



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO AZAMBUJA MACHADO DE OLIVEIRA

**PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES LATENTES POR BoHV-1
E BoHV-5 EM BOVINOS DE CORTE NO ESTADO DO
PARANÁ**

RODRIGO AZAMBUJA MACHADO DE OLIVEIRA

**PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES LATENTES POR BoHV-1
E BoHV-5 EM BOVINOS DE CORTE NO ESTADO DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor
Lisbôa

Coorientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48p	Oliveira, Rodrigo Azambuja Machado de
	Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no estado do Paraná/ Rodrigo Azambuja Machado de Oliveira. - Londrina, 2013. 76f. : il.
	Orientador: Júlio Augusto Naylor Lisboa. Co-orientador: Amauri Alcindo Alfieri. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013. Inclui bibliografia.
	1. Bovino de corte – Doenças - Paraná - Teses. 2. Bovino - Vírus - Teses. 3. Vírus do herpes em animais - Teses. 4. Encefalopatia em bovino - Teses. 5. Neurologia veterinária – Teses. 6. Epidemiologia veterinária - Teses. I. Lisboa, Júlio Augusto Naylor. II. Alfieri, Amauri Alcindo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.
	CDU 619:636.2(816.2)

RODRIGO AZAMBUJA MACHADO DE OLIVEIRA

**PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES LATENTES POR BoHV-1 E BoHV-5
EM BOVINOS DE CORTE NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada a Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa
UEL – Londrina – PR

Prof. Dra. Alice Fernandes Alfieri
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha
UFG – Samambaia - GO

Londrina, 19 de abril de 2013..

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa e coorientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT; Projeto "Diagnóstico Diferencial das Encefalopatias dos Bovinos no estado do Paraná", edital CNPq/MAPA/SDA processo nº578645/2008-4.

Às jóias mais preciosas que esta vida me proporcionou, pelo amor e carinho incondicionais em toda minha trajetória: minha maravilhosa mãe, Ana Margarth Azambuja de Oliveira, meu amado pai, Jorge Luiz Machado de Oliveira (in memorian) e minha querida irmã caçula, Karen ("Kareka") Machado de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, pelas liberdades e vantagens de viver uma *vida humana preciosa*, ao reconhecer e agradecer todos os dias de minha vida, por ser filho de seres tão extraordinários que me fizeram perceber que a vida é repleta de sentimentos bons, como o amor, a felicidade, a compaixão e a equanimidade; por ter nascido com saúde e com a integridade de minhas faculdades mentais; por ter uma família maravilhosa; por crescer em um lugar onde o conhecimento e a informação estavam facilmente disponíveis; pela dádiva de viver juntamente com pessoas que me ensinaram o real significado de amizade; por ter conhecido grandes mestres ao longo de minha vida, sempre me conduzindo pelo caminho do bem e finalmente, pelo magnífico fato de viver!

Aos meus pais, Ana Margareth Azambuja de Oliveira e Jorge Luiz Machado de Oliveira (*in memoriam*), meus mais sinceros agradecimentos e votos de amor eterno. À minha mãe, por todo o amor incondicional em proporcionar os melhores meios para o meu crescimento, me apoiando em todos os projetos de vida. Por ser essa pessoa maravilhosa que esteve sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis de minha vida, me ensinando a ser forte e acreditar que todos os nossos sonhos podem se tornar a mais bela realidade. Ao meu pai, por todos os momentos felizes que passamos juntos. Pelas lembranças maravilhosas que levarei até o último dia de minha vida. Obrigado por ter sido um pai atencioso, companheiro, que nunca mediu esforços para que eu e minha irmã nos tornássemos pessoas do bem. Por toda a sua dedicação incondicional e por todo o amor prestados a nossa família. Meu herói!

À minha querida irmã, Karen "Kareka", por toda a companhia, amizade e todos os momentos maravilhosos que passamos, e que ainda vamos passar, juntos. Obrigado por existir em minha vida. Sem você, não teria graça alguma. Sempre te amei e sempre vou te amar!

À toda a minha família, em especial as minhas avós Maria e Catarina, por todos os momentos felizes, pelas agradáveis conversas, pelo amor incondicional e por todo o carinho que sinto pelas duas. Mesmo longe, cultivo em meu coração todos os sentimentos bons que nos unem.

À minha namorada, Ana Paula da Silva, por ser essa pessoa tão magnífica, sempre me apoiando em meus desafios pessoais. Por ser essa mulher dedicada, esforçada, que jamais desiste de seus sonhos. Obrigado por todo o amor e por existir em minha vida!

À todos os meus amigos, sempre presentes durante toda a minha vida. Ao amigo e irmão de infância, Luis Rodrigo Tranquoso e sua esposa, Aliana, pela amizade verdadeira.

Aos meus amigos César e Robson, pelo companheirismo. Aos amigos de graduação, em especial Cássia, Juliana, Eduardo, Felipe, Carlos, Fernando, Nilson, Diego, Selene, Thais, Renata, Daia, Ana Júlia e Tiago. Aos amigos da residência, Josiane, Ricardo, "Loro", Flávio e Marquinhos pela agradável convivência. Aos amigos, Priscila Fajardo, Fernanda Mobaid, Gustavo Rodrigues, Cristiane Abade, Naiara Rodrigues, Igor, Alfredo, Raquel e Daniele, pessoas maravilhosas que sempre estiveram dispostas a me ajudar e que por isso estão eternizados em minha memória.

Ao meu orientador, professor Júlio Augusto Naylor Lisboa, por todo o carinho e confiança prestados ao longo desses dois anos de convivência. Agradeço imensamente por sempre acreditar em mim, sempre disposto a me ajudar, profissional e pessoalmente. Por possibilitar que mais um sonho se realizasse em minha vida e por ser essa pessoa que tanto admiro.

Aos professores do laboratório de Anatomia Patológica: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, pelo exemplo de profissionalismo, pela disposição em me ensinar, pela amizade construída e pelas risadas (principalmente pela história do SAFRA!); Giovana Wingeter de Santis, pela amizade e carinho prestados, assim como por todos os conselhos; Antônio Carlos Faria dos Reis, pela ajuda incondicional e carinho. À vocês, meu muito obrigado!

Aos professores do laboratório de Virologia Animal, Amauri Alcindo Alfieri, pelo exemplo de profissional, por ter aceitado a difícil missão de ser meu coorientador, confiando a mim a tarefa de trabalhar com os Herpesvírus, e Alice Fernandes Alfieri, por aceitar o convite de ser membro da banca examinadora de conclusão de minha dissertação.

À todos os membros da Anatomia Patológica: residentes Elisângela e Renata, por toda a ajuda prestada e pela amizade e carinho adquiridos. Aos funcionários Zé e Cláudia, pelo companheirismo, ajuda e pelas risadas. Aos pós graduandos Rogério e Karina, pela amizade e carinho. Obrigado por praticarem o "colegolismo"!!

Aos membros da Virologia Animal: residentes Victor, Ana Paula da Silva, Wagner e Vilma, por sempre me ajudarem em todas as etapas laboratoriais, pela amizade e carinho prestados. Aos companheiros e amigos, Dani, Flávia, Bruna, Bucha, Juliane, Raquel, Tonel, Elis e Juliana pela companhia diária, pelas risadas e principalmente pelo "colegolismo"!!

Às alunas de iniciação científica, Juliana Massitel e Jamile Wesgueber, pela companhia, amizade e por toda a ajuda prestadas.

À "Tia" Nilda e filhas, Josani e Luciani, por toda a ajuda prestada durante minha estadia em Londrina. Por serem pessoas tão maravilhosas e acolhedoras, sempre dispostas a me ajudar, de uma forma incondicional e carinhosa. Serei eternamente grato por tudo o que

fizeram por mim!

Ao grupo de estudos budista - GEB - Londrina, em especial Roberta e Marcelo, por todo o carinho e amizade construídos e sedimentados pelas práticas espirituais.

À todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para que mais esse sonho se tornasse realidade.

À todos os animais, em especial aos bovinos, por serem o elemento essencial de minha incansável jornada em busca do conhecimento e sabedoria, afim de aplica-los para o bem maior de todos os seres.

OLIVEIRA, R. A. M. **Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no estado do Paraná.** 2013. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

As encefalopatias em bovinos representam um grupo de enfermidades importantes, geralmente fatais, que determinam grandes perdas econômicas no Brasil e no Mundo. O herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) é um dos principais agentes causadores de encefalite no país e o 1 (BoHV-1) pode, eventualmente, provocar a doença. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência das infecções latentes por esses dois vírus em bovinos de corte criados no estado do Paraná. Os gânglios do nervo trigêmeo foram coletados de 400 bovinos hígidos, entre 18 e 36 meses de idade, provenientes de 90 propriedades rurais localizadas em diferentes mesorregiões geográficas do estado e abatidos em frigorífico com Serviço de Inspeção Federal (SIF). A detecção do ácido nucléico (DNA) viral foi realizada por meio da reação em cadeia pela polimerase com amplificação do gene que codifica a glicoproteína C. Cento e nove bovinos eram herpéticos (27,25%), sendo 14,25% (57/400) infectados somente com BoHV-1, 9,75% (39/400) infectados somente com BoHV-5 e 3,25% (13/400) portadores de infecção mista. A mesorregião Noroeste apresentou os maiores índices de prevalência para BoHV-5 (41,3%), seguida pela Norte Central (8,3%), Sudoeste (5,7%), Centro Oriental (3,4%) e Norte Pioneiro (2,2%). A frequência de infecção por BoHV-1 foi maior na mesorregião Norte Central (36,6%), seguida pela Noroeste (25,9%), Oeste (20%), Sudoeste (11,4%), Norte Pioneiro (11,1%), Centro Ocidental (7,4%) e Centro Oriental (6,9%). Nas mesorregiões de Curitiba, Sudeste e Centro Sul não foram detectados bovinos com infecção latente. Os dois herpesvírus circulam em rebanhos bovinos no estado do Paraná, determinando infecção latente, com distribuição geográfica heterogênea. São mais prevalentes ao norte do estado, onde se concentra a maior população de bovinos de corte, e estão quase ausentes nas mesorregiões que constituem a fronteira sul. A situação epidemiológica é mais crítica na mesorregião Noroeste e a vigilância para a meningoencefalite herpética deve ser intensificada nessa região.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino. Diagnóstico. Epidemiologia. Doenças neurológicas.

OLIVEIRA, R.A.M. **Prevalence of latent infection with BoHV-1 and BoHV-5 in beef cattle of Parana, Brazil.** 2013. 76p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Encephalopathy is an important group of diseases in cattle, often fatal, causing great economic losses in Brazil and worldwide. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) is an important causative agent of encephalitis in the country and 1 (BoHV-1) may eventually cause this disease. The aim of this study was to determine the prevalence of latent infection by these two viruses in beef cattle raised in the state of Paraná, Brazil. The trigeminal ganglia were collected, in a slaughterhouse with Federal Inspection Service (SIF), from 400 healthy cattle, between 18 and 36 months, raised in 90 farms located in different geographical regions of the state. The detection of nucleic acid (DNA) of each of viral agents was performed by polymerase chain reaction amplification of the gene encoding the glycoprotein C. One hundred nine (27.25%) animals were herpetic; 14.25% (57/400) were infected only with BoHV-1, 9,75% (39/400) were infected only with BoHV-5 and 3.25% (13/400) had mixed infection. The Northwest region had the highest prevalence rate for BoHV-5 (41.3%), followed by North Central (8.3%), South West (5.7%), Middle East (3.4%) and Northern Pioneer (2.2%). The frequency of infection with BoHV-1 was higher in North Central region (36.6%), followed by North West (25.9%), West (20%), Southwest (11.4%), Northern Pioneer (11.1%), Central West (7.4%) and Middle East (6.9%). Infections with herpesvirus were not detected latently infected cattle in the regions of Curitiba, Southeast and South Central. The two herpesvirus circulating in cattle herds in the state of Paraná, determining latent infection with heterogeneous geographical distribution. The BoHV-1 and BoHV-5 infections are more prevalent in the north of the state, where there is the largest beef cattle population, and are almost absent in the regions forming the southern border. The epidemiological situation is critical in the Northwest region, and surveillance for herpetic meningoencephalitis should be intensified in this region.

Keywords: Bovine herpesvirus. Diagnosis. Epidemiology. Neurological diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** – Morfologia do herpesvírus bovino 5 observada em microscopia eletrônica. O diâmetro do vírus é de cerca de 260 nm. A linha preta compreende 100 nm. Fonte: DEL MÉDICO ZAJAC et al., 201016

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1** – Prevalência dos herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e do 5 (BoHV-5) nas diferentes mesorregiões do Estado do Paraná. Fonte: BRASIL, 2009.....55

LISTA DE QUADROS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Quadro 1** – Distribuição da população de bovinos de corte nas diferentes mesorregiões do estado do Paraná e o número de amostras colhidas por mesorregião49
- Quadro 2** – Número total de bovinos e de propriedades amostradas por municípios nas diferentes mesorregiões do estado do Paraná50
- Quadro 3** – Infecções latentes, simples e mistas, por BoHV-1 e BoHV-5 confirmadas nos gânglios do nervo trigêmeo de bovinos de corte sadios (n=400) criados e abatidos no estado do Paraná.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BoHV-1	Herpesvírus bovino 1
BoHV-5	Herpesvírus bovino 5
GNT	Gânglio do nervo trigêmeo
HSV	Hespervírus Simplex
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBP	Balanopostite Pustular Infecciosa
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos
IPV	Vulvovaginite Pustular Infecciosa
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MENS	Meningoencefalite não supurativa
PCR	Reação da polimerase em cadeia.
PRV	Vírus da Pseudo Raiva
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SNC	Sistema Nervoso Central
VN	Vírusneutralização

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 ETIOLOGIA	16
2.2 EPIDEMIOLOGIA	18
2.3 PATOGENIA	21
2.4 SINAIS CLÍNICOS.....	22
2.5 LATÊNCIA.....	25
2.6 DIAGNÓSTICO.....	27
2.7 TÉCNICAS LABORATORIAIS	30
2.8 PREVENÇÃO.....	31
2.9 REFERÊNCIAS	33
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	45
4.1 INTRODUÇÃO.....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.3 RESULTADOS	54
4.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	56
4.5 REFERÊNCIAS	62
CONCLUSÕES	68
APÊNDICES	69
APÊNDICE A – Lista de reagentes	70
APÊNDICE B – Soluções e tampões	71
APÊNDICE C – Protocolo de técnicas.....	73
APÊNDICE D – Lista de figuras.....	75

1 INTRODUÇÃO

As doenças neurológicas têm grande prevalência em rebanhos bovinos, de corte ou leite, criados de forma extensiva ou intensiva, determinando prejuízos econômicos consideráveis, visto que, quase sempre, provocam a morte dos animais acometidos e, muitas vezes, ocorrem sob a forma de surtos. Devem ser consideradas como um conjunto de enfermidades porque se manifestam por distúrbios neurológicos comuns, variáveis e inespecíficos. Assim, confundem-se entre si, o que torna o diagnóstico diferencial uma necessidade e um desafio (MAYHEW, 1989).

Dentre as causas de encefalopatia, as inflamatórias ocupam posição de destaque, sendo geralmente provocadas por vírus. No Brasil, a raiva é a doença mais prevalente (BRASIL, 2009) seguida pela encefalite provocada por herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; NETO et al., 2009). A participação do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) como agente causador de encefalite também já foi confirmada (SILVA et al., 2007a; RISSI et al., 2008).

No Brasil, as infecções causadas por BoHV-1 e por BoHV-5 encontram-se amplamente disseminadas em vários estados, determinando doença e prejuízo econômico (RIET-CORREA et al., 2006; SILVA et al., 2007b; RISSI et al., 2008; LUNARDI et al., 2009; LISBÔA et al., 2009). A ampla disseminação desses agentes está relacionada, direta e, principalmente, com o mecanismo biológico de perpetuação desses vírus na natureza, ou seja, a capacidade de realizar latência em seus hospedeiros (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

O animal infectado torna-se portador assintomático dos agentes durante toda a sua vida, excretando o vírus sob determinadas circunstâncias. Outro fator de grande importância epidemiológica é a manifestação assintomática das doenças, possibilitando a excreção viral pelo animal sem o aparecimento de qualquer manifestação clínica (ISERNHAGEN et al., 2011). A falta de informações sobre os fatores de risco associados a ambas as infecções, assim como a prevalência já elevada nos rebanhos bovinos brasileiros, contribui para a perpetuação do agente.

BoHV-1 e BoHV-5 pertencem à mesma família (Herpesviridae) e subfamília (Alphaherpesvirinae) e apresentam elevada similaridade molecular e

antigênica. Devido a essa característica, existe reação cruzada entre ambos, o que impossibilita a diferenciação desses agentes por meio dos métodos sorológicos. Testes de vírusneutralização foram realizados em vários estados do Brasil, porém, devido ao grande índice de reações cruzadas geradas por esse método, as prevalências específicas de cada tipo do vírus ainda são desconhecidas (ROEHE, et al., 1997).

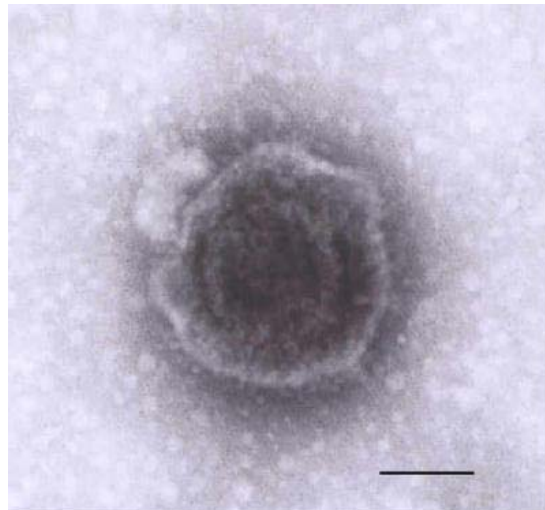
Estudo recente realizado por Campos et al. (2009), no estado do Rio Grande do Sul, permitiu a determinação da prevalência das infecções geradas por BoHV-1 e BoHV-5, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) . Os resultados mostraram prevalência elevada de animais herpéticos (87%) e grande número de co-infecções com os dois agentes (75,9%) nos bovinos portadores. No estado do Paraná, as prevalências de ambos os vírus continuam desconhecidas. A identificação da presença dos genomas de BoHV-1 e de BoHV-5 nos gânglios do nervo trigêmeo de animais de abate, por meio da PCR, é fundamental para avaliar a frequência da infecção latente por esses agentes. A amostragem em diferentes regiões do estado permite conhecer a distribuição geográfica das infecções e as áreas do Paraná em que a prevalência é maior. Os dados gerados com esse levantamento podem auxiliar na orientação de medidas profiláticas racionais para as doenças.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e o Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) pertencem à família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae, gênero Varicellovirus (Figura 1). Apresentam como principal característica um cerne contendo DNA linear de fita dupla com envelope glicoprotéico e um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 nm de diâmetro, contendo 162 capsômeros (ASHBAUGH et al., 1997).

Figura 1 – Morfologia do herpesvírus bovino 5 observada em microscopia eletrônica. O diâmetro do vírus é de cerca de 260 nm. A linha preta compreende 100 nm. Fonte: DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010.



Os dois herpesvírus compartilham diversas propriedades biológicas, moleculares e antigênicas e apresentam homologia de aproximadamente 85% de identidade genômica. O tamanho do genoma do BoHV-5 é de 138 Kilobases (Kb), e do BoHV-1, 135 Kb (DELHON et al., 2003). Ambos são compostos por uma região longa (UL) e uma região curta (US), sendo essa, subdividida por sequências terminais repetidas inseridas de forma invertida no genoma: uma denominada região repetida interna (IR) e a outra região repetida terminal (TR).

As características da subfamília Alphaherpesvirinae são baseadas nas características biológicas e genéticas, apresentando um ciclo replicativo curto

(<24 h), causando intensa lise celular e estabelecendo latência em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos (LADELFA et al., 2011).

Estudos comparativos, com cepas provenientes de bovinos herpéticos doentes manifestando diferentes sinais, empregando-se enzimas de restrição (BRAKE; STUDDERT, 1985), e testes de reação cruzada com anticorpos monoclonais (METZLER et al., 1985), evidenciaram diferença de propriedades genômicas e antigênicas nas estirpes virais de herpesvírus bovino. Com isso, em 1992, houve a mudança da classificação taxonômica da variante neuropatogênica BoHV-1.3 para BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992).

Atualmente, BoHV-1 é classificado em três subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV- 1.2b. Cada um deles está relacionado com manifestações clínicas diferenciadas no organismo do animal (METZLER et al., 1986). A infecção nos animais causada por BoHV-1.1 e BoHV- 1.2a pode desencadear problemas no sistema respiratório (Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos - IBR) e problemas reprodutivos como abortamentos e reabsorção embrionária. BoHV-1.2b causa quadros de infecção genital, caracterizados por Vulvovaginite Pustular Infecciosa e Balanopostite Pustular Infecciosa (IPV/IBP) (EDWARDS et al., 1990; MILLER et al., 1991; WENTINK et al., 1993).

Ao avaliar diferentes cepas de BoHV-5, D'Offay e colaboradores (1993) evidenciaram os subtipos "a" e "b", através de enzimas de restrição. Posteriormente, D'Arce et al. (2002) propuseram a existência de um terceiro subtipo, denominado "não a, não b". Contudo, não há, até o momento, evidências comprovando que os diferentes subtipos podem provocar doenças distintas.

Os alfa herpesvírus codificam inúmeras proteínas. Dentre elas, as glicoproteínas que desempenham papel fundamental no ciclo reprodutivo do vírus. As proteínas gB, gD, gH, gL e gK são essenciais na replicação viral, enquanto que a gC, gE, gI, gG, gM e gN são classificadas como não essenciais (METTENLEITER, 2003). Essas proteínas atuam no processo de reconhecimento e ligação com a célula infectada, fusão das membranas celular e viral, penetração na célula do hospedeiro, maturação e saída dos vírions infectantes (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A grande similaridade genômica entre BoHV-1 e BoHV-5 determina alta reação sorológica cruzada entre ambos (HOLZ et al., 2009), o que dificulta o levantamento da prevalência específica de cada agente e a sua distribuição nas diferentes regiões do país. Os testes sorológicos, baseados na detecção de anticorpos séricos específicos, são incapazes de diferenciar as infecções causadas por BoHV-1 ou por BoHV-5 (ROEHE et al., 1997).

Levantamentos sorológicos no Brasil evidenciam que cerca de 30 a 70% dos rebanhos sejam positivos para infecções herpéticas. Como estimativa, ao considerar a população de bovinos em torno de 190 milhões de cabeças, cerca de 57 a 133 milhões seriam portadores do vírus (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul mostra uma situação epidemiológica crítica, com prevalência de 87% dos bovinos infectados na forma latente, por BoHV-1 e/ou por BoHV-5 (CAMPOS et al., 2009).

2.2.1 BoHV-5

As infecções causadas por BoHV-5 apresentam características únicas, provocando encefalite que afeta principalmente animais jovens e caracteriza-se por baixa morbidade e alta mortalidade (GOMES et al., 2002; RISSI et al., 2006; LISBÔA et al., 2009). O tipo de criação parece assumir grande importância, sendo a doença mais prevalente em bovinos de corte criados extensivamente (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2006; AZAMBUJA et al., 2011).

Devido a alta similaridade genômica com o BoHV-1, a frequência do BoHV-5 nos rebanhos bovinos é desconhecida. Animais infectados, portadores do vírus em sua forma latente, são potenciais agentes de transmissão do vírus nos rebanhos, e a proporção de animais que desenvolvem a enfermidade clínica é, supostamente, menor do que a de animais que estão efetivamente infectados (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Estudo recente comprovou que a encefalite provocada por BoHV-5 pode, até mesmo, ser branda, transitória e assintomática (ISERNHAGEN et al., 2011). Os animais se mantêm aparentemente saudáveis e,

apesar da encefalite causada pelo vírus, na prática não podem ser identificados como infectados.

Embora presente em países como Austrália (JOHNSON et al., 1962), EUA (BARENFUS et al., 1963), Canadá (BECK, 1975), Hungria (BARTHA et al., 1969), Itália (MORETTI et al., 1964) e Escócia (WATT et al., 1981), a infecção é mais comum em países do hemisfério sul, principalmente no Brasil (WEIBLEN et al., 1989), na Argentina (CARRILO et al., 1983) e no Uruguai (DIAS et al., 1982).

No Brasil, foram evidenciados casos de infecção por BoHV-5 nos estados do Rio Grande do Sul (RISSI et al., 2006; 2008; SILVA et al., 2007b), Pará (RIET-CORREA et al., 2006), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Mato Grosso do Sul e São Paulo (SALVADOR et al., 1998), Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2002), Minas Gerais (GOMES et al., 2002) e Distrito Federal (FIGUEIREDO et al., 2009).

No estado do Paraná, estudos clínico-patológicos e virológicos têm demonstrado que o BoHV-5 é um importante agente causador de encefalite em bovinos (CLAUS et al., 2007; LUNARDI et al., 2009; ISERNHAGEN et al., 2011). Atualmente em vigência, o projeto "Diagnóstico diferencial das encefalopatias dos bovinos no estado do Paraná" é executado pelo grupo de pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina, e dados recentes comprovaram que as encefalites representaram 31,2% dos casos diagnosticados, sendo causada por BoHV-5 em 43,33% das vezes e pelo vírus da raiva em 36,66% (AZAMBUJA et al., 2011).

Além dos bovinos, a infecção experimental por BoHV-5 foi comprovada em ovinos e caprinos (SILVA et al., 1999b; DIEL et al., 2007). Isso apresenta importância epidemiológica uma vez que a prática de criação de pequenos ruminantes juntamente com bovinos é utilizada no controle de parasitas gastrointestinais. Se portadores, os pequenos ruminantes podem servir como reservatórios e possíveis transmissores da doença para os bovinos (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

Em surtos naturais, a disseminação é favorecida por vários fatores, principalmente quando a densidade de animais é alta. Além disso, fatores relacionados ao manejo inadequado de práticas sanitárias, nutricionais e stress relacionado ao transporte podem favorecer o desenvolvimento da doença (LUNARDI et al., 2009; CARBONERO et al., 2011).

2.2.2 BoHV-1

Esse patógeno é amplamente distribuído em diferentes partes do mundo, com relatos em países como China, Croácia e Colômbia (YAN et al., 2008; PIEDRAHITA et al., 2010; LOJKIC et al., 2011). A manifestação clínica observada com maior frequência nos países europeus é a IPV e a IBP, seguidas da IBR (STRAUB, 1991). A prevalência é variada, porém países como Bélgica, Holanda e Itália apresentam baixos índices da doença, graças à implantação de medidas de controle e erradicação deste agente (ACKERMANN; ENGELS et al., 2006).

Na América do Sul, a frequência de animais sororreagentes para BoHV-1 já variava entre 13 e 68%, uma década e meia atrás (ROEHE et al., 1998). O primeiro relato da doença no Brasil ocorreu em 1963, em um levantamento sorológico no estado da Bahia (GALVÃO; DORIA; ALICE, 1963). Posteriormente, vários relatos evidenciaram a grande frequência de animais sororreagentes distribuídos nos rebanhos bovinos do país. Existe variação na prevalência entre os estados, com frequência de animais positivos entre 18,8 e 96% (LOVATO et al., 1995; MELO et al., 1997). Como já mencionado anteriormente, os estudos de soroprevalência não permitem a discriminação entre os dois tipos de herpesvírus bovino (ROEHE et al., 1997; VARELA et al., 2009). Embora todos esses levantamentos façam referência à infecção por BoHV-1, é impossível afirmar que parte dos resultados não se deva à infecção por BoHV-5. Com isso, a prevalência de cada infecção específica permanece desconhecida no território nacional (HOLZ et al., 2009).

No estado do Paraná, estudos envolvendo a epidemiologia de herpesvírus bovino demonstraram número crescente de animais sororreagentes, com frequências de 43,7% (MÉDICI et al., 2000), 52,4% (TAKIUCHI et al., 2001) e 59,0% (DIAS et al., 2013). A avaliação de propriedades com histórico de problemas reprodutivos localizadas em 30 municípios do estado, concluiu que o vírus circulava em 100% das propriedades (MÉDICI et al., 2000). Dados semelhantes foram encontrados por Dias et al. (2013) comprovando a presença do vírus em 71,3% das propriedades rurais.

Os fatores de risco relacionados à transmissão do agente estão vinculados à idade do animal, tipo de criação e práticas de manejo sanitário e geral

da propriedade. O sistema de criação extensiva favorece a transmissibilidade do vírus, devido a fatores como alta densidade populacional, baixas taxas de reposição animal, falta de implantação de métodos imunoproliféricos contra doenças reprodutivas e intercâmbio de animais entre propriedades (DIAS et al., 2008, 2013; BARBOSA et al., 2005; AONO et al., 2012).

2.3 PATOGENIA

Os herpesvírus bovino são transmitidos por contato direto entre os animais ou pelo contato indireto, por meio de água, alimentos ou fômites contaminados com partículas virais excretadas por animais infectados (ACKERMANN; ENGELS, 2006; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). A transmissão venérea, através da monta natural ou das técnicas artificiais de reprodução, assume importância epidemiológica e econômica (OLIVEIRA et al., 2011). Outra forma de transmissão é através de partículas virais presentes em aerossóis, sendo possível a transmissão em curtas distâncias (MARS et al., 2000).

Após a infecção, ocorre replicação nas células da mucosa nasofaríngea ou genital, com alterações na membrana basal causadas pela intensa lise celular (STEUKERS et al., 2011). O grau de infecção nesta fase é alto e os vírions produzidos na fase lítica são excretados em secreções nasais ou genitais, favorecendo a transmissibilidade entre animais de um mesmo rebanho (RISSI et al., 2008). Esse é um fator crucial na perpetuação do agente dentro de um sistema de produção, tornando a identificação, através de testes virológicos, fundamental em programas de controle e erradicação (STRAUB, 1991).

As vias de acesso dos herpesvírus ao sistema nervoso central (SNC) após a replicação inicial nos sítios de infecção primária determinam a neuropatogenia dos agentes (FLORES et al., 2009). Estudos realizados em bovinos, ovinos e coelhos infectados experimentalmente, evidenciam a via olfatória como a principal rota de acesso ao SNC (BELKNAP et al., 1994; SILVA et al., 1999a; MEYER et al., 2001). Nos coelhos, essa via possibilita uma infecção mais rápida e eficaz quando comparada à via trigeminal (ROCK; REED, 1982; CHOWDHURY et al. 1997; DIEHL et al., 2005; CARON et al., 2002). Contudo, a via trigeminal permite

o estabelecimento de forma específica da latência no gânglio do nervo trigêmeo (BAGUST; CLARK, 1972; ROCK, 1994; PEREZ et al., 2002).

Beltrão et al. (2000) avaliaram a cinética viral em coelhos inoculados com a cepa EVI- 88 na fase aguda da doença. O vírus foi inicialmente detectado no bulbo olfatório às 48h pós- infecção, seguida de córtex olfatório, ponte e gânglio do nervo trigêmeo (GNT), às 72h. Em bovinos, a distribuição viral na forma latente, foi detectada em bulbo olfatório, telencéfalo, ponte, medula, tálamo e GNT (VOGEL et al., 2003). Os resultados mostram que a intensa distribuição viral nas fases aguda e latente, ocorreram pela via olfatória e que o agente pode estabelecer latência em áreas distintas do SNC.

A gravidade dos sinais clínicos manifestados pelo BoHV-1 e BoHV-5 é resultante da diferença de patogenicidade entre as cepas virais. Estudos em bovinos e coelhos, comprovam a diferença de neuroinvasividade e neurovirulência em amostras de BoHV-5 (SILVA et al., 2007b; FLORES et al., 2009; ISERNHAGEN et al., 2011). O mesmo acontece para o BoHV- 1, com a presença de estirpes de isolados reprodutivos (BoHV 1.1 e 1.2b) causando encefalites (BROWER et al., 2008; BATISTA et al., 2010).

2.4 SINAIS CLÍNICOS

Podem ser agrupadas de quatro formas distintas: respiratória, sistêmica, genital e neurológica. A união de fatores, tais como patogenicidade da cepa envolvida, tipo de criação e idade e imunidade do hospedeiro, determinam o grau de intensidade das manifestações clínicas (SILVA et al., 2007a; RISSI et al., 2008; NANDI et al., 2009).

2.4.1 Forma Respiratória (IBR)

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), provocada por BoHV-1.1, pode apresentar sintomas de intensidade variada. A doença apresenta altos índices de morbidade (100%) e uma mortalidade de cerca de 10% (NANDI et al., 2009). Esta forma é caracterizada pelo aumento da temperatura corporal (40.5 - 42.0°C), dispneia, rinite, conjuntivite, úlceras de córnea, formação de lesões ulcerativas nas

mucosas nasais e pneumonia. As descargas nasais geralmente apresentam-se de forma bilateral, inicialmente do tipo serosa, evoluindo para seromucosa e mucohemorrágica nos casos mais graves (BELKNAP et al., 1994).

O início dos sinais clínicos varia, podendo ocorrer entre os dias 1 e 15 pós-infecção (MEYER et al., 2001). A fase aguda da doença manifesta-se entre os dias 5 e 10 pós-infecção, havendo muitas vezes a recuperação do animal. Contudo, o animal infectado desenvolve a forma latente, tornando-se potencial transmissor da doença no rebanho (ACKERMANN; ENGELS, 2006).

Em experimentos controlados de infecção por BoHV-5, após a inoculação intranasal, há o aparecimento de sinais respiratórios brandos, tais como secreções nasais e oculares semelhantes ao quadro de IBR. O início desses sinais ocorre frequentemente antes do aparecimento dos sinais neurológicos e a formação de lesões ulcerativas é detectada em um pequeno número de animais (BELKNAP et al., 1994; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002)

2.4.2 Forma Sistêmica

As infecções sistêmicas acometem com maior frequência os animais jovens, desprovidos de imunidade ativa eficaz, comprometendo os tratos digestório e respiratório. Em neonatos, as lesões caracterizam-se por glossite, esofagite e ruminite necrosante aguda, evoluindo para a morte em 4 a 5 dias (MUYLKENS et al., 2007).

Após a infecção primária no hospedeiro, o vírus é transportado pelo organismo através das vias linfáticas, ocasionando a disseminação sistêmica dos vírus (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Dessa forma, pode ocorrer o desenvolvimento de afecções tanto no sistema reprodutivo (casos de abortamento), como no respiratório (forma respiratória). Informações sobre o mecanismo de ação na forma sistêmica de infecção por BoHV-1 ainda são desconhecidos (MUYLKENS et al., 2007).

2.4.3 Forma Genital

As principais manifestações clínicas causadas pelo BoHV-1, subtipo 1.2, estão relacionadas com a Vulvovaginite Pustular Infecciosa e pela Balanopostite Pustular Infecciosa (IPV/IBP). O curso clínico destas doenças varia de acordo com o grau de infecção, durando de quatro a sete dias, aproximadamente.

Os animais acometidos apresentam síndrome febril (hipertermia, depressão e anorexia). Há o aparecimento de vesículas de 1 a 2 mm de diâmetro, que evoluem para pústulas e erosões, localizadas nas mucosas vaginal, vulvar, prepucial e peniana. A mucosa pode apresentar-se edemaciada, hiperêmica e com presença de secreções serosas ou muco-hemorrágica, decorrente de infecções secundárias (HENZEL et al., 2008).

Na fase aguda da doença, pode ocorrer a transferência transplacentária do vírus, ocasionando perdas embrionárias, morte fetal, endometrite e ooforite. Na forma latente da doença, as partículas virais alojam-se nos gânglios sacrais, podendo, genitofemoral, reto caudal e obturador (STEUKERS et al., 2011).

A contaminação do sêmen pelos alfa herpesvírus gera o aparecimento dos quadros

clínicos de IBP e IPV, associado aos quadros de cervicite e endometrite, nas fêmeas, e epididimite, nos touros (NANDI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Considerado um agente infeccioso emergente na reprodução bovina, o BoHV-5 pode causar a degeneração de oócitos e embriões in vitro, comprometendo as taxas de concepção e a eficiência reprodutiva (FRADE et al., 2010).

Os isolados de BoHV-1 classificados como BoHV-1.1, BoHV-1.2a, geram infecções respiratórias (IBR) e genitais (abortamento e reabsorção embrionária) (MUYLKENS et al., 2007). O quadro de abortamento ocorre entre o quarto e sétimo meses de gestação, ocasionando quadro clínico de endometrite e diminuição das taxas de fertilidade da fêmea bovina (NANDI et al., 2009).

2.4.4 Forma neurológica

Apesar de os herpesvírus bovino 1 e tipo 5 apresentarem grande semelhança gênica, ambos diferem na capacidade de causar encefalite

(ASHBAUGH et al., 1997). Embora neurotrópicos, o BoHV-5 é mais neuropatogênico quando comparado ao BoHV-1, provocando disfunções neurológicas graves e frequentemente fatais (PEREZ et al., 2002).

Os principais sinais clínicos gerados por esses agentes estão relacionados com o grau de neuroinvasividade e neurovirulência das estirpes virais. A distribuição do vírus nas diferentes porções do SNC vai determinar o aparecimento das lesões e disfunções neurológicas (VOGEL et al., 2003; LUNARDI et al., 2009). Dessa forma, em um surto de meningoencefalite herpética, animais podem manifestar sinais clínicos de forma e intensidade distintas (LISBÔA et al., 2003).

Os sinais observados em infecções experimentais ou naturais são muito semelhantes (MEYER et al., 2001; RISSI et al., 2008; LISBÔA et al., 2009; ISERNHAGEN et al., 2011). O período de evolução da meningoencefalite herpética nos bovinos varia entre 1 a 15 dias (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2006) podendo ser mais longo em alguns casos (LUNARDI et al., 2009).

A síndrome cerebrocortical é caracterizada por excitação, bruxismo, hiperexcitabilidade, alteração de comportamento, mioclonias, amaurose, paresia, manias e pressionar a cabeça contra objetos (RISSI et al., 2008). Lesões localizadas no tronco encefálico geram alterações nos pares de nervos cranianos como paresia da língua (XII par de nervos), disfagia e sialorreia (IX, X e XII), nistagmo (VIII) e midríase (III), além de depressão, sonolência, déficits proprioceptivos e paresia (LISBÔA et al., 2009).

2.5 LATÊNCIA

A infecção latente causada pelos herpesvirus bovino tipo 1 e tipo 5 é estabelecida em neurônios de gânglios sensoriais que inervam o sítio primário de infecção (MEYER et al., 2001). Depois de ocorrida a replicação nas mucosas, ocorre o transporte dos nucleocapsídeos via fluxo axoplásmico retrógrado até os corpos neuronais dos gânglios associados (DIEL et al., 2005; NANDI et al., 2009; FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Devido a uma supressão dos genes alfa, necessários para as etapas de expressão e replicação gênica, o ciclo é interrompido.

Conseqüentemente, o genoma viral permanece no núcleo dos neurônios infectados na forma episomal pelo resto da vida do animal (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996; REBORDOSA et al., 1996; METTENLEITER, 2003).

O estabelecimento de infecções latentes é, sem dúvida, uma das propriedades mais marcantes dos herpesvírus, e apresenta importância epidemiológica considerável. Na infecção latente, há a ausência de expressão gênica, resultando na absoluta ausência de sinais clínicos. Dessa forma, os animais tornam-se portadores assintomáticos com episódios esporádicos de reativação viral, excretando e transmitindo o vírus de forma intermitente para outros animais do rebanho (DEL MÉDICO ZARJAC et al., 2010).

Os sítios de eleição para a latência, tanto para o BoHV-1 quanto para o BoHV-5, dependem da região onde ocorreu a infecção primária, ou seja, os tratos respiratório e genital (STEUKERS et al., 2011). Nas infecções respiratórias, os gânglios do nervo trigêmeo são os sítios de latência natural (SILVA et al., 1999a; BELTRÃO et al., 2000; MEYER et al., 2001). Os gânglios da região sacral, tais como podendo, genitofemoral, reto caudal e obturador, são os locais de eleição após a infecção genital (HENZEL et al., 2008; STEUKERS et al., 2011).

Além desses, há o estabelecimento de infecção latente com BoHV-5 em diferentes porções do sistema nervoso (SNC). Áreas do telencéfalo, tálamo, tronco encefálico, ponte, medula oblonga e cerebelo também podem albergar o vírus na forma latente (VOGEL et al., 2003). Mesmo com características neurotrópicas, o BoHV-5 pode, eventualmente, ser identificado em órgãos como tonsilas, traquéia e pulmão (MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; SPILKI et al., 2006). O BoHV-1 pode estabelecer latência em outros locais do organismo, como tonsilas e nervos sensoriais (NANDI et al., 2009).

Situações associadas ao estresse do hospedeiro, como desmama, aglomeração de animais em um mesmo recinto, manejo nutricional incorreto e transporte, resultam na possibilidade de reativação da infecção (CARBONERO et al., 2011; FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Em situações experimentais, a dexametasona é utilizada para esta finalidade, tanto em bovinos como em coelhos, em razão do seu efeito imunossupressor (BELKNAP et al., 1994; BELTRÃO et al., 2000; SPILKI et al., 2002; RISSI et al., 2008).

Com a reativação viral, ocorre a replicação lítica nos neurônios infectados e a consequente produção de progênie viral infecciosa. Os vírions são transportados novamente até os sítios primários de infecção (transporte anterógrado), onde ocorre a nova replicação e a excreção viral (ROCK et al., 1994). A reativação viral frequentemente é acompanhada por sinais clínicos e pelo aparecimento de lesões, fenômeno denominado recrudescência (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Nessa fase, geralmente os sinais clínicos são mais brandos quando comparados aos da doença após a infecção primária (CASCIO et al., 1999; MEYER et al., 2001; ISERNHAGEN et al., 2011).

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Ante-Mortem

A meningoencefalite herpética é caracterizada por apresentar altos índices de letalidade. Contudo, em surtos naturais ou em infecções experimentais, a doença pode não obrigatoriamente evoluir para a morte (LISBÔA et al., 2009; ISERNHAGEN et al., 2011). Dessa forma, o estabelecimento do diagnóstico ante-mortem para essa enfermidade é de fundamental importância, uma vez que permite o diferencial com outras doenças causadoras de encefalopatia, como a raiva (CLAUS et al., 2007; LUNARDI et al., 2009).

A detecção do genoma viral do BoHV-5 através da PCR de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de animais infectados com evolução clínica neurológica, pode representar um meio diagnóstico de grande utilidade prática (LISBÔA et al., 2009). Essa técnica foi utilizada e comprovada como eficaz em relatos de infecção natural (LUNARDI et al., 2009) e experimental (ISERNHAGEN et al., 2011). Apesar de sua relevância prática, o resultado falso negativo, utilizando amostras de LCR, é comum. Fatores como neurovirulência, evolução clínica da doença, neurobiologia da infecção, presença ou não de citólise neuronal e grau de neuropatogenicidade da estirpe envolvida podem influenciar os resultados da PCR aplicada ao LCR (AMUDE et al., 2008).

O diagnóstico de infecção por BoHV-1 e BoHV-5, pode ser realizado através de análise de materiais biológicos, tais como sêmen e secreções nasal,

ocular ou genital de animais suspeitos de carrear a infecção (DIEL et al.,2005; FLORES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Testes virológicos, tais como isolamento viral e PCR, são capazes de detectar a presença do vírus e identificar os animais portadores em um rebanho (RISSI et al., 2008; LUNARDI et al.,2009; LISBÔA et al., 2009).

2.6.2 Post-Mortem

Os achados de necropsia oriundos de animais infectados pelos alfa herpesvírus são variáveis e podem estar ausentes, tanto em casos naturais quanto experimentais de encefalite (SALVADOR et al., 1998; CASCIO et al., 1999; MEYER et al., 2001; COLODEL et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2006; NETO et al., 2009).

As principais alterações são descritas no SNC e no sistema respiratório dos animais. As alterações encefálicas são evidenciadas por áreas amolecidas e amareladas com cavitações cerebrais, amolecimento do parênquima nervoso perceptível ao corte, congestão e hemorragia submeningea (COLODEL et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2006). No trato respiratório, há evidências de broncopneumonia, com presença de focos de necrose liquefeita decorrentes de infecção secundária (BELKNAP et al., 1994). Os lobos comumente afetados são o apical e cardíaco, associados com presença de enfisema no lobo diafragmático (MEYER et al., 2001).

Microscopicamente, as lesões do sistema nervoso correspondem ao processo de meningoencefalite herpética não supurativa (MENS), com presença de necrose neuronal em córtex cerebral, gliose, manguitos perivasculares com predomínio de linfócitos e plasmócitos (linfoplasmocitária) em substância branca e cinzenta, degeneração neuronal, meningite linfoplasmocitária, satelitose e vacuolização do neurópilo (BELKNAP et al., 1994; SALVADOR et al., 1998; RIET-CORREA et al., 2006). Alterações no gânglio do nervo trigêmeo podem se apresentar como proliferação de células linfoides, presença de manguitos perivasculares e ganglionite (MEYER et al., 2001; SPILKI et al., 2006).

Além dessas, outras alterações microscópicas podem estar envolvidas, como a necrose e a presença de corpúsculos de inclusão eosinofílicos.

A necrose do córtex cerebral (polioencefalomalácia) é um achado comum em quadros de MENS no Brasil (COLODEL et al., 2002; SPILKI et al., 2006; RISSI et al., 2006, 2008), na Argentina (CARRILO et al., 1983) e no Uruguai (DIAS et al., 1982), sendo incomum em países no hemisfério norte. Devido à diferença de neurovirulência associada às estirpes virais, a frequência de observações do corpúsculo de inclusão é variada (BELTRÃO et al., 2000; CARON et al., 2002). Considerado como indicador de confirmação do diagnóstico da meningoencefalite herpética, essas estruturas podem estar ausentes (NETO et al., 2009), presentes em 21,5% dos casos (RISSI et al., 2006) ou em sua totalidade (ELIAS et al., 2004).

As lesões microscópicas decorrentes da forma respiratória podem estar presentes concomitantemente aos casos neurológicos (MEYER et al., 2001). Há bronquite com presença de material amorfo, muco e debris em brônquios, fluido alveolar com neutrófilos e macrófagos degenerados, hiperplasia de linfonodos bronquiais, inflamação nas vias aéreas superiores e broncopneumonia intersticial (BELKNAP et al., 1994; SALVADOR et al., 1998; MEYER et al., 2001).

2.6.3 Diferencial

As doenças do encéfalo dos bovinos abrangem um grupo importante de enfermidades, determinando prejuízos econômicos consideráveis. Na maioria das vezes, provocam a morte dos animais acometidos, quase sempre se manifestando sob a forma de surtos (SANCHES et al., 2000; LEMOS et al., 2005). Devem ser consideradas como um conjunto de enfermidades porque se manifestam através distúrbios neurológicos comuns, variáveis e inespecíficos. Dessa forma, confundem-se entre si o que torna o diagnóstico diferencial uma necessidade e um desafio (MAYHEW, 1989).

As principais causas de transtornos neurológicos são ordem infecciosa, física, tóxica, metabólica, nutricional e idiopática, gerando processos de natureza inflamatória, vascular e degenerativa no encéfalo (RIET-CORREA, RIET-CORREA, SCHILD, 2002). Com base nos relatos publicados, a encefalopatia de causa inflamatória mais frequente no Brasil é a Raiva (BRASIL, 2009; RISSI et al., 2010; AZAMBUJA et al., 2011), seguida da meningoencefalite não supurativa pelo BoHV-5 (RISSI et al., 2006; CLAUS et al., 2007) ou pelo BoHV-1 (SILVA et al.,

2007a; RISSI et al., 2008). Além dessas, enfermidades como a Febre Catarral Maligna (LEMOS et al., 2005; RECH et al., 2005), meningoencefalites bacterianas, Listeriose, Babesiose cerebral, intoxicações por plantas (QUEIROZ et al., 2012, 2013), por chumbo, por organofosforados, Acetonemia, Hipocalcemia, Polioencefalomalácia (PEM) (NAKAZATO et al., 2000; GONÇALVES et al., 2001) e Tétano.

No estado do Paraná, o levantamento das principais encefalopatias em bovinos revelou que metade dos animais apresentaram transtornos de origem tóxica, seguida por processos inflamatórios ou infecciosos, físicos, neoplásicos e metabólicos. Dentre as intoxicações, 58,3% foram causadas por plantas, tais como *Senna occidentalis* e *Senna obtusifolia* (15,58%), *Cynodon dactylon* e *Cynodon nlemfuensis* (12,5%), *Crotalaria* spp. (10,41%), *Acanthocladus brasiliensis* (6,25%), *Ateleia glazoviana* (6,25%), *Baccharis megapotamica* (4,16%) e *Tabernaemontana catharinensis* (4,16%). Botulismo e intoxicação por nitrito/nitrato foram responsáveis por 12,5% e 14,58% dos casos tóxicos, respectivamente. Tétano e enterotoxemia por *Clostridium perfringens* foram responsáveis, cada uma, por 4,16% das causas tóxicas. Micotoxicose e intoxicação por carbamato foram responsáveis por 2,08% cada uma. Das doenças de origem inflamatória/infecciosas, a raiva (36,66%) e a encefalite por BoHV-5 (43,33%) foram as mais comumente encontradas (AZAMBUJA et al., 2011).

2.7 TÉCNICAS LABORATORIAIS

Os diagnósticos virológicos empregados na rotina laboratorial são a melhor maneira de diferenciar as infecções geradas pelo herpesvírus bovino 1 e tipo 5. Amostras frescas e congeladas de sistema nervoso, swab nasal, ocular e genital, assim como feto e sêmen de animais suspeitos podem ser processadas. O diagnóstico é baseado no isolamento viral dessas amostras, seguido da identificação do agente em questão no cultivo celular (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

Há necessidade, porém, de um número substancial de partículas virais presentes na amostra. Um ponto crítico nessa metodologia é o binômio tempo e temperatura, uma vez que amostras conservadas inadequadamente e enviadas tardiamente, acabam fornecendo resultados falso negativos (TAKIUCHI et al., 2001;

CLAUS et al., 2005). Após a incubação, a presença do vírus é determinada através da lise celular (efeito citopático - ECP) e da tipificação, com uso de anticorpos específicos (ROEHE et al., 1997).

A utilização de testes de virusneutralização (VN) é amplamente difundida nos laboratórios de virologia. Esta técnica apresenta, como vantagem, a obtenção de resultados em curto espaço de tempo, cerca de 4 a 5 dias (SÁNCHEZ et al., 2008). Contudo, é incapaz de diferenciar infecções geradas por BoHV-1 ou por BoHV5, como já mencionado (ROEHE et al., 1997; HUBNER et al., 2005). O mesmo pode ocorrer em ensaios de ELISA, ocorrendo reação cruzada em amostras dos dois tipos de herpesvírus (MEYER et al., 2001; BASHIR et al., 2011).

Diagnósticos moleculares, com destaque para a PCR, apresentam papel decisivo nas descobertas das propriedades clínicas e patológicas dos herpesvírus (DELHON et al., 2003). O método possui sensibilidade e especificidade altas e fornece resultados rápidos. Além disso, permite o processamento de amostras autolisadas, sem conservação prévia. Esta característica assume grande importância principalmente em animais de produção, cujos materiais biológicos colhidos a campo, muitas vezes, são conservados inadequadamente e demandam um longo intervalo de tempo para o transporte até o laboratório (CLAUS et al., 2005).

A amplificação do gene referente à glicoproteína C (gC) em ensaios de PCR, apresenta vantagens frente a outros genes como tiamina-kinase (BoHV-1) e gD (BoHV-5), devido ao fato de ser comum a ambos os vírus (ALEGRE et al., 2001). O gene da gC (UL 44), dentre todas as glicoproteínas, é a que apresenta os maiores índices de similaridade, sendo comum a ambos os tipos de herpesvírus bovino (DELHON et al., 2003).

2.8 PREVENÇÃO

O objetivo principal da implantação de medidas profiláticas contra o herpesvírus bovino é minimizar o impacto gerado pelas perdas econômicas associadas à infecção. O estabelecimento do controle e/ou erradicação dos agentes no sistema de produção, leva em conta a diminuição das ocorrências das afecções clínicas aparentes e a prevenção da transmissão viral (STRAUB, 1991).

A imunoprofilaxia e a associação com medidas sanitárias do rebanho são as principais formas de prevenção. As estratégias são definidas de modo a impedir a introdução da doença em rebanhos livres, fundamentando-se em práticas sanitárias de quarentena e testes sorológicos nos animais introduzidos. A identificação e consequente eliminação dos animais sororreagentes é uma das principais práticas de controle, adotada por países considerados endêmicos para BoHV-1 (ACKERMANN; ENGELS, 2006). Além disso, o contato direto entre animais e o contato indireto com secreções ou produtos biológicos contaminados, provenientes de animais com histórico sanitário desconhecido, deve ser evitado (MARS et al., 2000).

O monitoramento da qualidade do sêmen e de embriões, assim como a adoção de testes sorológicos periódicos em reprodutores, é importante para diminuir o potencial de distribuição das partidas contaminadas em propriedades que utilizam a inseminação artificial (ROCHA et al., 1999).

Dentre as medidas preventivas, a vacinação é a mais empregada. Embora seja incapaz de prevenir as infecções causadas por BoHV-1 e/ou por BoHV-5, a imunização diminui a gravidade das manifestações clínicas, assim como reduz a replicação e a excreção viral, diminuindo a circulação dos agentes nos rebanhos (ACKERMANN; ENGELS, 2006). Com base na reatividade cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5, gerada pela intensa similaridade gênica entre ambos, preconizou-se a utilização de vacinas contendo antígenos de BoHV-1 como medida preventiva para a meningoencefalite herpética dos bovinos (CASCIO et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000; VOGEL et al., 2002).

Em linhas gerais, existem dois tipos principais de vacinas disponíveis comercialmente: as vivas modificadas e as inativadas. As vacinas vivas modificadas induzem tanto resposta imune humoral quanto celular. Entretanto, podem provocar latência do vírus nos indivíduos imunizados, principalmente, por via intranasal, além de causar abortamento em animais prenhes (ACKERMANN; ENGELS, 2006). Outra manifestação indesejada é o desenvolvimento de afecções respiratórias secundárias, desencadeadas pela imunossupressão provocada pela estirpe viral vacinal (HUBNER et al., 2005). As vacinas inativadas, por outro lado, têm sido utilizadas principalmente em fêmeas prenhes, porém induzem grau de proteção inferior quando comparadas às vivas modificadas. Além disso, geram

apenas imunidade humoral, exigindo revacinações frequentes que aumentam significativamente o custo de produção (JONES; CHOWDHURY, 2008).

Outro ponto importante é a diferença de potencial imunogênico apresentado pelas vacinas disponíveis comercialmente. Estudo realizado por Silva e colaboradores (2007b) avaliou a imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra BoHV-1, e demonstrou que apenas as vacinas norte americana e uruguaia, induziram resposta humoral adequada contra esse agente. Em nenhuma das vacinas testadas, houve a indução de títulos neutralizantes significativos contra BoHV-5. Dessa forma, a eficiência da vacinação nos programas sanitários depende da disponibilidade e da utilização de produtos capazes de induzir maior grau de proteção, assim como da revisão dos critérios de licenciamento e importação de vacinas (ACKERMANN; ENGELS, 2006; SILVA et al., 2007b).

Embora utilizada com relativo sucesso na prevenção de enfermidades geradas pelos heperpesvírus bovinos, a vacinação é incapaz de prevenir a latência dos agentes. Além disso, não é possível diferenciar os animais vacinados daqueles portadores de infecções latentes. Para isso, vêm sendo desenvolvidas vacinas, contendo ambos os vírus vivos, nos quais se deletaram os genes responsáveis pela síntese das glicoproteínas estruturais E (gE"), I (gI~), D (gD") e US9 (US9") (HUBNER et al., 2005; SILVA et al., 2006; PETRINI et al., 2009). A sua viabilidade tem sido comprovada em programas de controle e erradicação contra BoHV-1 em países europeus. Vários estudos têm comprovado a eficácia dessas vacinas como forma de diminuir a intensidade dos sinais clínicos manifestados e a probabilidade do desenvolvimento de latência, diminuindo, ou até mesmo impedindo, a reativação viral após o uso de dexametasona (FRANCO et al., 2002; HUBNER et al., 2005). Apesar de promissoras, essas vacinas ainda não estão disponíveis no comércio brasileiro.

2.9 REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.3, p.293-302, 2006.

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus-1 and 5. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, n.2, p. 613-621, 2001.

AMUDE, A. M. Encefalomielite pelo vírus da cinomose canina: aspectos neuroclínicos e neuropatológicos e uso das técnicas de RT - PCR e imunistoquímica no auxílio do diagnóstico *Post Mortem*. Universidade Estadual de Londrina, 2008, 118p. Tese de doutorado.

AONO, F.H.; COOKE, R.F.; ALFIERI, A.A.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed timed AI in Brazillian cow calf operations. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 1-7, 2012.

ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n.4, p.387-394, 1997.

AZAMBUJA, R.O.; QUEIROZ, G.R.; RIBEIRO, R.C.L.; PEREIRA, P.F.V.; ROMÃO, F.T.N.M.A.; FLAIBAN, K.K.M.C.; BALARIN, M.R.S.; NETTO, D.P.; DI SANTIS, G.W.; REIS, A.C.F.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; ALFIERI, A.A.; LISBÔA, J.A.N. Prevalência das doenças neurológicas em bovinos no estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL ENDESA, São Paulo. **O Biológico**, v.73, n.2, p.63, 2011.

BAGUST, T.J.; CLARK, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, n.4, p. 375-383, 1972.

BARBOSA, A.C.V.C.; ELSNER, W.M.; BRITO, E.D.; ALFAIA, B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1368-1373, 2005

BARENFUS, M.; QUADRI, C.A.D.; MCINTYRE, R.W.; SCHOROEDER, R.J. Isolation of infectious Bovine Rhinotracheitis Virus from Calves with Meningoencephalitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 143, n.7, p.725-728, 1963.

BARTHA, A.; HAJDU, G.; ALDASY, P.; PACZOLAY, G. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.19, n.3, p.145 - 151, 1969.

BASHIR, S.; SINGH, R.; SHARMA, B.; YADAV, S. Development of a sandwich ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.5, p.363-366, 2011.

BATISTA, H.B.C.R.; SCHIMDT, E.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.P. Herpesvirus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1023-1028, 2010.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental Infection of Neonatal Calves with Neurovirulent Bovine Herpesvirus Type 1.3. **Veterinary Pathology**, v. 31, n.2, p. 358-365, 1994.

BECK, B.E. Infectious Bovine Rhinotracheitis in cattle and its differential diagnosis. **Canadian Veterinary Journal**, v.16, n.5, p.269-271, 1975.

BELTRÃO, N.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.; ROEHE, P.M.; IRIGOYEN, L.F. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n.7, p. 144-150, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Controle da raiva dos herbívoros. Manual técnico - 2009. **Brasília: MAPA/SDA/DSA**, 2009, 125p.

BRAKE, F.; STUDDERT M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n.2, p. 331-334, 1985.

BROWER, A.; HOMB, K.H.; BOCHSLER, P.; PORTER, R.; WOODS, K.; UBL, S.; KRUEGER, D.; CIGEL, F.; KURTH, K.T. Encephalitis in aborted bovine fetuses associated with bovine herpesvirus 1 infection. **Journal Veterinary Investigated**, v. 20, n.8, p. 297-303, 2008.

CASCIO, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, C.; AMIES, A.D.; COLLINS, J.K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n.2, p. 134-139, 1999.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HUBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 67 - 73, 2009.

CARBONERO, A.; MALDONADO, A.; PEREA, A.; CARCÍA-BOCANEGRA, I.; BORGE, C.; TORRALBO, A.; ARENAS-MONTES, A.; ARENAS-CASAS, A. Factores de riesgo del Síndrome Respiratorio Bovino em terneros lactantes de Argentina. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.4, p. 41-51, 2011.

CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C.F.C.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; ODEON, A; SUR, J.H. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n.5, p. 285-295, 2002. 29

CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 30, n. 3, p. 327-332, 1983.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; MOSIER, D.; SUR, J.H.; OSORIO, F.A.; KENNEDY, G.; WEISS, M.L. Neuro-pathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-

encephalitis in rabbit seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, v.117, n.2, p. 295 - 310, 1997.

CLAUS, M.O.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; WOSIACKI, S.R.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Detecção rápida e diferenciação de herpesvírus bovino 1 e 5 de genes da glicoproteína C em amostras clínicas por PCR-multiplex. **Journal of Virology Methodology**, v.128, n. 2, p. 183-188, 2005.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and Multiplex-PCR in central nervous system from cattle with neurological disease in brazilian herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.485-490, 2007.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.293-298, 2002.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.4, p.315- 324, 2002.

DIEL, D.G.; FONSECA, E.K.; SOUZA, S.F.; MAZZANTI, A.; BAUERMAN, F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 164-170, 2005.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. Biology of bovine herpesvírus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, n. 3, p. 138 - 145, 2010.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of Bovine Herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, n.19, p. 10339 - 10347, 2003.

DIAS, L.E.; MAISONAVE, J.; GUARINO, H.; PAULLIER, C.; PERDOMO, E.; FIGARES, A.; IZAGUIRRE, R. Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR). Descripción de um cuadro clínico em terneiros de tambo. III Congresso Nacional de Veterinária, Uruguai, p. 521-531, 1982.

DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; FERREIRA-NETO, J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; MULLER, E.E. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n.3, p.161-168, 2008.

DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; FERREIRA-NETO, J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; MULLER, E.E. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná , Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, n.5, p.39-47, 2013.

DIEL, D.G.; ALMEIDA S.R.; BRUM, M.C.S.; DEZEGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 2, p.257-267, 2007.

D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**., v.54, n.2, p.534-539, 1993.

EDWARDS S.; WHITE H.; NIXON P. A study of the predominant genotypes of bovine herpesvirus 1 found in the U.K. **Veterinary Microbiology**, v.22, n. 2-3, p.213-223, 1990. ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por herpesvírus bovino - 5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.1, p.123-131, 2004.

FIGUEIREDO, L.A. Presença do genoma do herpesvírus bovino 5 e do herpesvírus bovino 1 no SNC de bovinos sadios, portadores de meningoencefalite herpética e outras encefalopatias. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 63p. Dissertação de Mestrado.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; DEZEGRINI, R.; ALMEIDA, S.R.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2009.

FRADE, C.; MARTINS JUNIOR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 73, n. 2, p. 324-331, 2010.

FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.; FLORES, E.F.; WEIBLEIN, R.; ROEHE, P.M. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n.5, p. 274-278, 2002.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; VARELA, A.P.M. In. Herpesviridae. Virologia Veterinária. Cap. 18. Santa Maria: editora ufsm, 2012

GALVÃO, C.L.; DORIA, J.D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Instituto de Biologia da Bahia**, v.6, n.1, p.15-25, 1963.

GONÇALVES, R.C. et al. Aspectos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos da polioencefalomalácia em bovinos, na região de Botucatu, SP. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.7, n.2, p.53-57, 2001. 29

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, R.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n. 2, p. 217-220, 2002.

HENZEL, A.; DIEL D.G.; ARENHAR, S.; VOGEL, F.S.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvirus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas.

Pesquisa Veterinária Brasileira, v.28, n.5, p.140-148, 2008.

HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.

Soroprevalência de herpesvirus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767 - 773, 2009.

HUBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gl, Ge, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, n.2, p.187-196, 2005.

ISERNHAGEN, A.J.; COSENZA, M.; COSTA, M.C.; MÉDICI, K.C.; BALARIN, M.R.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; ALFIERI, A.A.; LISBÔA, J.A.N. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. **Canadian Veterinary Journal**. v. 52, n.6, p. 1313-1318, 2011.

JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C.; MCGAVIN, M.D. A viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, n. 3, p. 207-215, 1962.

JONES, C.; S. CHOWDHURY. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV- 1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex, and development of improved vaccines. **Advertising in Animal Health**, v. 8, n.2-3, p. 187-205, 2008.

LADELFA, M.F.; DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; KOTSIAS, F.; DELGADO, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S.A. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 53, n.37, p.2-8, 2011.

LEMOS, R.A.A. Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro- Oeste e Sudeste do Brasil. 149 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva). UNESP- Campus de Jaboticabal. 2005.

LISBÔA, J.A.N.; ALFIERI, A.A.; BALARIN, M.R.S.; CLAUS, M.P.; ISERNHAGEN, A.J. Aspectos clínicos e diagnóstico da encefalite causada por HVB-5 em bezerros. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BUIATRIA, 11., 2003, Salvador, BA. *Anais...* Salvador, 2003. p.19.

LISBÔA, J.A.N.; ISERNHAGEN, A.J.; BORGES, A.S.; AMORIM, R.M.; BALARIN, M.R.S.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. Hematological and Cerebrospinal Fluid Changes in Cattle Naturally and Experimentally Infected with the Bovine Herpesvirus 5. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. special, p. 69 - 76, 2009.

LOJKIC, I.; CAC, Z.; KEROS, T.; BEDEKOVIC, T.; BALATINEC, J.; ROIC, B. Phylogenetic analysis of bovine herpesvirus 1 isolated in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, v. 81, n. 3, p. 299-306, 2011.

LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; RABUSKE, M. Herpesvirus bovino tipo 1: isolamento de casos de vulvovaginite. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 16, n. 1, p.32-37, 1995.

LUNARDI, M.; CLAUS, M.P.; LISBÔA, J.A.N.; AMUDE, A.M.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Neurological and Epidemiological Aspects of BoHV-5 Meningoencephalitis Outbreak. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. special, p. 77 - 85, 2009.

MARS, M.H.; JONG, M.C.M.; MAANEN, C.; HAGE J.J.; OIRSCHOT, J.T. Airbone transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 76, n.3, p. 1-13, 2000.

MAYHEW, I.G. **Large Animal Neurology**: a handbook for veterinarians clinicians. Philadelphia : Lea e Febiger, 1989. 380p.

MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.347-350, 2000.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; FIGUEIREDO, H.C.P. Prevalência de anticorpos contra herpesvirus bovino 1, vírus da diarréia bovina a vírus e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do estado de Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.3, p.160-161, 1997.

METTENLEITER, T.C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, v.92, n.5, p.197- 206, 2003.

METZLER, A. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v.85, n.1, p.57-59, 1985.

METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v.87, n.2, p.205 - 217, 1986.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v, 146, n.2, p. 633-652, 2001.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; BELLO, J.L.; LAWRENCE, W.C. Determination of ability of a thymidine kinase negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.7, p.1038-1043, 1991.

MORETTI, B.; ORFEI, Z.; MONDINO, G.; PERSECHINO, A. Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. **Veterinaria Italiana** v. 15, n.5, p. 676 - 702, 1964.

MUYLKENS, M.; JULIEN, T.; PHILIPPE, K.; FRÉDÉRIC, S.; ETIENNE, T. Bovine

herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n.1, p. 181-291, 2007.

NAKAZATO, L. et al. Polioencefalomalácia em bovinos nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro**, v.20, n.3, p.119-125, 2000.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Review**, v. 10, n.3, p. 85-98, 2009.

NETO, H.M.; A.U. Carvalho; E.J. Facury Filho; P.M. Ferreira; E.F. Barbosa-Stancioli; Z.I.P. Lobato; M.R. Alvarenga; A.L. Serrano; R.A. Martins; D.A.F. Afonso . Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p.113-117, 2009.

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIAS, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RUSEWLJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in sêmen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n.3, p. 1139-1145, 2011.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, F.A.; E.F.FLORES; ODEON, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of Bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v.39, n.5, p.437-444, 2002.

PETRINI, S.; RAMADORI, G.; CORRADI, A.; BORGHETTI, P.; LOMBARDI, G.; VILLA, R.; BOTTARELLI, E.; GUERCIO, A.; AMICI, A.; FERRARI, M. Evaluation of safety and efficacy of DNA vaccines against bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in calves. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, v45, n.2, p.134-142, 2009.

PIEDRAHITA, L.E.; MONTOYA, L.M.; PEDRAZA, F.J. Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1) como posible causa de encefalitis en bovinos de la region del Magdalena Medio Colombiano. Estudio serológico y análisis epidemiológico. **Revista Colombiana de Ciências Pecuarias**, v.23, n.2, p. 191-198, 2010.

QUEIROZ, G.R.; RIBEIRO, R.C.L.; ROMAO, F.T.N.M.A.; FLAIBAN, K.K.M.C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; LISBOA, J.A.N.L. Intoxicação espontânea de bovinos por *Senna obtusifolia* no Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1263-1271, 2012.

QUEIROZ, G.R.; RIBEIRO, R.C.L.; FLAIBAN, K.K.M.C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; LISBOA, J.A.N.L. Intoxicação espontânea por *Crotalaria incana* em bovinos no norte do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 823-832, 2013.

RECH, R.R. et al. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro**, v.25, n.2, p.97- 105, 2005.

REBORDOSA, X.; PINOL, J.; PEREZ-PONS, J.A.; LLOBERAS, J.; NAVAL, J.; SERRA- HARTMANN, X.; ESPUNA, X.; QUEROL, E. Glycoprotein E of bovine

herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Research**, v. 45, n.3, p. 59-68, 1996.

RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A.L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n.4, p. 161-168, 2002.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; CERQUEIRA, V.D.; BRITO, M.F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e polioencefalomalácia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 44-46, 2006.

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovinos - 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.2, p.123 - 132, 2006.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M.S.; FLORES, E.F.; BARROS, C.S.L. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, n.4, p. 346-349, 2008.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.P.; OLIVEIRA-FILHO, J.C.; LUCENA, R.B.; CARMO, P.M.S.; BARROS, C.S.L. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.11, p. 958-967, 2010.

ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A. G.; LEITE, R.C. Bovine herpesvirus-1 in semen. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p.245-249, 1999.

ROCK, D.L.; REED, D.E. Persistent infection with bovine herpesvirus type 1: rabbit model, **Infection and Immunity**, v. 35, n.1, p. 371-373, 1982.

ROCK, D.L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. **Seminars in virology**, v.5, n.2, p. 233-240, 1994

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1, p. 41-44, 1997.

ROEHE, P.M.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; MELO, S.V.; ALMEIDA, R.S.; D'ARCE, R.C.F.; SILVA, T.C.; LEMOS, R.A.; OLIVEIRA, L.G. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: Simpósio Internacional sobre herpesvírus bovino (tipo 1 e 5) e vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Anais do evento. P.89-96. Santa Maria, RS. 1998.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.425-448, 1992.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSÓRIO, A.L.A.R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.2, p.76-83, 1998.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. Doenças do sistema nervosa central em bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.3, p.113-118, 2000.

SÁNCHEZ, A.; MAJELA, M.R.; HEIDY, A.A.; MARITZA, B.V. Diagnóstico virológico de Herpesvirus bovino tipo-1 (Virological diagnostic of Bovine herpesvirus type-1). *Redvet, Revista electrónica de Veterinaria*, v.9, n.3, p.71-78, 2008.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 17-19, 1996.

SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; BRUM, M.C.S.; CANTO, M.C. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.3/4, p.99-106, 1998.

SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; CANTO, M.C.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; SOUZA, R.S. Pathogenesis of meningoencephaliti in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Revista Brasileira de Microbiologia**, v.30, n.5, p. 22-31, 1999a.

SILVA, A.M.; WEIBLEN, R ; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; SUR, H.J.; OSORIO, F.A.; FLORES, E.F. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Veterinary Microbiology**, v. 66, n.2, p. 89-99, 1999b.

SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; HUBNER, S.O.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, A.P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P.M. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvírus type 5 challenge. **Vaccine**, v. 24, n.2, p. 3313 - 3320, 2006.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; LORETO, E.L.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvírus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, n. 5, p. 191-199, 2007a.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.403-408, 2007b.

SILVA-FRADE, C.; MARTINS Jr, A.; BORSANELLI,, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine Herpesvirus Type 5 on development of in vitro - produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.73, n.5, p. 324 - 331, 2010.

STEUKERS, L.; VANDEKERCKHOVE, A.P.; BROECK, W.V.; GLORIEUX, S.; NAUWYNCK, H.J. Comparative analysis of replication characteristics of BoHV-1

subtypes in bovine respiratory and genital mucosa explants: a phylogenetic enlightenment, **Veterinary Research**, v. 42, n. 33, p. 2-11, 2011.

STRAUB, O.C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, 1996.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V., ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A., SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEIN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n.1, p. 13-18, 2002.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvirus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.203-209, 2001.

TAKIUCHI, E.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (Semi-nested PCR) para detecção do herpesvirus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p. 43-56, 2003. 5

TRAESEL, C.K.; SILVA, M.S.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the 3' region of glycoprotein C gene of South American bovine herpesvirus 1 and 5. **Research in Veterinary Science**, v. 32, n. 5, p. 2-8, 2012.

VARELA, A.P.M.; HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; ANTUNES, D.A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; CENCI, A.; BRITO, W.D.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**, v.17, n.2-3, p. 234-238, 2009.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently, Experimentally Infected Calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512 - 4520, 2003.

WATT, J.A.; JONSTON, W.S.; MAC LEOD, N.S.; BARLOW, R.M.: Infectious bovine rhinotracheitis and encephalitis. **Veterinary Record**, v. 63. n. 7, p. 108, 1981.

WEIBLEN, R.; BARROS, C.S.L.; CANABARRO, T.F.: Bovine meningoencefalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v.124, n. 3, p. 666-667, 1989.

WENTINK, G.H.; VAN OIRSCHOT, J.T.; VERHOEFF, J. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV1): a review. **Veterinary Quarterly**, v.15, n.1, p.30-33, 1993.

YAN, B.F.; CHAO, Y.J.; CHEN, Z.; TIAN, K.G.; WANG, C.B.; LIN, X.M.; CHEN, H.C.; GUO, A.Z. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n.5, p. 136-141, 2008.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a prevalência das infecções latentes por herpesvírus bovino 1 e 5 em bovinos de corte criados no estado do Paraná, utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção dos genomas virais nos gânglios dos nervos trigêmeo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as prevalências de cada infecção isoladamente e das infecções mistas.
- Estudar a distribuição dessas infecções em diferentes mesorregiões geográficas do estado.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES LATENTES POR BoHV-1 E BoHV-5 EM BOVINOS DE CORTE NO ESTADO DO PARANÁ¹

Prevalence of latent infection with BoHV-1 and BoHV-5 in beef cattle of Parana, Brazil

ABSTRACT: Encephalopathy is an important group of diseases in cattle, often fatal, causing great economic losses in Brazil and worldwide. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) is an important causative agent of encephalitis in the country and 1 (BoHV-1) may eventually cause this disease. The aim of this study was to determine the prevalence of latent infection by these two viruses in beef cattle raised in the state of Paraná, Brazil. The trigeminal ganglia were collected, in a slaughterhouse with Federal Inspection Service (SIF), from 400 healthy cattle, between 18 and 36 months, raised in 90 farms located in different geographical regions of the state. The detection of nucleic acid (DNA) of each of viral agents was performed by polymerase chain reaction amplification of the gene encoding the glycoprotein C. One hundred nine (27.25%) animals were herpetic; 14.25% (57/400) were infected only with BoHV-1, 9,75% (39/400) were infected only with BoHV-5 and 3.25% (13/400) had mixed infection. The Northwest region had the highest prevalence rate for BoHV-5 (41.3%), followed by North Central (8.3%), South West (5.7%), Middle East (3.4%) and Northern Pioneer (2.2%). The frequency of infection with BoHV-1 was higher in North Central region (36.6%), followed by North West (25.9%), West (20%), Southwest (11.4%), Northern Pioneer (11.1%), Central West (7.4%) and Middle East (6.9%). Infections with herpesvirus were not detected latently infected cattle in the regions of Curitiba, Southeast and South Central. The two herpesvirus circulating in cattle herds in the state of Paraná, determining latent infection with heterogeneous geographical distribution. The BoHV-1 and BoHV-5 infections are more prevalent in the north of the state, where there is the largest beef cattle population, and are almost absent in the regions forming the southern border. The epidemiological situation is critical in the Northwest region, and surveillance for herpetic meningoencephalitis should be intensified in this region.

Index terms: Bovine herpesvirus. Diagnosis. Epidemiology. Neurological diseases.

¹ Artigo redigido conforme as normas para publicação da Pesquisa Veterinária Brasileira

RESUMO: As encefalopatias em bovinos representam um grupo de enfermidades importantes, geralmente fatais, que determinam grandes perdas econômicas no Brasil e no Mundo. O herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) é um dos principais agentes causadores de encefalite no país e o 1 (BoHV-1) pode, eventualmente, provocar a doença. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência das infecções latentes por esses dois vírus em bovinos de corte criados no estado do Paraná. Os gânglios do nervo trigêmeo foram coletados de 400 bovinos hígidos, entre 18 e 36 meses de idade, provenientes de 90 propriedades rurais localizadas em diferentes mesorregiões geográficas do estado e abatidos em frigorífico com Serviço de Inspeção Federal (SIF). A detecção do ácido nucléico (DNA) viral foi realizada por meio da reação em cadeia pela polimerase com amplificação do gene que codifica a glicoproteína C. Cento e nove bovinos eram herpéticos (27,25%), sendo 14,25% (57/400) infectados somente com BoHV-1, 9,75% (39/400) infectados somente com BoHV-5 e 3,25% (13/400) portadores de infecção mista. A mesorregião Noroeste apresentou os maiores índices de prevalência para BoHV-5 (41,3%), seguida pela Norte Central (8,3%), Sudoeste (5,7%), Centro Oriental (3,4%) e Norte Pioneiro (2,2%). A frequência de infecção por BoHV-1 foi maior na mesorregião Norte Central (36,6%), seguida pela Noroeste (25,9%), Oeste (20%), Sudoeste (11,4%), Norte Pioneiro (11,1%), Centro Ocidental (7,4%) e Centro Oriental (6,9%). Nas mesorregiões de Curitiba, Sudeste e Centro Sul não foram detectados bovinos com infecção latente. Os dois herpesvírus circulam em rebanhos bovinos no estado do Paraná, determinando infecção latente, com distribuição geográfica heterogênea. São mais prevalentes ao norte do estado, onde se concentra a maior população de bovinos de corte, e estão quase ausentes nas mesorregiões que constituem a fronteira sul. A situação epidemiológica é mais crítica na mesorregião Noroeste e a vigilância para a meningoencefalite herpética deve ser intensificada nessa região.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino. Diagnóstico. Epidemiologia. Doenças neurológicas.

4.1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) e 1 (BoHV-1) pertencem à família Hesperiviridae, subfamília Alphaherpesvirinae e gênero Varicellovirus (Mayfield et al. 1983) sendo responsáveis por perdas econômicas significativas à pecuária bovina (Nandi et al. 2009, Del Médico Zajac et al. 2010). As características da subfamília Alphaherpesvirinae são baseadas nos aspectos biológicos e genéticos, apresentando um ciclo replicativo curto (<24 h), causando intensa lise celular e estabelecendo latência em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos (Ladelfa et al. 2011).

O BoHV-5 é o agente etiológico da meningoencefalite herpética dos bovinos, acometendo animais jovens, com idades de 21 dias até 24 meses (Colodel et al. 2002, Lisboa et al. 2009) e, eventualmente, animais mais velhos com até 60

meses (Riet-Correa et al. 2006, Neto et al. 2009). Essa doença é caracterizada por apresentar índices de morbidade baixos e elevadas taxas de letalidade (Gomes et al. 2002, Rissi et al. 2006, Spilki et al. 2006). Em relação à sua distribuição geográfica, o BoHV-5 é relatado com maior frequência em países da América do Sul, como o Brasil (Rissi et al. 2008; Lisbôa et al. 2009; Azambuja et al. 2011), a Argentina (Carrilo et al. 1983) e o Uruguai (Guarino et al. 2008).

O BoHV-1 apresenta distribuição mundial e está associado a uma variedade de enfermidades, tais como doença respiratória (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina - IBR), doença sistêmica em animais neonatos, doenças reprodutivas (Vulvovaginite e Balanopostite Infecciosa Bovina - IPV e IBP) e abortamentos (Brower et al. 2008, Steukers et al. 2011). Eventualmente, a infecção pode provocar encefalite (Silva et al. 2007, Rissi et al. 2008, Batista et al. 2010). De forma geral, os vírus isolados de doenças respiratórias têm sido classificados como subtipo BoHV-1.1 e os de doenças genitais, como subtipo BoHV-1.2 (Esteves et al. 2008).

Uma característica comum a ambos os vírus é a capacidade de determinar infecção latente duradoura em seus hospedeiros, possibilitando a disseminação ocasional do agente no ambiente, após eventos que favorecem a reativação viral (Callan & Van metre 2004, Griffin et al. 2010). Os gânglios dos nervos sensoriais, que inervam os sítios primários de infecção, são os tecidos de eleição para o estabelecimento da latência, e tanto BoHV-1 quanto BoHV-5 permanecem em latência nos gânglios dos nervos trigêmeo após a infecção por via respiratória (Rock 1994, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2001, Isernhagen et al. 2011). Nas infecções genitais, frequentemente associadas ao BoHV-1, a latência ocorre nos gânglios sacrais (Henzel et al. 2008, Steukers et al. 2011).

No estado do Paraná, a infecção por herpesvírus bovino tem sido identificada, em rebanhos, por levantamentos soropidemiológicos (Médici et al. 2000, Takiuchi et al. 2001, Dias et al. 2013), e a presença de BoHV-5 foi confirmada nos casos de encefalite em bovinos (Claus et al. 2007, Lisbôa et al. 2009, Lunardi et al. 2009). Devido à grande similaridade genômica dos dois vírus (Delhon et al. 2003), ocorre intensa reatividade cruzada, impossibilitando que as infecções específicas por BoHV-1 e por BoHV-5 sejam diferenciadas por métodos sorológicos (Takiuchi et al. 2003, Holz et al. 2009). Dessa forma, a prevalência específica de cada um dos herpesvírus bovino é desconhecida no estado. O objetivo deste

trabalho foi determinar a prevalência de infecções latentes por BoHV-1 ou por BoHV-5 em bovinos de corte criados nas diferentes mesorregiões do estado do Paraná, utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção do DNA viral nos gânglios dos nervos trigêmeo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) sob o número de processo 31235.2011. Os gânglios do nervo trigêmeo (direito e esquerdo) foram colhidos de 400 bovinos de corte sadios, abatidos no Matadouro-Frigorífico Argus Ltda., com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o nº 1710 e localizado no município de São José dos Pinhais, PR, durante o período compreendido entre os meses de março e junho de 2012. Os animais eram da raça Nelore ou seus cruzamentos, machos e fêmeas, entre 18 e 36 meses de idade, e manejados extensivamente em propriedades rurais paranaenses.

Para o cálculo do número de amostras, foi considerada a prevalência esperada de 50% para as infecções pelo BoHV-1 e pelo BoHV-5, com erro de 6% e nível de significância de 5%. A fórmula para amostras simples aleatórias (Thursfiel 1995, Noordhuizen et al. 1997) foi aplicada com auxílio do programa Epi Info, versão 6.04, e é descrita a seguir:

$$n = Z_{\alpha}^2 \cdot \sqrt{P(1-P)} / d^2$$

onde: n = número de amostras necessárias; Z_{α} = valor de distribuição normal para o grau de confiança de 95%; P = prevalência esperada; d = precisão (fixada em 6%)

Para a amostragem da população bovina distribuída geograficamente pelo Estado do Paraná, foi adotado o modelo de divisão em mesorregiões, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), totalizando 10 mesorregiões geográficas: Centro Oriental, Centro Ocidental, Centro Sul, Curitiba, Noroeste, Norte Central, Norte Pioneiro, Oeste, Sudeste e Sudoeste. As informações do Senso Agropecuário de 2009 (BRASIL, 2009) foram

consideradas para a definição do efetivo total de bovinos existente em cada mesorregião. A população de bovinos leiteiros foi estimada, a partir da informação do total de vacas em lactação presente em cada mesorregião do estado (PARANÁ, 2010), considerando-se que esta categoria corresponde a 70% do total de bovinos em uma propriedade leiteira. O número de bovinos de corte de cada mesorregião foi calculado por subtração. O número de amostras de gânglios do nervo trigêmeo definido para a coleta obedeceu, finalmente, a mesma proporção do efetivo de bovinos de corte existente entre as mesorregiões geográficas paranaenses (Quadro 1).

Quadro 1 – Distribuição da população de bovinos de corte e leiteiros nas diferentes mesorregiões do estado do Paraná e o número de amostras colhidas por mesorregião

Mesorregião	População Geral de Bovinos ¹	Bovinos leiteiros ²	Bovinos de corte		Número de amostra
	n	n	n	%	
Centro Ocidental	583.015	105.881	477.134	6,56	27
Centro Oriental	661.668	142.244	519.424	7,14	29
Centro Sul	1.062.187	288.964	773.223	10,63	42
Curitiba	228.773	80.441	148.332	2,04	8
Noroeste	2.168.501	281.309	1.887.192	25,95	104
Norte Central	1.359.649	266.403	1.093.246	15,03	60
Norte Pioneiro	1.008.096	187.516	820.580	11,28	45
Oeste	1.187.351	458.580	728.771	10,02	40
Sudeste	256.093	72.216	183.877	2,52	10
Sudoeste	1.046.78	407.581	639.199	8,79	35
TOTAL	9.562.113	2.291.135	7.270.978	100	400

¹ Senso Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - BRASIL (2009).

² População estimada a partir do número total de vacas leiteiras em lactação informado no Senso Agropecuário da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná - PARANÁ (2010).

Quadro 2 – Número total de bovinos e de propriedades amostradas por municípios nas diferentes mesorregiões do estado do Paraná

<u>Mesorregião</u>	<u>Município</u>	<u>Animais</u>	<u>Propriedades</u>
Centro Ocidental	Iretama	2	1
	Luiziana	5	1
	Nova Cantú	17	3
	Roncador	3	1
Centro Oriental	Reserva	10	2
	Tibagi	19	5
Centro Sul	Guarapuava	27	6
	Laranjal	4	1
	Palmital	2	1
	Pitanga	5	1
	Porto Barreiro	2	1
Curitiba	Turvo	2	1
	Araucária	2	1
	Lapa	2	1
	São José dos Pinhais	2	2
Noroeste	Serro Azul	2	1
	Cianorte	2	1
	Paranavaí	5	2
	Planaltina	54	10
	São Pedro do Paraná	12	3
	Santa Isabel do Ivaí	14	3
	Tapejara	7	2
Norte Central	Terra Rica	10	2
	Astorga	4	1
	Borrazópolis	9	2
	Cândido de Abreu	2	1
	Faxinal	4	1
	Kaloré	1	1
	Manoel Ribas	13	2
	Nova Esperança	15	2
	Santa Fé	6	1
	Uniflor	6	1
	Norte Pioneiro	Curiúva	11
Joaquim Távora		19	4
Ribeirão Claro		11	2
Sapopema		4	1
Oeste	Boa Vista da Aparecida	4	1
	Diamante D'Oeste	13	2
	Formoso D'Oeste	11	2
	Ibema	2	1
	Matelândia	8	1
	Nova Aurora	2	1
Sudeste	Prudentópolis	8	1
	São Mateus do Sul	2	1
Sudoeste	Chopininho	11	2
	Dois Vizinhos	8	2
	Francisco Beltrão	9	2
TOTAL	Verê	7	1
	48	400	90

Os bovinos foram selecionados aleatoriamente na linha de abate, tomando-se como critérios a homogeneidade da idade, determinada por inspeção dos dentes, e a heterogeneidade da origem, considerando o município e a propriedade. Para garantir a maior abrangência geográfica possível, os animais foram provenientes de 48 municípios e eram criados em 90 propriedades rurais

distintas (Quadro 2). Foram colhidas amostras de um a, no máximo, oito bovinos de um mesmo rebanho.

O procedimento de coleta consistiu na remoção do encéfalo após a abertura do crânio com auxílio de serra elétrica, seguida por identificação e dissecação do conjunto composto pelos gânglios do nervo trigêmeo (direito e esquerdo), pela rete mirabile carotídea e pela hipófise. Para evitar a transferência acidental de DNA viral entre as amostras, empregou-se material cirúrgico (pinça dente de rato e cabo de bisturi) desinfetado com solução de hipoclorito de sódio a 10% (concentração de 1.000 ppm de cloro ativo), e trocou-se a lâmina do bisturi para a coleta de cada animal. O par de gânglios de cada indivíduo foi acondicionado em saco plástico identificado. Todo o material foi transportado em caixas térmicas, sob refrigeração. As amostras foram mantidas a - 80°C até o processamento.

As amostras foram processadas em cabine de segurança biológica utilizando-se material estéril. A sequência das amostras nos lotes de processamento foi aleatória para evitar que indivíduos de uma mesma mesorregião fossem analisados em conjunto ou muito próximos. Os gânglios do nervo trigêmeo (direito e esquerdo) de cada bovino foram processados em conjunto, gerando amostra única por indivíduo. Aproximadamente 0,5g do tecido foram acondicionados em microtubos plásticos estéreis com capacidade de 2 mL, contendo 1 mL de solução fosfato salina tamponada (PBS; pH 7,2). Após agitação, adicionaram-se, ao tubo, 50 uL de solução SDS 1% e 10 uL de proteinase K com concentração de 0,2 mg/mL (Invitrogen™, Life Technologies, USA), e realizou-se incubação à temperatura de 56°C por 1 h. Posteriormente, o tubo foi novamente agitado e submetido a centrifugação (10.000 x g durante 10 min). Alíquotas de 500 uL do sobrenadante foram utilizadas para a extração do ácido nucléico, empregando-se a combinação dos métodos fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Sambrook; Russel, 2001) e sílica/isotiocianato de guanidina (Boom et al. 1990) com modificações descritas por Alfieri et al. (2006). O DNA viral foi ressuspendido com 50 uL de água ultrapura estéril (MilliQ®) e mantido à temperatura de -20°C.

O DNA extraído foi submetido à PCR com modificações realizadas no método descrito por CLAUS et al. (2005), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (primers) desenhados com base na sequência do gene que codifica a glicoproteína C do envelope viral. Para a detecção de BoHV-1 realizou-se a primeira PCR

empregando-se o par de primers B1, específico para BoHV-1 ([5'-CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC- 3'], nt 185-204), e Bcon, primer consensual para BoHV-1 e para BoHV-5 ([5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG- 3'], nt 519-538 [BoHV-1] e nt 461-480 [BoHV-5]). A segunda PCR foi realizada para a detecção de BoHV-5, utilizando, novamente, o primer consensual Bcon em associação com o primer B5, específico para BoHV-5 ([5'-CGG ACG AGA AGC CCT TGG- 3'], nt 322-339). Os pares de primers utilizados resultaram na amplificação de um fragmento com 354 pares de base (pb) para o BoHV-1 e 159 pb para o BoHV-5.

A PCR foi realizada separadamente para cada vírus, utilizando 5 uL do DNA extraído e 45 uL de mix, constituído por 20 pmol de cada primer (B1 e Bcon) ou (B5 e Bcon); 2,0 mM de dNTP (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 5 Unidades de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1x PCR buffer (50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl pH 8,4); 1,5 mM MgCl₂; 8% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Co.,USA) e água ultrapura estéril para completar o volume. A amplificação foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research Co.,USA), sob as seguintes condições de tempo e temperatura: 94°C por 3 min; seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min; 58°C por 30 s; 72°C por 1 min e uma extensão final de 7 min a 72°C.

Os produtos amplificados na PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, tampão TBE com pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) e voltagem constante (100 V) por aproximadamente 45 min; corados com brometo de etídeo (0,5 ug/mL) e visualizados sob luz ultravioleta.

Controles positivo e negativo foram utilizados a cada conjunto de nove amostras testadas, como indicadores da acurácia diagnóstica. Os protótipos utilizados como controle positivo foram: cepa Los Angeles para BoHV-1 e cepa AA 01 para BoHV-5 (D'Arce et al. 2002). A PBS foi empregada como controle negativo.

Medidas para evitar a possibilidade de contaminação acidental com DNA viral entre as amostras foram adotadas rigorosamente, incluindo a utilização de soluções e reagentes exclusivos para o estudo e a execução dos processos de extração, de preparo do mix, de PCR e de análise dos produtos gerados em áreas separadas do laboratório, obrigatoriamente.

A qualidade do procedimento de extração foi avaliada através da utilização de um controle da extração, baseado no gene ND5 do DNA mitocondrial

bovino (GenBank, número de acesso NC 001567). Os primers utilizados foram BOV1 (5'-ATA CGC CTT CAT TAC CAG-3' nt 12.231-12.248) e BOV2 (5'-TTG AAT GGA GTA GTG CTG-3' nt 12.8565-12.839), gerando um fragmento com 626 pb. A cada 50 amostras com resultado negativo, nove foram escolhidas, de forma aleatória, e processadas com o controle da reação.

Produtos obtidos na PCR para BoHV-1 (n=2) e para BoHV-5 (n=1) foram submetidos aos procedimentos de sequenciamento e de análise filogenética, com a finalidade de confirmar a especificidade do produto amplificado. Os produtos da PCR selecionados foram purificados utilizando o Kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare, Little Chalfont UK), quantificados utilizando o Kit Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, USA) e sequenciados utilizando a plataforma ABI3500 Genetic Analyser com o Kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, USA), usando os primers senso e anti-senso.

As sequências obtidas e o conjunto de sobreposições do DNA gerados foram analisados com auxílio dos programas computacionais Phred e CAP3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e somente bases com qualidade maior ou igual a 20 foram consideradas. As sequências foram confrontadas por meio do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar a identidade das sequências analisadas. O alinhamento múltiplo e pareado foi realizado no CLUSTAL W (versão 1.4), com auxílio do programa MEGA (versão 4.1) e a matriz identidade foi realizada utilizando o BioEdit (versão 7.0.9.0). A árvore filogenética foi obtida por meio do método de neighbor-joining utilizando o modelo de Kimura-two-parameter e empregando o programa MEGA (versão 4.1). Os valores foram estatisticamente suportados utilizando um bootstrap de 1000 replicações. As sequências de referência utilizadas neste estudo foram obtidas na base pública de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

Foram estabelecidas as distribuições de frequência das infecções latentes, simples (por cada herpesvírus individualmente) e mistas, globais e em cada mesorregião geográfica do estado do Paraná. O teste de Qui-quadrado foi empregado para verificar diferenças entre as proporções dos tipos de infecção latente (simples e mista) e entre as prevalências nas mesorregiões geográficas.

4.3 RESULTADOS

A infecção latente por herpesvírus foi confirmada em 109 dos 400 bovinos estudados (Quadro 3). Em 291 bovinos (72,75%) não foi possível detectar presença de genoma viral nos gânglios dos nervos trigêmeo. As infecções específicas por BoHV-1 ou por BoHV-5 não foram detectadas em 330 (82,5%) e 348 (87,0%) bovinos, respectivamente. As infecções simples, por BoHV-1 ou por BoHV-5, apresentaram-se com prevalências que não diferiram entre si ($p>0,05$), e foram mais frequentes do que a infecção mista ($p<0,001$). O número de bovinos que apresentava infecção mista representou 3,25% do total.

Considerando somente os bovinos infectados, 52,3% (57/109) albergavam exclusivamente BoHV-1, 35,8% (39/109) estavam infectados especificamente por BoHV-5 e 11,9% (13/109) eram portadores de ambos os vírus. Assim como já mencionado para as prevalências globais, as frequências das infecções simples não diferiram entre si ($p>0,05$) e foram maiores do que a de infecção mista ($p<0,001$).

As infecções latentes por herpesvírus foram confirmadas em 47,8% (43/90) dos rebanhos amostrados. Em 17 rebanhos (18,9%) havia infecção somente com BoHV-1, e em 8 rebanhos (8,9%), somente com BoHV-5. A presença simultânea de ambos os vírus circulando no mesmo rebanho foi confirmada em 18 propriedades (20%), sendo a infecção mista observada em 8 (8,9%), enquanto as infecções simples em animais diferentes ocorreram nas demais 10 (11,1%).

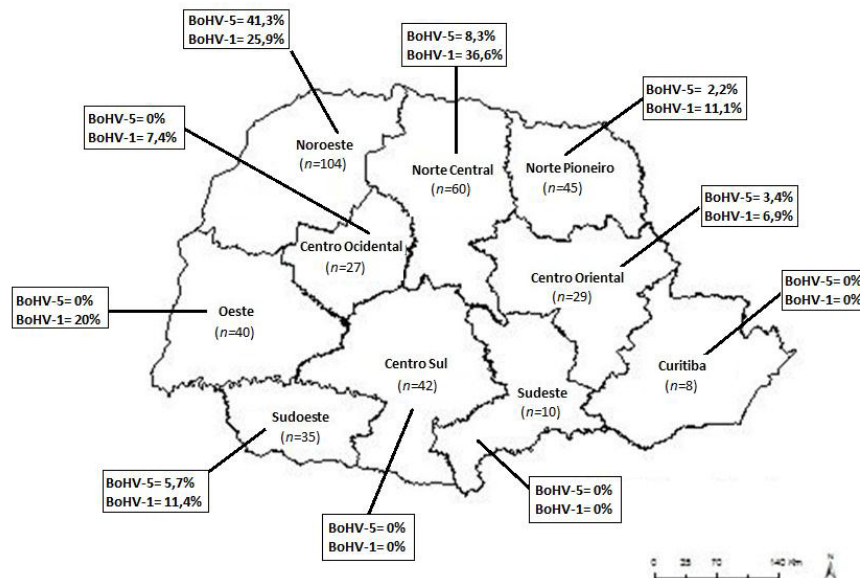
Quadro 3 – Infecções latentes, simples e mistas, por BoHV-1 e BoHV-5 confirmadas nos gânglios do nervo trigêmeo de bovinos de corte sadios (n=400) criados e abatidos no estado do Paraná

Tipo de infecção	n	%
BoHV-1	57	14,25
BoHV-5	39	9,75
BoHV1 + BoHV-5	13	3,25
TOTAL	109	27,25

As infecções por BoHV-1 ou por BoHV-5 não se apresentaram com distribuição geográfica uniforme no estado do Paraná (Fig. 1) e as prevalências

variaram entre as mesorregiões ($p < 0,001$). A infecção latente por BoHV-1 foi observada em sete das dez mesorregiões geográficas, com exceção das mesorregiões de Curitiba, Sudeste e Centro Sul. Essas mesorregiões apresentam localização mais ao sul do estado e são contíguas entre si. O número de amostras colhidas nas mesorregiões de Curitiba ($n=8$) e Sudeste ($n=10$) foi reduzido porque a população de bovinos de corte não é numerosa (Quadro 1). O mesmo não pode ser afirmado na mesorregião Centro Sul, que originou 10% de todas as amostras colhidas para o estudo. Nas mesorregiões em que a infecção foi comprovada, a prevalência variou consideravelmente, de 6,9% até 36,6%.

Figura 1 – Prevalência dos herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e do 5 (BoHV-5) nas diferentes mesorregiões do Estado do Paraná. Fonte: BRASIL, 2009



Em comparação à infecção por BoHV-1, a por BoHV-5 distribuiu-se de forma menos uniforme pelo estado e foi confirmada em somente metade das mesorregiões, concentrando-se naquelas localizadas mais ao norte. Dentre as que constituem a fronteira sul do estado, a infecção foi confirmada apenas na mesorregião Sudoeste. As prevalências variaram com valores reduzidos (2,2% a 5,7%), exceto nas mesorregiões Norte Central e Noroeste. Nessa última mesorregião, quase a metade dos bovinos amostrados (41,3%) albergava o agente na sua forma de latência.

A amplificação do DNA mitocondrial bovino, utilizada nesse estudo como controle interno para avaliação da qualidade do procedimento de extração de

DNA das amostras, foi bem sucedida em todos os casos. Nas amostras em que o genoma do herpesvírus não foi detectado, o fragmento composto por 626 pb, esperado como produto oriundo do controle interno, foi amplificado com sucesso.

Os resultados da árvore filogenética e da matriz de identidade de nucleotídeos comprovaram a presença de BoHV-1 ou de BoHV-5 nas três amostras selecionadas para o procedimento. Os amplicons sequenciados foram comparados com sequências da glicoproteína C disponíveis na base pública de dados (GenBank). Com relação ao BoHV-1, dos 303 (267-609) nucleotídeos analisados, as amostras UEL 7 e UEL 323 apresentaram, respectivamente, 99,7% e 99,4% de identidade de nucleotídeos com as sequências NM06 e SV-56/90, disponíveis no GenBank. As amostras avaliadas apresentam, entre si, 99,7% de identidade de nucleotídeos. Quanto ao BoHV-5, dos 210 (410-619) nucleotídeos analisados, a amostra UEL 237 apresentou 99,3% de identidade de nucleotídeos com as sequências EVI- 190, U35883 e Z49224.

4.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A infecção por herpesvírus bovino em rebanhos brasileiros vem sendo comprovada, nas últimas três décadas, por meio de levantamentos soropidemiológicos, os quais empregaram, na maior parte das vezes, a técnica de vírusneutralização. Levantamentos realizados no Rio Grande do Sul (Holz et al. 2009), São Paulo (Pituco et al. 1993, Richtzenhain et al. 1999) e Mato Grosso do Sul (Richtzenhain et al. 1999, Takiuchi et al. 2001) apontaram prevalência de animais positivos sempre maior do que 29%. No estado do Paraná, prevalências de 43,7% (Médici et al. 2000), 52,4% (Takiuchi et al. 2001) e 59% (Dias et al. 2013) vêm sendo comprovadas. O estudo de maior abrangência e de amostragem sistematizada foi realizado, recentemente, nesse estado e envolveu o exame de 14.803 fêmeas em atividade reprodutiva (acima de 24 meses de idade), de corte e de leite, não vacinadas contra o herpesvírus e pertencentes a 2.018 propriedades rurais localizadas em sete diferentes regiões geográficas, definidas como circuitos agropecuários (Dias et al. 2013). Prevalências globais de 83,3% e de 71,5% foram observadas nas fêmeas de corte e leiteiras, respectivamente, e animais sororreagentes foram encontrados em 71,1% dos rebanhos de corte e em 45,9%

dos rebanhos leiteiros, localizados em todas as regiões do estado, o que indica a ampla disseminação da infecção.

Apesar da importância desses levantamentos ser inquestionável como indicadores da presença e da distribuição da infecção por herpesvírus na população bovina, eles apresentam, como limitação, a impossibilidade de determinar que espécie do vírus está causando a infecção. Em todos esses estudos foi admitido que se tratava da infecção por BoHV-1. Entretanto, não é possível saber quantos dos animais positivos eram, de fato, infectados por BoHV-5, ao invés de por BoHV-1. Os dois vírus apresentam semelhanças genômicas e antigênicas o que determina que a reação cruzada seja intensa entre ambos (Delhon et al. 2003). Os métodos sorológicos são incapazes, portanto, de detectar anticorpos específicos para cada vírus (Holz et al. 2009, Varela et al. 2009). O mais correto seria assumir que todos esses estudos soropidemiológicos apontaram a ocorrência de infecção por herpesvírus bovino e não, verdadeiramente, específica por BoHV-1.

Casos naturais de encefalite em bovinos causada por BoHV-5 já foram confirmados em diferentes estados brasileiros, tais como Rio Grande do Sul (Weiblen et al. 1989, Elias et al. 2004, Rissi et al. 2006, 2008), Mato Grosso do Sul (Salvador et al. 1998, Claus et al. 2007), São Paulo (Salvador et al. 1998, Gomes et al. 2002, Ferrari et al. 2007, Lisbôa et al. 2009), Minas Gerais (Gomes et al. 2002, Neto et al. 2009), Mato Grosso (Colodel et al. 2002) e Pará (Riet-Correa et al. 2006). No Paraná, a doença também ocorre (Claus et al. 2007, Lunardi et al. 2009, Lisbôa et al. 2009) e deve ser considerada, depois da raiva, a principal causa de encefalite em bovinos (Azambuja et al. 2011). Apesar de reconhecida como importante, em virtude dos relatos de doença, a infecção por BoHV-5 na população bovina nunca havia sido determinada até o estudo de Campos et al. (2009). Realizado no Rio Grande do Sul, o trabalho consistiu na detecção da presença dos genomas de BoHV-5 e de BoHV-1 por meio da PCR, nos gânglios do nervo trigêmeo de bovinos de corte sadios criados e abatidos no sul do estado. A infecção latente com herpesvírus bovino foi confirmada em 87% dos bovinos, sendo 6,9% infectados exclusivamente com BoHV-1 e 17,2% infectados exclusivamente com BoHV-5. A infecção mista estava presente na maioria dos animais (75,9%).

Seguindo a mesma linha de investigação, o estudo aqui apresentado é o segundo levantamento realizado no Brasil com determinação das prevalências

das infecções específicas por cada um dos herpesvírus bovino, e o primeiro realizado no estado do Paraná. Distintamente do estudo de Campos et al. (2009), envolveu o dobro do número de bovinos e investigou a distribuição das infecções latentes nas diferentes mesorregiões geográficas do estado. Os resultados obtidos nos dois estados são distintos, sendo o índice de prevalência observado no Rio Grande do Sul muito mais alto do que o do Paraná. São diferentes, sobretudo, com relação à taxa de infecção mista. A maioria dos bovinos sulriograndenses infectados albergava os dois tipos de vírus simultaneamente. Essa condição foi observada em somente 11,9% dos bovinos paranaenses infectados.

As discrepâncias entre os resultados obtidos nos dois estudos podem ser devido a algumas diferenças metodológicas. Os bovinos do Paraná eram, pelo menos, um ano mais jovens e isso poderia significar que tiveram menor chance de se infectar ao longo da vida. Embora nas duas situações os animais fossem mantidos em regime de manejo extensivo, todos os bovinos paranaenses eram Nelore ou cruzamentos com essa raça, e isso difere do padrão racial criado no Rio Grande do Sul, onde predominam indivíduos das raças europeias. É desconhecido que taurinos sejam mais susceptíveis do que os zebuínos, a se infectarem com o herpesvírus bovino, e não há evidências que sustentem essa hipótese. Conforme demonstrado em estudos de soroprevalência realizados no Paraná, a frequência de animais sororreagentes pode ser, até mesmo, maior nos rebanhos de corte do que nos de leite (Médici et al. 2000; Dias et al. 2013). A ocorrência da meningoencefalite herpética comumente envolve bovinos de corte jovens, manejados extensivamente, afetando tanto taurinos (Weiblen et al. 1989, Elias et al. 2004, Lunardi et al. 2009, Neto et al. 2009), quanto zebuínos (Salvador et al. 1998, Riet-Correa et al. 2006, Lisbôa et al. 2009), sem distinção aparente.

Parece pouco provável que os dois aspectos mencionados possam justificar a diferença entre os resultados nos dois estados. É mais coerente atribuí-la à diferença de sensibilidade entre os métodos utilizados para a identificação da presença do genoma viral. Ao contrário do protocolo adotado no presente trabalho, Campos et al. (2009) realizaram duas ampliações de PCR seguidas, com o propósito de aumentar a sensibilidade do teste. Isso é relevante quando se considera que as amostras foram colhidas de animais saudáveis que, se infectados, seriam portadores assintomáticos, albergando o vírus na sua forma latente. Devido à

ausência de replicação do vírus nessa condição, o número de cópias do genoma viral pode ser baixo e variável entre os indivíduos hospedeiros. Conforme evidenciado pelos autores citados, o número de genomas de herpesvírus bovino variou entre 25 e 200 cópias em 50.000 células de gânglio do nervo trigêmeo. Isso aumenta a chance de ocorrerem resultados falso negativos, uma vez que alguns gânglios podem apresentar material genético viral em quantidade inferior à que seria detectável pela PCR.

Os gânglios do nervo trigêmeo foram o tecido selecionado para a avaliação das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5. Os gânglios sensoriais de nervos que inervam a região onde ocorreu a infecção primária são o sítio de latência desses vírus no organismo do hospedeiro (Nandi et al. 2009). Após a infecção por via respiratória, tanto a latência de BoHV-1 (Belknap et al. 1994, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002) quanto a de BoHV-5 (Meyer et al. 2001, Vogel et al. 2003, Isernhagen et al. 2011) se estabelecem nos gânglios do nervo trigêmeo. No caso de BoHV-1, após a infecção genital, os gânglios sacrais (podendo, genitofemoral, reto caudal e obturador) seriam os tecidos de eleição para a latência (Henzel et al. 2008, Steukers et al. 2011). Isso poderia ser apontado como causa possível de falha na detecção da presença de BoHV-1, no presente trabalho. Contudo, deve ser destacado que os animais estudados foram criados com a finalidade de abate e foram abatidos jovens, antes de entrarem em atividade reprodutiva. A via de infecção genital é, portanto, pouco provável nessas condições.

Quanto à distribuição geográfica das infecções latentes no Paraná, é relevante a prevalência observada nas três mesorregiões que constituem a fronteira norte do estado, compreendendo a Noroeste, a Norte Central e a Norte Pioneiro (Fig. 1). Essas regiões concentram a metade (52,3%) da população de bovinos de corte do estado (Quadro 1), caracterizando-se pela presença de propriedades com maior extensão e número elevado de animais (Dias et al. 2013). A situação mostrou-se particularmente crítica na mesorregião Noroeste, tradicionalmente reconhecida pela atividade de pecuária de corte. Nessa mesorregião, a maior parte dos rebanhos amostrados apresentou bovinos infectados (86,9%; 20/23), a infecção por BoHV-5 exibiu frequência muito elevada (41,3%) (Fig. 1), e houve a concentração de quase todos os casos de infecções mistas (12/13), observadas em sete dos 23 rebanhos. A divisa com os estados de São Paulo (as três mesorregiões) e do Mato Grosso do Sul

(a mesorregião Noroeste) possibilita a movimentação de animais entre os estados e pode favorecer a disseminação e o compartilhamento dessas infecções. De fato, comparando-se os levantamentos soropidemiológicos realizados nos três estados (Pituco et al. 1993, Richtzenhain et al. 1999, Takiuchi et al. 2001, Dias et al. 2013), a situação da infecção por herpesvírus bovino parece ser semelhante.

No triênio compreendido entre 2009 e 2011, a raiva foi confirmada em 36,8% dos bovinos paranaenses acometidos por doença neurológica cujo material do encéfalo foi encaminhado para diagnóstico, comprovando-se como a principal causa de encefalopatia nessa espécie (Wesgueber et al. 2012). Ao contrário de outros locais do estado, a ocorrência da doença foi muito pequena na mesorregião Noroeste (2,4% de todos os casos de raiva no período) e isso se deve à reduzida população de morcegos hematófagos presentes na região. Uma vez que a raiva não parece ter importância epidemiológica e que a frequência de infecção com BoHV-5 provou-se tão elevada, é coerente afirmar que a suspeita de encefalite herpética deve ser sempre considerada como uma das primeiras hipóteses na lista de diagnósticos diferenciais para as doenças neurológicas de bovinos criados nessa mesorregião.

Nas mesorregiões que compreendem a fronteira sul do estado, exceto a Sudoeste, a situação foi a inversa da observada ao norte e as infecções investigadas não foram detectadas em nenhum dos bovinos selecionados (Fig. 1). Nas mesorregiões de Curitiba e Sudeste o rebanho de corte não é numeroso e o pequeno número de amostras colhidas poderia ser apontado como causa da ausência de detecção da infecção. Na mesorregião Centro Sul, entretanto, o número de bovinos estudados não foi reduzido (representando 10,5% de todas as amostras colhidas) e as amostras foram provenientes de 11 rebanhos (12,2% do total) criados em seis municípios diferentes (12,5% do total). Ainda assim, o resultado se repetiu, confirmando a ausência de infecção com herpesvírus bovino. É difícil justificar a diversidade geográfica observada na distribuição das infecções pelo estado do Paraná. Ainda que seja mais intenso na fronteira norte, o trânsito de bovinos oriundos dos estados de SP e do MS também ocorre para as mesorregiões localizadas ao sul do estado. Embora o intercâmbio de bovinos entre o Paraná e Santa Catarina possa ser mais provável nas mesorregiões localizadas ao sul, a prevalência da infecção com herpesvírus bovino é desconhecida no último estado, o

que não auxilia na interpretação dos resultados. Finalmente, o deslocamento de bovinos de corte dentro do estado do Paraná ocorre frequentemente, o que deveria garantir a distribuição mais homogênea das infecções por herpesvírus.

Confrontando-se os resultados obtidos com os observados por Dias et al. (2013), em seu levantamento de prevalência de anticorpos séricos contra herpesvírus bovino em animais paranaenses, alguns aspectos devem ser mencionados. Ao contrário do presente trabalho, bovinos sororreagentes foram identificados em todas as regiões do estado. Entretanto, os índices de prevalência também foram mais elevados ao norte (60,2 a 71,1%) do que ao sul (45,9 a 54,9%). Considerando somente os rebanhos de corte, 83,9 a 98,5% dos localizados ao norte, e 58,8 a 93,7% daqueles localizados ao sul, possuíam animais sororreagentes. Um ponto de diferença importante que pode justificar as discrepâncias entre as prevalências dos dois estudos é a idade dos animais selecionados. Dias et al. (2003) colheram amostras exclusivamente de fêmeas bovinas com idade superior a 24 meses e mantidas em atividade de reprodução nos rebanhos, tanto de corte quanto de leite. Comparadas aos bovinos do presente trabalho, as vacas e as novilhas tiveram, portanto, maior chance de se infectar ao longo da vida. Não só a idade mais avançada pode contribuir para isso, mas também a possibilidade da transmissão da infecção por via venérea, mesmo no caso de BoHV-5 (Frade et al. 2010, Oliveira et al. 2011, Rodriguez et al. 2012).

Nas condições em que se desenvolveu esse estudo não foi possível colher amostras de sangue dos bovinos selecionados. A verificação da presença de anticorpos séricos contra herpesvírus bovino em cada indivíduo e a sua correlação com a presença ou não de infecção latente nos gânglios dos nervos trigêmeo poderia trazer informação adicional para a interpretação dos resultados. Entretanto, conforme observado por Campos et al. (2009), os resultados dos dois tipos de exames não são obrigatoriamente concordantes. Enquanto a grande maioria dos bovinos (87%) era infectada por BoHV-1 e/ou por BoHV-5 na sua forma latente, somente 49,5% dos animais possuíam títulos de anticorpos neutralizantes. Na região de origem desses bovinos, ao sul do RS, a prevalência de fêmeas bovinas sororreagentes também se comprovou relativamente baixa (28,1% e 32,5% nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do estado, respectivamente) em levantamento

contemporâneo (Holz et al. 2009). Isso reforça a discordância entre os resultados e reafirma a dificuldade de interpretação conjunta dos mesmos.

Independente das divergências mencionadas, o somatório dos resultados, do presente estudo e do levantamento soropidemiológico mais recente (Dias et al. 2013), é prova incontestável de que a infecção com herpesvírus bovino está disseminada nos rebanhos paranaenses, em especial na situação mais ao norte do estado. Medidas preventivas racionais devem ser implantadas de acordo com a situação de prevalência encontrada regionalmente. Nas regiões em que se apresentaram os maiores índices de infecção, localizadas principalmente ao norte, a adoção de planejamento vacinal seria ideal para o controle desses agentes. Naquelas em que a prevalência foi mais baixa, a identificação e o descarte de animais positivos no rebanho constitui a melhor medida sanitária a ser adotada (Ackermann & Engels 2006). Particularmente na mesorregião Noroeste, o controle da disseminação de BoHV-5 é necessário e o uso de vacinas que contenham antígenos exclusivos de BoHV-1 pode (Vogel et al. 2002) ou não (Silva et al. 2006) produzir o melhor resultado esperado.

Esse é o primeiro estudo realizado que determinou a prevalência da infecção latente por BoHV-1 e/ou por BoHV-5 em bovinos no estado do Paraná. A distribuição nas diferentes mesorregiões geográficas e a identificação do tipo específico de herpesvírus bovino envolvido foram demonstradas na população de bovinos de corte. Essas informações se somam às descritas anteriormente no Rio Grande do Sul como os dois únicos levantamentos epidemiológicos dessa natureza disponíveis no Brasil. As duas infecções ocorrem em rebanhos do estado do Paraná e possuem distribuição geográfica heterogênea. São mais prevalentes ao norte do estado, onde se concentra a maior população de bovinos de corte, e estão quase ausentes nas mesorregiões que constituem a fronteira sul. A situação epidemiológica é mais crítica na mesorregião Noroeste e a vigilância para a meningoencefalite herpética provocada por BoHV-5 deve ser intensificada na mesma.

4.5 REFERÊNCIAS

Ackermann M. e Engels M. 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Micro.* 113:293-302.

Alfieri A. A., Parazzi M. E., Takiuchi E., Médici K. C. e Alfieri A. F. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds. *Trop. Anim. Health Prod.* 38:521-526

Azambuja R.O., Queiroz G.R., Ribeiro R.C.L., Pereira P.F.V., Romão F.T.N.M.A., Flaiban K.K.M.C., Balarin M.R.S., Netto D.P., Di Santis G.W., Reis A.C.F., Bracarense A.P.F.R.L., Alfieri A.A. e Lisboa J.A.N. 2011. Prevalência das doenças neurológicas em bovinos no estado do Paraná. Encontro nacional de defesa sanitária animal Endesa, São Paulo, SP, p.63.

Batista H.B.C.R., Schimdt E., Spilki F.R., Franco A.C. e Roehe P.P. 2010. Herpesvirus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 62:1023-1028.

Belknap E.B., Collins J.K., Ayers K. e Schultheiss P.C. 1994. Experimental Infection of Neonatal Calves with Neurovirulent Bovine Herpesvirus Type 1.3. *Vet. Pathol.* 31:358-365.

Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., e Noordaa J. van der. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Micro.* 28:495-503.

Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: Junho de 2011.

Brower A., Homb K.H., Bochsler P., Porter R., Woods K., Ubl S., Krueger D., Cigel F. e Kurth K.T. 2008. Encephalitis in aborted bovine fetuses associated with bovine herpesvirus 1 infection. *J. Vet. Invest.* 20:297-303.

Callan R. J. e Van Metre D. C. 2004. Viral diseases of the ruminant nervous system. *North Amer. Food Ani. Prac.* 20:327-362.

Campos F.S., Franco A.C., Hubner S.O., Oliveira M.T., Silva A.D., Esteves P.A., Roehe P.M. e Rijsewijk F.A.M. 2009. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet. Micro.* 139:67 - 73.

Carrillo B.J., Ambrogi A., Schudel A.A., Vazquez M., Dahme E. e Pospischil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentra. fur Vet. Reihe B.* 30:327-332.

Claus M.O., Alfieri A.F., Folgueras-Flatschart A.V., Wosiacki S.R., Médici K.C. e Alfieri A.A. 2005. Detecção rápida e diferenciação de herpesvirus bovino 1 e 5 de genes da glicoproteína C em amostras clínicas por PCR-multiplex. *J. Virol. Met.* 128:183-188.

Claus M.P., Alfieri A.F., Médici K.C., Lunardi M. e Alfieri A.A. 2007. Bovine herpesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and Multiplex-PCR in central nervous system from cattle with neurological disease in Brazilian herds. *Braz. J. Micro.* 38:485-490.

- Colodel E.M., Nakazato L., Weiblen R., Mello R.M., Silva R.R.P., Souza M.A., Filho J.A.O. e Caron L. 2002. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. *Ciênc. Rural*. 32:293-298.
- D'arce, R.C.F., Almeida, R.S., Silva, T.C., Franco, A.C., Spilki, F., Roehe, P.M. e Arns, C.W. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet. Micro*. 88:315 - 324.
- Del Médico Zajac M.P., Ladelfa M.F., Kotsias F., Muylkens B., Thiry J., Thiry E. e Romera S. 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *The Vet. J*. 184:138 - 145.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F. e Rock D.L. 2003. Genome of Bovine Herpesvirus 5. *J. Virol*. 77:10339 - 10347.
- Dias J.A., Alfieri A.A., Ferreira-Neto J.S., Gonçalves V.S.P. e Muller E.E. 2013. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná , Brazil. *Transb. Emer. Disea*. 60:39 - 47.
- Elias F., Schild A.L. e Riet-correa F. 2004. Meningoencefalite e encefalomalácia por herpesvirus bovino - 5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesq. Vet. Bras*. 24:123-131.
- Esteves P.A., Dellagostin O.A., Pinto L.S., Silva A.D., Spilki F.R., Ciacci-Zanella J.R., Hubner S.O., Puentes R., Maisonnave J., Franco A.C., Rijsewijk F.A.M., Batista H.B.C.R., Teixeira T.F., Dezen D., Oliveira A.P., David C., Arns C.W. & Roehe P.M. 2008. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (AS). *Virus Res*. 131:16-22.
- Ferrari H.F., Luvizotto M.C.R., Rahal P. e Cardoso T.C. 2007. Detecção de herpesvirus bovino tipo 5 em fixadas em formalina, embebidos em parafina cérebro bovino por PCR: um coadjuvante útil para o teste do tecido com base em diagnóstico convencional de encefalite bovina. *J. Virol*. 146:335-340.
- Frade C., Martins Jr A., Borsanelli A.C. e Cardoso T.C. 2010. Effects of bovine Herpesvirus Type 5 on development of in vitro - produced bovine embryos. *Theriog*. 73:324 - 331.
- Guarino H. 2008. Prevalência de anticorpos para herpesvirus bovino-1 e virus Diarreia Viral Bovina em bovinos de corte no Uruguai. *Vet. Med*. 85:34-40.
- Gomes L.I., Rocha M.A., Costa E.A., Lobato Z.I.P., Mendes L.C.N., Borges A.S., Leite R.C. e Barbosa-Stancioli E.F. 2002. Detecção de herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 54:217-220.
- Griffin, B.D., Vermeij, M C. e Wiert, E.J. 2010. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. *Vet. Micro*. 143:89-100.
- Henzel A., Diel D.G., Arenhar S., Vogel F.S.F., Weiblen R. e Flores E.F. 2008. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvirus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas. *Pesq. Vet. Bras*. 28:140-148.

- Holz C.L., Cibulski S.P., Teixeira T.F., Batista H.B.C.R., Campos F.S., Silva J.R., Varela A.P.M., Cenci A., Franco A.C. e Roehe P.M. 2009. Soroprevalência de herpesvirus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 29:767 - 773.
- Isernhagen A.J., Cosenza M., Costa M.C., Médici K.C., Balarin M.R.S., Bracarense A.P.F.R.L., Alfieri A.A. e Lisbôa J.A.N. 2011. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. *Canadian Veterinary Journal.* 52:1313- 1318.
- Ladelfa M.F., Del Médico Zajac M.P., Kotsias F., Delgado F., Muylkens B., Thiry J., Thiry E. e Romera S.A. 2011. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. *Acta Vet. Scand.* 53:2-8.
- Lisbôa J.A.N., Isernhagen A.J., Borges A.S., Amorim R.M., Balarin M.R.S., Lunardi M. e Alfieri A.A. 2009. Hematological and Cerebrospinal Fluid Changes in Cattle Naturally and Experimentally Infected with the Bovine Herpesvirus 5. *Braz. Arch. Biology Tech.* 52:69- 76.
- Lunardi M., Claus M.P., Lisbôa J.A.N., Amude A.M., Headley S.A., Alfieri A.F. e Alfieri A.A. 2009. Neurological and Epidemiological Aspects of BoHV-5 Meningoencephalitis Outbreak. *Braz. Arch. Biology Tech.* 52:77 - 85.
- Mayfield J., Good P.J., Van Oort H., Campbell A. e Reed D. 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.* 47:259-264.
- Médici K.C., Alfieri A.A. e Alfieri A.F. 2000. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvirus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Cienc. Rural.* 30:347-350.
- Meyer G., Lemaire M., Ros C., Belak K., Gabriel A., Cassart D., Coignoul F., Belak S. e Thiry E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.* 146:633-652.
- Nandi S., Kumar M., Manohar M. e Chauhan R.S. 2009. Bovine herpes vírus infections in cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 10:85-98.
- Neto H.M., Carvalho A.U., Facury Filho E.J., Ferreira P.M., Barbosa-Stancioli E.F., Lobato Z.I.P., Alvarenga M.R., Serrano A.L., Martins R.A. e Afonso D.A.F. 2009. Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:87-90.
- Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M. e Graat E.A.M. 1997. *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology.* Wageningen. Press. 445.
- Oliveira M.T., Campos F.S., Dias F.A., Freneau G.E., Brito W.M.E.D., Rijsewijk F.A.M., Franco A.C. e Roehe P.M. 2011. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in sêmen from Brazilian bulls. *Theriog.* 75:1139-1145.

Paraná, 2010. Secretaria do Estado da Agricultura e Abasteciment. Departamento de Fiscalização. Censo Agropecuário do estado do Paraná.

Perez S.E., Bretschneider G., Leunda M.R., Osorio F.A., Flores E.F. e Odeon A.C. 2002. Primary infection, latency, and reactivation of Bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.* 39:437-444.

Pituco E.M., DE Stefano E., Passos E.C., Mavridis S.C., Consales, C.A. Diagnóstico sorológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)/ Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) no período de 1988 a 1992. 1993. *Instit. Bio.* 45: 16 - 34.

Richtzenhain L.J., Barbarini O., Umehara O. 1999. Rinotraqueíte infecciosa bovina: levantamento sorológico nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.* 66: 83-88.

Riet-correa G., Duarte M.D., Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Cerqueira V.D., Brito M.F. e Riet-correa F. 2006. Meningoencefalite e polioencefalomalácia causadas por Herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 26:44-46.

Rissi D.R., Oliveira F.N., Rech R.R., Pierezan F., Lemos R.A.A. e Barros C.S.L. 2006. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvirus bovinos - 5. *Pesq. Vet. Bras.* 26:123 - 132.

Rissi D.R., Pierezan F., Silva M.S., Flores E.F. & Barros, C.S.L. 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diag. Invest.* 20:346-349.

Rock D.L. 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Sem. Virol.* 5:233-240.

Rodriguez M., Barrera M., Sanchez O., Rodriguez E.C., Martinez N., Parra N.C. e Toledo J.R. 2012. First Report of bovine herpesvirus 5 in bull semen. *Arch. Virol.* 157:1775-1778.

Salvador, S.C., Lemos, R.A.A., Riet-correa, F., Roehe, P.M. e Osório, A.L.A.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bra.* 18:76 - 83.

Sambrook J. e Russell D. 2001. Técnicas de Comumente usado em de clonagem molecular. In: *Clonagem Molecular: um manual de laboratório*, 3a edição. Cold Spring Harbor Laboratory.

Silva A.D., Spilki F.R., Franco A.C., Esteves P.A., Hubner S.O., Driemeier D., Oliveira A.P., Rijsewijk F. e Roehe P.M. 2006. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine.* 24:3313 - 3320.

Silva M.S., Brum M.C., Weiblen R. e Flores E.F. 2007. Identificação e diferenciação de herpesvirus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clinicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesq. Vet. Bras.* 27:403-408.

Souza, V.F., Melo, S.V., Esteves, P.A., Schmidt, C.S., Gonçalves, D.A., Schaefer, R., Silva, T.C., Almeida, R.S., Vicentini, F., Franco, A.C., Oliveira, E.A., Spilki, F.R., Weiblein, R., Flores, E.F., Lemos, R.A., Alfieri, A.A., Pituco, E.M. e Roehe, P.M. 2002. Caracterização de herpesvirus bovinos tipos 1(BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bra.* 22:13-18.

Spilki F.R., Silva T.C., Esteves P.A., Teixeira M.B., Batista H.B.C.R., Chiminazzo C., Driemeier D., Franco A.C. e Roehe P.M. 2006. Co-infections with bovine herpesvirus type 5 and bovine viral diarrhoea virus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 5:699-707.

Steukers L., Vandekerckhove A.P., Broeck W.V., Glorieux S. e Nauwynck H.J. 2011. Comparative analysis of replication characteristics of BoHV-1 subtypes in bovine respiratory and genital mucosa explants: a phylogenetic enlightenment. *Vet. Res.* 42:2-11.

Takiuchi E., Alfieri A.F. e Alfieri A.A. 2001. Herpesvirus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos diagnóstico. *Sem: Ciênc. Agrár.* 22:203-209.

Takiuchi, E., Médici, K.C., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. 2003. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (Semi-nested PCR) para detecção do herpesvirus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. *Sem. Ciênc. Agrár.* 24: 43 - 56.

Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology.* 2nd ed. Blackwell Science, Cambridge. 479p. 1995.

Varela A.P.M., Holz C.L., Cibulski S.P., Teixeira T.F., Antunes D.A., Franco A.C., Roehe L.R., Oliveira M.T., Campos F.S., Cenci A., Brito W.D. e Roehe P.M. 2009. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHv-5) and its subtypes. *Vet. Micro.* 34: 245 - 251.

Vogel F.S.F., Flores E.F., Weiblen R. e Kunrath C.F. 2002. Atividade neutralizante anti- herpesvirus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. *Ciência Rural* 32:881-883.

Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkelmann E.R., Mayer S.V. e Bastos R.G. 2003. Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently, Experimentally Infected Calves. *J. Clin. Micro.* 41:4512 - 4520.

Weiblen R., Barros C.S.L. e Canabarro T.F. 1989. Bovine meningoencefalitis from IBR virus. *Vet. Rec.* 124:666 - 667.

Wesgueber J., Massitel J.L., Dognani R. e Lisbôa J.A.N. 2012. PREVALÊNCIA DA RAIVA EM HERBÍVOROS DOMÉSTICOS DO ESTADO DO PARANÁ, 2009 a 2011. *Anais do 21º Encontro Anual de Iniciação Científica, Maringá, Paraná, p.992 (Resumo).*

CONCLUSÃO

- A distribuição das infecções por BoHV-1 e BoHV-5 ocorreu de forma heterogênea no estado do Paraná;
- As mesorregiões ao norte do estado apresentaram os maiores índices de infecção por BoHV-1 e por BoHV-5;
- Com exceção da mesorregião Sudoeste, as mesorregiões localizadas ao sul do estado não apresentaram amostras positivas para o BoHV-1 e o BoHV-5;
- Os dados apresentados no presente trabalho, podem servir como auxílio na implantação de medidas de prevenção e controle das infecções geradas por BoHV-1 e por BoHV-5 nas diferentes regiões do estado.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 uL; 25 umol cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen™ Life Technologies, EUA)
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen™ Life Technologies, EUA)
3. Acetona P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
4. Agarose {Invitrogen™ Life Technologies, EUA)
5. Álcool etílico absoluto (C₂H₅OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
6. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
7. Azul de bromofenol (Sigma®, EUA)
8. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®, EUA)
9. Clorofórmio P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
10. Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®, EUA)
11. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Invitrogen™ Life Technologies, EUA)
12. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
13. Platinum Taq DNA Polymerase recombinant 500 unidades (Invitrogen™ Life Technologies, BRA)

APÊNDICE B

Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**

- 6 g de sílica (O₂Si)
- Adicionar 100 mL de água MilliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
- Por sucção, desprezar 88 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 100 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar
- Desprezar 88 mL do sobrenadante
- Adicionar HCl para ajustar o pH=2,0
- Aliquotar e autoclavar

- **Solução L6**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton x-100

- **Solução L2**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

- 0,25 g azul de bromofenol (0,25%)
- 45 g sacarose - sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) (45%)
- Água MilliQ q.s.p. 100 mL

- **Fenol/clorofórmio-álcool isoamílico**

- 25 mL fenol saturado
- 24 mL clorofórmio
- 1 mL álcool isoamílico

- **SDS 10%**

- 5 g de dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaÜ₄S)
- Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL

- **Gel de agarose 2%**

- 1 g agarose
- 50 mL de tampão TEB 1x
- 30 uL de brometo de etídio

- **Diluição de dNTP**

- solução estoque - concentração 100 mM - 100 µl de cada dNTP
- solução uso - concentração 10 mM - 10 µl da solução estoque + 90 µl de água MilliQ autoclavada

APÊNDICE C

Protocolo de Técnicas

- **Extração do DNA: Associação das técnicas fenol/clorofórmio-álcool isoaniílico e sílica/isotiocianato de guanidina**

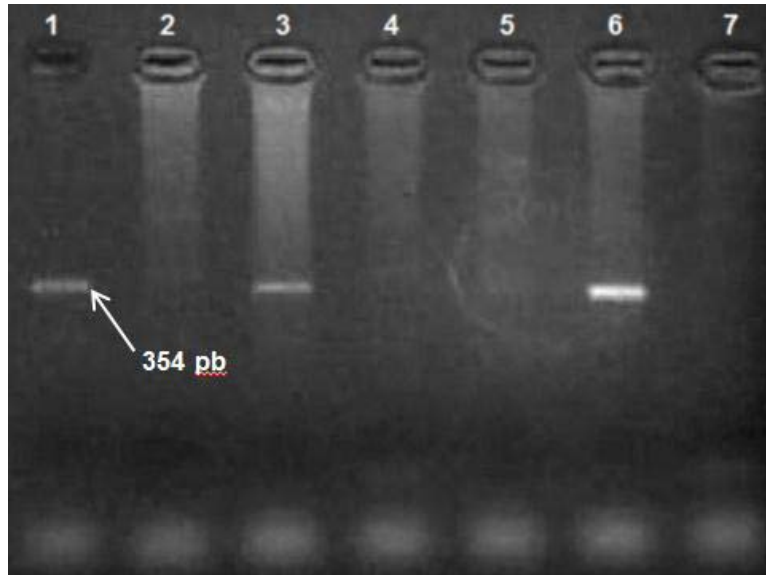
- Aliquotar 500 µL do macerado
- Adicionar 50 µL de SDS 10 %
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /60 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo
- Adicionar 500 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 µL de acetona P.A. gelada

- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Secar o pellet em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria à 56°C (15 min)
- Adicionar 50 µL de água DEPEC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56°C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x g /4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização

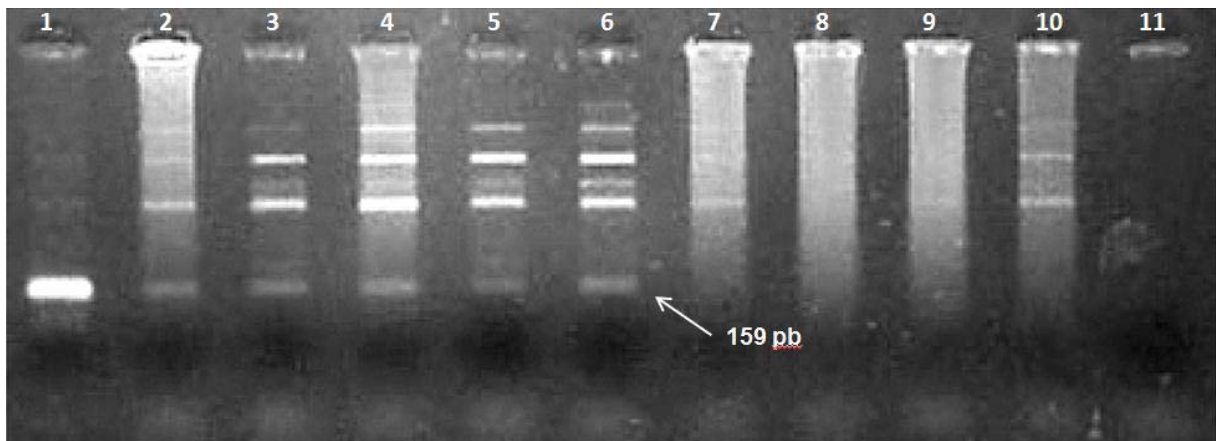
APENDICE D

Lista de Figuras

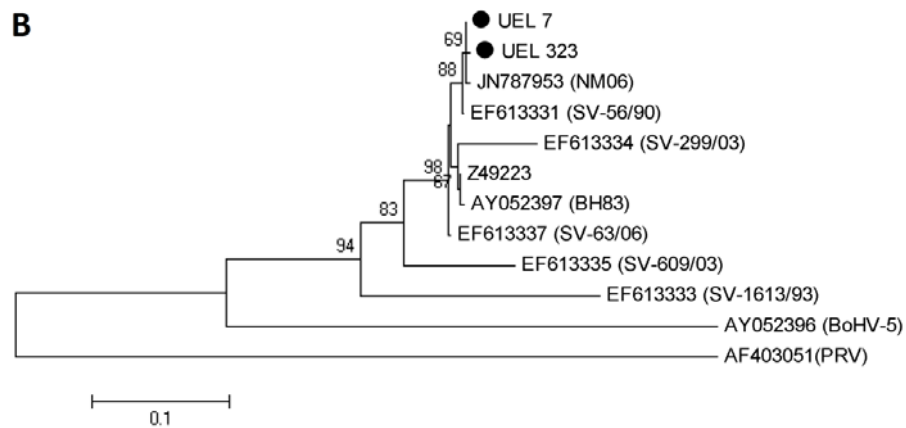
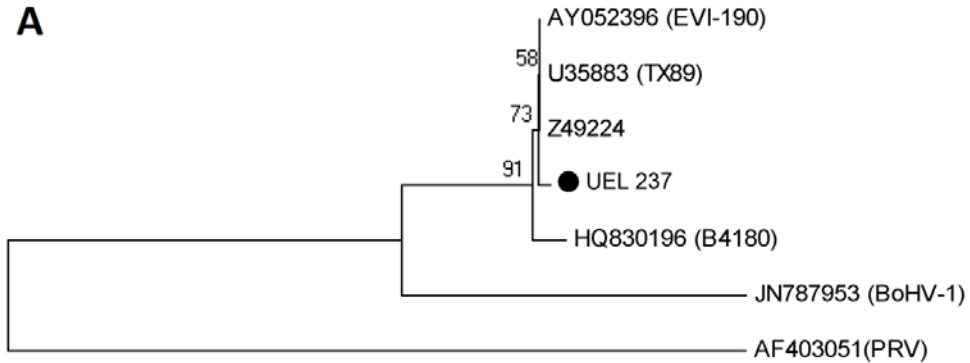
Produtos amplificados pela PCR para BoHV-1 (354 pb) em gel de agarose à 2% e corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: controle positivo (cepa Los Angeles). Canaletas 2 a 6: amostras testadas. Canaleta 7: controle negativo (solução de PBS).



Produtos amplificados pela PCR para BoHV-5 (159 pb) em gel de agarose à 2% e corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: controle positivo (cepa AA 01). Canaletas 2 a 10: amostras testadas. Canaleta 11: controle negativo (solução de PBS).



Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene gC com 210 nt (410-619 nt) e 303 nt (267-609 nt) das amostras de BoHV-5 (UEL 237 - A) e BoHV-1 (UEL 7 e UEL 323 -B), respectivamente, descritas no presente trabalho. Foi utilizado o método de neighbor-joining e o modelo de Kimura two-parameter



Total de municípios avaliados de acordo com as mesorregiões do estado do Paraná.

