and affiliations, reference and citation style, acknowledgments and Conflict of Interest Statement as detailed within the Notes for Contributors.

The Journal of Comparative Pathology offers an online platform for the journal's international community of readers, authors, editors and editorial advisers to comment on topical issues related to veterinary pathology.

Submissions to 'Pathology Matters' should comprise substantive, concise and focussed commentary that is clear, compelling and attractive to our international readership of scientists in the veterinary and wider life science disciplines.

Contributions that are well argued and clearly written within the 600-word limit, are more likely to be accepted.

Comment pieces should have a concise and appealing title. Up to five references, preferably as hyperlinks within the text, can be included if necessary. If urls cannot be provided for references, they can be typed at the end of the piece in the format of the Journal of Comparative Pathology. Authors

1

should provide a one- or two-sentence biography at the end of the piece to identify themselves. A recent high quality portrait photograph of the lead author may also be submitted to accompany the article, as well as their Twitter handle if desired.

Comment pieces will not be subject to peer review but will be published, edited or rejected at the discretion of the Editor. It is a condition of submission that authors accept that contributions to Pathology Matters can be edited and published online without the approval of the author.

Please read the journal's policy on competing interests and add the appropriate statement from this document to your article.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Animal Experimentation

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm. Such studies must meet Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (https://www.elsevier.com/___data/promis_misc/ARRIVE.pdf). Unnecessary suffering in animal experimentation is not acceptable to the Editors of the *Journal of Comparative Pathology*. Authors must indicate the nature of ethical approval for a study in the appropriate section of the Materials and Methods of a manuscript.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Conditions of Acceptance

The Editorial Board accepts papers on the understanding that they have not been published elsewhere and, if accepted, will not be reprinted in whole or in part without the Board's written approval. The Board reserves the right to reject, on scientific, ethical or other grounds, any manuscript submitted to it. Each person named in the list of authors of a paper must have made a substantial scientific or critical contribution to the work described and have read and approved the version submitted to the Journal.

Papers will be published with the minimum of delay, bearing the dates of receipt and acceptance. The period between receipt of an article and publication depends on the amount of editorial work and correspondence required and the number of articles already awaiting publication. Exceptionally, the Editor may use discretion in determining whether a degree of accelerated publication could be offered.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek

2

3

1

gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access (OA)

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [access programs](#)
- No open access publication fee

2

3

4

1

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <https://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

Language services

The *Journal of Comparative Pathology* is published in British and not American English. Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <https://service.elsevier.com> for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/YJCPA/default.aspx>.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Format of Articles

Articles must be concise and unnecessary duplication of data in text, tables and graphs should be avoided. Allusions to published work must be brief and limited to what is necessary to evaluate the findings in the manuscript. Extensive reviews of the literature will not be permitted, except in Review Articles.

To avoid repetition, if a related article by the same authors, or some of them, is being offered to a different journal, a copy of that article must be provided, in confidence, for comparison.

Before submitting manuscripts authors are recommended to consult recent issues of the Journal to see the form in which the articles appear.

2

3

1

Manuscripts should be word processed. Times New Roman font at 12 pitch should be used, with generous margins and full double spacing throughout. Each line should be numbered by using the line numbering facility within the word processing package.

Papers should normally comprise:

1. A Summary of the findings presented in the paper and the conclusions drawn from them. Authors may, if they wish, suggest not more than four Keywords that should follow the summary.
2. A brief Introduction stating the purpose of the paper.
3. A concise account of the Materials and Methods used. Authors should note that appropriate positive and negative controls should be performed for all experimental techniques and the nature of these controls should be described with the methodology.
4. A record of the Results. Systeme Internationale (S.I.) units should be used.
5. A Discussion of the significance of the results.
6. Any necessary Acknowledgments for assistance. All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance. Finally, the acknowledgments section should include a declaration concerning Funding and any Role of the Funding Source. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.
7. A Conflict of Interest statement. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Reference Style

References to published work cited in the text, in alphabetical order. The form should be:

Durand S, Murphy C, Zhang Z, Alexandersen S (2008) Epithelial distribution and replication of foot-and-mouth disease virus RNA in infected pigs. *Journal of Comparative Pathology*, **139**, 86-96.

Where a reference has more than five authors, please give the first five authors followed by et al.

Beuermann C, Beck J, Schmelz U, Dunkelberg H, Schütz E et al. (2009) Tissue calcium content in piglets with inguinal or scrotal hernias or cryptorchidism. *Journal of Comparative Pathology*, **140**, 182-186.

In the text, references to publications by three or more authors should be given in the style "Jones et al." on each occasion.

Titles of books must be given in full with publisher, place of publication and edition if other than first, e.g. Dellman HD (1998) Endocrine system. In: *Textbook of Veterinary Histology*, 5th Edit., HD Dellman, J Eurell, Eds., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 287-302.

PhD theses should be cited as: Allenspach K (2002) *Chronic Enteropathies in Dogs - Research into the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. PhD Thesis, University of Berne.

Graphical Abstracts

The Journal will publish a 'graphical abstract' in the on-line version of the Table of Contents for each issue of the Journal. Graphical abstracts comprise a single image (that may or may not be one of the figures in a paper) that encapsulates the subject of the paper. The image may be accompanied by a single sentence of text (of no more than 50 words) that describes the key message of the paper. Graphical abstracts will not be published in the print or on-line versions of the actual paper.

2

3

4

1

Graphical abstracts are optional, but where authors would like to include such an abstract the image and proposed sentence must be submitted with a revised manuscript. The sentence may be modified by the Editor-in-Chief.

Tabulated Material

Tables require captions and should be self-explanatory. Each column should have a heading that accurately describes all entries beneath. Tables should be submitted on separate sheets and designed to fit into the type area of one printed page or less. Authors should consult a recent copy of the Journal and follow as closely as possible the format of tables therein.

Illustrative Material

All illustrative material must be of high quality. Text figures (i.e., diagrams, charts, graphs), should bear lettering, numbers and symbols large enough to be legible after sizing to the journal pages. The figures will be inserted in the text at appropriate places. Authors may wish to have several illustrations grouped into a composite plate. If so, they should submit a sketch plan of the suggested layout but not electronically group the photographs as this work will be undertaken by the Publisher. Such composite blocks should be of the same proportions as the page of the Journal. Where the author wishes to draw attention to particular features by means of arrows or lettering, these should be superimposed electronically on the photographs. **No charge will be made for a reasonable number of figures or for the use of colour for photographic illustrations if, in the Editor's opinion, it enhances the presentation of results.** The maximum page area available for blocks is 23 x 16.9 cm. Figures designed to span one or both columns on a page should be 8.2 cm or 16.9cm wide, respectively.

Legends to all illustrations submitted should be shown separately and, where appropriate, should state the stain and magnification. The latter should be given in the form of a magnification bar inserted directly onto the image.

The following formats can be used to submit figures electronically: EPS; TIFF (minimum resolution of 300 dpi for colour and halftones, 1000 dpi for bitmapped line drawings and 500 dpi for combination halftone/line drawing); DOC/XLS/PPT (if figures are created in any Microsoft Office application please supply "as is"). For a detailed guide on electronic artwork please visit our website <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Use of Copyright Material

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via <https://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Essential Title Page Information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a superscript symbol immediately after the author's name and in front of the appropriate address. The hierarchy of symbols used by this Journal may be seen by consulting a recent issue. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, the current affiliation of that author may be indicated in the Acknowledgments section of the manuscript.

2

3

4

1

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

2

9

3

4

1

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher on initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to [download the free Adobe Reader](#), version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the [Adobe site](#).

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

2

10

3

4

Author's Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

1 11 ANEXO II

2 1. Protocolo da Técnica de Imuno-histoquímica para o VFCM

REAGENTE/SOLUÇÃO	EQUIPAMENTO	T°C	TEMPO
1.Desparafinização			
	Estufa	60°C	10 horas
Xilol I	Berço IHQ		20 min
Xilol II			20 min
2.Reidratação			
Álcool 100% I			10 min
Álcool 100% II			10 min
Álcool 90%			5 min
Álcool 80%			5 min
Ligar a panela de pressão			
Álcool 70%			5 min
Lavar em água corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho /transporte		
3.Recuperação Antigênica			
Citrato pH 6,0	Panela de pressão	86°C	10 min
Perda da pressão da panela			20 min
Retirar da panela com auxílio de luva de cozinha			
Estabilização da T°C do material em T°C ambiente			20 min
Lavar em água corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho /transporte		
4.Bloqueio da peroxidase endógena			
Peróxido de hidrogênio 6% (100ml) + Água destilada (50 ml)		T°C ambiente	30 min
Trabalhar em cuba (solução total 150 ml) e berço de vidro. Proteger da luz.			
Descartar solução			
Lavar em água corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho /transporte		
5.Incubação com Anticorpo Primário			
Secar ao redor dos cortes com papel toalha			
Anticorpo primário diluído em diluente (1:400)	Câmara úmida	4°C	20 a 24 horas
6.Após a incubação			
Lavar em PBS			
PBS pH 7,2			5 min
PBS pH 7,2			5 min
7.Incubação com anticorpo secundário (superpicture kit polímero - Ivitrogen)			
Secar ao redor dos cortes com papel toalha			
Anticorpo secundário	Câmara úmida	T°C ambiente	30 min
PBS pH 7,2			5 min
PBS pH 7,2			5 min
8.Solução Cromógena			
Secar ao redor dos cortes com papel toalha			
DAB (Ivitrogen – 1 gota de cada frasco em 1 ml de água destilada)	Capela ligada	T°C ambiente	3 min

Parar a reação em água corrente	Berço do HE	T°C	-
Descartar o DAB em local adequado			
Lavar em água corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho /transporte		

9. Coloração e desidratação

Hematoxilina de Harris			30 seg a 1 min
Descartar água no descarte de corante e trocar para o berço de IHQ			
Lavar em água corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho /transporte		
Álcool 70%			5 min
Álcool 80%			5 min
Álcool 90%			5 min
Álcool 100% I			10 min
Álcool 100% II			10 min
Deixar secar as lâminas com a capela ligada			
Xilol I			20 min
Xilol II			20 min
Montar as lâminas com lamínula adequada			

1

2

3 2. Soluções

Tampão Fosfato Salino (PBS) pH 7,2	
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	3,96 gramas
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,72 gramas
NaCl	16,34 gramas
Água destilada	2000 ml
Ajustar o pH para 7,20 -7,24	

Citrato pH 6,0	
Ácido cítrico	2,1 gramas
Água destilada	1000 ml
Ajustar o pH para 6,0	

Solução de revelação – DAB	
Água destilada (frasco <i>ependorf</i>)	1 ml
Solução 1	1 gota
Solução 2	1 gota
Solução 3	1 gota
Homogeneizar	

4