

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOCTENIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO-1 E
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO-5 EM AMOSTRAS DE ENCÉFALOS
BOVINOS INCLUÍDOS EM PARAFINA**

Danilo Rezende e Silva

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2014

DANILO REZENDE E SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO-1 E
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO-5 EM AMOSTRAS DE ENCÉFALOS BOVINOS
INCLUÍDOS EM PARAFINA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau
de Mestrado em Ciência Animal junto à
Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Linha de Pesquisa:

Patobiologia animal, experimental e comparada

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha

GOIÂNIA

2014

DANILO REZENDE E SILVA

Dissertação defendida e aprovada em ____ de _____ de _____, pela seguinte banca examinadora:

Prof.º Eugênio Gonçalves de Araújo

EV-UFG, Goiânia - GO

Prof.º Eugênio Gonçalves de Araújo

EV-UFG, Goiânia - GO

Prof.º Eugênio Gonçalves de Araújo

EV-UFG, Goiânia - GO

Dedico aos professores do Setor de Patologia Animal da EVZ/UFG, por todo ensino,
conselho e amizade ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o alicerce, melhor amigo, Senhor de todas as coisas.

Aos meus pais, José Fernando da Silva e Maria de Lourdes Rezende e Silva, por serem as “colunas” de sustentação da minha vida e por sempre apoiarem meus objetivos e sonhos. Pessoas maravilhosas, amigas e especiais, sem as quais minha vida não seria a mesma. À minha querida irmã, Vívian Silva de Rezende e cunhado Gustavo Henrique Carles, companheiros, amizade sublime e essencial para minha existência. À minha avó materna, pela grande preocupação, carinho, amor e dedicação aos seus netos. Aos demais familiares, pela ajuda, colaboração, conselhos, sustento e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo pelo ensino, confiança, amizade e ser um educador precioso. Por sempre valorizar o lado ser humano de seus orientados, muito obrigado.

Aos demais professores do Setor de Patologia Animal, Prof.^a Dr.^a Veridiana M. B. D. de Moura, Prof.^a Dr.^a Moema Pacheco Chediak Matos, Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito, Prof.^a Dr.^a Regiani Nascimento Gagno Pôrto e Prof.^a Dr.^a Ana Paula Iglesias Santin, por serem mestres e educadores de valor imensurável.

Ao comitê de orientação Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares e Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha pela ajuda no projeto, nos seminários e na parte prática do projeto.

À grande e eterna amiga Marina Pacheco Miguel, que me cativou e sempre está ao meu lado em diferentes circunstâncias da minha vida. A quem tenho grande admiração, amor e carinho. Uma pessoa mais valiosa que qualquer pedra preciosa.

À minha melhor amizade desses últimos anos Lorena Karlla Domiciano de Freitas, por ser uma “irmã” que Deus me deu. Um anjo em minha vida, uma pessoa amiga, fiel, sincera, engraçada. Sempre estive perto nos momentos de alegria, como nos momentos de tristezas. Uma amizade que será eterna, amor de amigo independente de tudo.

Agradeço à Mariana Batista Rodrigues Faleiros e Lorena Cintra, pois foram fundamentais para execução desse projeto, e ainda serem amizades confiáveis. Obrigado por todos os conselhos e momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos de caminhada na pós-graduação da EVZ, que desde o começo do curso foram grandes amizades, essenciais para essa longa jornada. Principalmente, Vanessa de Souza Cruz Pimenta e Fernanda Figueiredo Mendes pela amizade, conselho, convivência.

À todos amigos, colegas, familiares e professores que fazem parte da minha trajetória. Apesar dos nomes não estarem neste documento, possuem minha gratidão pelo importante papel que exerceram em algum momento da minha vida.

“O que me preocupa não é o grito dos maus, mas o silêncio dos bons”.

Martin Luther King

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Propriedades gerais do herpesvírus bovino (BoHV)	4
2.2. Epidemiologia do BoHV no Brasil.....	5
2.3. Patogenia e Sinais Clínicos	7
2.4. Métodos complementares de diagnóstico.....	8
2.4.1. Diagnóstico anatomopatológico	8
2.4.2. Métodos moleculares.....	12
2.4.3. Isolamento viral e diagnóstico sorológico	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Amostras.....	15
4.2. Extração do DNA	15
4.3. PCR.....	16
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS	26

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Encéfalo de bovino. Alterações macroscópicas na infecção por herpesvírus bovino-5. A) Vista dorsal do encéfalo, áreas multifocais de malacia associada a intensa hemorragia (área tracejada). B) Áreas de depressão do córtex telencefálico em conjunto com áreas amolecidas (área tracejada). Fonte: RECH, 2007. 10
- FIGURA 2 - Encéfalo de bovino. Infecção experimental por BoHV-5. A) Encéfalo, vista dorsal. Extensa área de atrofia no lobo frontal esquerdo (seta). B) Encéfalo vista lateral e aproximada, evidenciando a intensa atrofia do córtex cerebral (seta larga). Fonte: SPILKI, 2011. 11
- FIGURA 3 - Fotomicrografia de encéfalo bovino com infecção por herpesvírus bovino-5. A) Acentuada quantidade de neurônios vermelhos citoplasma angular, retraído e hipereosinofílico(seta), associado a isso núcleos picnóticos. HE, 10x. B) Área de malacia, com necrose neuronal, destruição do neurópilo e infiltração de células Gitter (seta). HE, 20x. C) Acentuado número de células Gitter (seta) ao redor de um vaso. HE, 20x. D) Todo o neurópilo foi removido, com moderada quantidade de células Gitter remanescentes (setas) e alguns vasos (seta larga). HE, 20x.Fonte: RECH, 2007. 12
- FIGURA 4 - Imagem de gel de agarose à 1% demonstrando o resultado da amplificação em amostras extraídas de material FFPE do encéfalo de bovinos para o BoHV-1 (354 pb) e BoHV-5 (159 pb). M= marcador de 1Kb (Plus DNA Ladder - Thermoscientific – Cat # SM1331); 1, 4, 7, 10 e 13 = amostras positivas para BoHV-5; 2, 5, 8, 11 e 14 = amostras negativas para BoHV-1; 3, 6, 9, 12 e 15 = controle interno da reação β - actina bovina (120 pb); 16 = controle positivo para BoHV-1; 17 = controle positivo para BoHV-5. 22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BoHV	-herpesvírus bovino
BoHV-1	-herpesvírus bovino tipo-1
BoHV-5	-herpesvírus bovino tipo-5
ECP	-efeito citopático
EEB	-Encefalopatia espongiforme bovina
FAO	-Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FFPE	-tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina
gC	-glicoproteína C
HE	-hematoxilina e eosina
IBGE	-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	-isolamento viral em cultivo celular
MAPA	-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDBK	- <i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
OHV-2	-herpesvírus ovino tipo-2
OIE	-Organização Mundial de Saúde Animal
Pb	-pares de base
PCR	-Reação em cadeia da polimerase
PEM	-polioencefalomalacea
SNC	-Sistema Nervoso Central

RESUMO

A extração do DNA de herpesvírus em amostras fixadas em formol, assim como amostras emblocadas em parafina, tem sido utilizada em análises experimentais, permitindo o emprego de técnicas moleculares em pesquisas e no diagnóstico das meningoencefalites por herpesvírus. Foram revisados 80 casos da rotina anatomopatológica do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO (EVZ/UFG) realizados entre janeiro de 2007 à dezembro de 2012. Foram utilizados 18 casos com um total de 44 blocos (Grupo I – 14 blocos, Grupo II – 17 blocos e Grupo III – 13 blocos), os quais foram agrupados, de acordo com diagnóstico histopatológico, em Grupo I – amostras sem alterações histológicas e sem histórico clínico de doença neurológica, Grupo II – amostras com encefalite inespecífica, Grupo III – amostras com encefalite por Raiva. DNA dos fragmentos foram obtidos a partir dos cortes dos blocos, foi extraído com kit comercial de extração de material parafinizado. Posteriormente foi realizada a padronização da técnica de PCR convencional para herpesvírus bovino tipo-1 e herpesvírus bovino tipo-5. Foram positivos para BoHV-5 28% (5/18) dos casos, sendo 11% (2/18) do grupo com encefalite inespecífica e 17% (3/18) do grupo com encefalite e positivos para o vírus da raiva. No teste para verificação das bandas para o BoHV-1, todas as amostras, 100% (18/18), foram negativas. Esses resultados comprovam que a técnica de PCR convencional é útil no auxílio do diagnóstico definitivo de encefalite por herpesvírus bovino tipo-5.

Palavras-chave: encefalite, infecção por herpesvírus, DNA viral, PCR.

ABSTRACT

Identification of herpesvirus in specimens fixed in formalin and paraffin embedded has been used in experimental analysis. Several molecular techniques have been used in research and in diagnosing of herpesviral meningoencephalitis. 80 cases of routine in veterinary pathology were reviewed on the Department of Animal Pathology of Veterinary and Science Animal School Medicine of Federal University of Goiás, Goiania, GO (EVZ/UFG) performed between January 2007 to December 2012. Were used 18 cases with a total of 44 paraffin blocks (Group I - 14 blocks, Group II - 17 blocks and Group III - 13 blocks), which were grouped according to histopathological diagnosis, in Group I - samples without histological changes and no clinical history of neurological disease, Group II - samples with nonspecific encephalitis, Group III - samples with rabies encephalitis. Were extracted DNA fragments, from cuts blocks, using a commercial extraction kit of formalin and paraffin embedded tissue. Afterwards the technique standardization of conventional PCR for bovine herpesvirus-1 and bovine herpesvirus type-5 was performed. Were positive for BoHV-5 28% (5/18) of cases, with 11% (2/18) of the group with nonspecific encephalitis and 17% (3/18) of the group with encephalitis and positive for the rabies virus. In the test for checking of the bands for the BoHV-1, all samples, 100% (18/18) were negative. These results demonstrate that the conventional PCR technique is helpful in aiding the definitive diagnosis of encephalitis bovine herpesvirus type-5.

Keywords: encephalitis; *herpesvirus* infection; viral DNA; PCR.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é considerada uma das mais importantes atividades econômicas do Brasil, bem como do estado de Goiás. O Brasil lidera o ranking dos principais exportadores de carne bovina no mundo, sendo o auge dessa liderança alcançado no início do século 21¹. Além disso, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estima que, entre os anos de 2006 à 2015, o Brasil será responsável pela maior parte do aumento na produção mundial de carne, contribuindo aproximadamente com 36% do aumento do volume exportado nesse período².

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam o total de 209 milhões de cabeças de bovinos no ano de 2010. Em 2011 esse quantitativo aumentou para 212 milhões. No mesmo referido ano foi divulgado o efetivo do rebanho bovino nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste, em que o Centro-Oeste teve o maior número de animais, um total de 73 milhões. Assim, o estado de Goiás possui o quarto maior rebanho de bovinos do país³.

A Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, divulgada também pelo IBGE, constatou o abate de 28 milhões de cabeças e a produção de 6 milhões toneladas de carne bovina em 2009. Do montante final de carne produzida, 13.9% foram exportados para outros países, principalmente para Rússia, China e Irã. Segundo o IBGE, os Estados Unidos foi considerado o maior consumidor de carne bovina, seguido pela União Europeia e Brasil.

Estes dados demonstram o potencial do Brasil como um importante produtor e exportador de carne bovina. Entretanto, faz-se necessária maior relevância à sanidade animal e a intensificação da fiscalização na qualidade dos produtos, por condicionarem e ampliarem as exportações no quis diz respeito às barreiras impeditivas, comprometendo negativamente a competitividade e o grau de eficiência junto a outros mercados⁴.

As encefalopatias em bovinos abrangem um grupo de enfermidades que merecem destaque, tanto pelo perigo em potencial que representam à saúde humana, quanto pelas perdas econômicas expressivas que ocasionam nos rebanhos de corte e de leite. A variação de manifestação clínica dessas neuropatias, a semelhança sintomatológica entre alguns distúrbios e a dificuldade de diagnóstico, são aspectos importantes que limitam as ações de controle dessas enfermidades⁵.

As enfermidades virais que acometem o sistema nervoso central (SNC) dos animais de produção são relativamente frequentes e grande parte delas ignoradas como possíveis diagnósticos diferenciais nos animais que demonstram sinais neurológicos. Uma grande quantidade de agentes virais tem potencial para infectar o SNC, provocando encefalites ou encefalomyelites. Doenças virais do SNC possuem um tratamento específico limitado, sendo que frequentemente essas infecções são fatais⁶.

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), e os respectivos subtipos, merecem destaque entre os patógenos de bovinos, pois causam perdas produtivas e reprodutivas na bovinocultura^{16,17}.

Os herpesvírus apresentam a capacidade de se manter latentes em neurônios sensoriais após a infecção aguda, característica biológica bastante relevante. Portanto, pode ocorrer de forma silenciosa a persistência e disseminação desse agente no rebanho. Fatores estressantes, como parto, transporte e vacinação podem induzir a reativação viral^{18,19}. A meningoencefalite causada pelo BoHV-5 é uma doença infecto-contagiosa, aguda ou subaguda, a qual tem sido relatada como a segunda causa mais frequente de meningoencefalite viral em bovinos no Sul do Brasil⁹ e no Centro-Oeste¹². Embora os surtos de encefalite supostamente causados por BoHV-5 terem aumentando nos últimos anos⁵⁹, a detecção do tipo 1 nos casos sinais neurológicos vem sendo realizada^{27,67}.

A epidemiologia desses herpesvírus deve ser estudada, na tentativa de relacionar a ocorrência de determinado tipo ou subtipo com as manifestações clínicas associadas à cada agente, de igual modo pesquisas sobre medidas de controle e erradicação dessas enfermidades. O diagnóstico mais preciso e medidas de controle deve ser baseados na disponibilidade de técnicas específicas que auxiliem na diferenciação dos tipos e subtipos de BoHV²³. Assim, diversos métodos têm sido empregados para o diagnóstico desses vírus, dentre eles: imunoistoquímica^{24,25}, PCR convencional^{26,27,28,29}, *multiplex* PCR^{30,31,32} e *nested* PCR³³.

A utilização dessas ferramentas complementares de diagnóstico são importantes para a prevenção e controle das enfermidades relacionadas com BoHV, bem como a redução de perdas econômicas em rebanhos bovinos. As comunidades americana e européia tem imposto rigoroso controle sanitário de sêmen e embriões, instituindo programas de erradicação que afetam diretamente o comércio bovino mundial. O Brasil, considerado o maior exportador de carne bovina, necessita de uma renovação e revisão detalhada dos programas de controle e erradicação das enfermidades que afetam o SNC em bovinos³⁴.

Existem poucos relatos e pesquisas relacionadas à identificação de herpesvírus bovino no Estado de Goiás. Portanto, o conhecimento e a divulgação da casuística são de suma importância, bem como a caracterização dos agentes que são encontrados na região. Considerando como uma importante área na pecuária nacional e aumento das exigências quanto à sanidade dos rebanhos destinados à exportação dos produtos, pesquisas com objetivo de identificação e caracterização desses vírus tornam-se fundamentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Propriedades gerais do herpesvírus bovino (BoHV)

A família *Herpesviridae* é composta de três subfamílias, *Alfa*, *Beta* e *Gamaherpesviridae*. Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 pertencem ao gênero *Varicellovirus* da subfamília *Alphaherpesvirinae*³⁵. Os herpesvírus desta subfamília apresentam um genoma composto por DNA linear de fita dupla com, aproximadamente 140 quilopares de base (kpb) e um nucleocapsídeo icosaédrico com 162 capsômeros. Este possui também uma camada proteica amorfa denominada tegumento, além do envelope glicoproteico com propriedades antigênicas diferentes³⁶. Este envelope tem ação na replicação viral como na ligação viral à célula hospedeira, fusão e penetração³⁷.

O diâmetro do BoHV é variável, entre 130 a 200 nm e, por causa do envelope glicoproteico, esse vírus é sensível ao éter e outros solventes lipídicos, bem como à grandes variações do pH³⁶. Esses vírus são classificados em seis grupos, de acordo com o conteúdo das bases guanina e citosina (G + C) e pela presença de sequências repetidas. Tanto o BoHV-1 quanto o BoHV-5 são classificados no grupo D, apresentam duas sequências únicas, a UL (sequência longa) e a US (sequência curta)³⁸.

Os herpesvírus bovino apresentam cerca de 87% de similaridade na porção nucleotídica e 82% de identidade entre os aminoácidos. O total de 70 proteínas são codificadas, sendo dez dentre essas glicosiladas³⁹. As glicoproteínas, proteínas estruturais denominadas gB, gC e gD, possuem potencial imunogênico e permitem a diferenciação entre os tipos virais⁴⁰.

As principais diferenças entre o BoHV-1 e BoHV-5 residem nas características clínico-epidemiológicas, e ao potencial neurotrópico do BoHV-5. Na maioria dos casos o BoHV-1 é relacionado como causador de enfermidades respiratória e genital, já o BoHV-5 é associado à doença neurológica^{39,41}.

O BoHV-1, subtipo 1, é associado à enfermidade respiratória, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), abortos e conjuntivite. O BoHV-1.2a, além desses processos, pode também causar vulvo vaginite pustular infecciosa (IPV), infecção fetal e abortos; nos machos, é causador da balanopostite pustular infecciosa (IPB)²⁰. O BoHV-1.2b está associado às doenças respiratórias, IPV/IPB, porém não foram relatados casos associados a abortos. A variabilidade no gene da gC relaciona-se com as diferentes manifestações clínicas observadas nos subtipos do BoHV-1^{42,43}.

O BoHV-5 é relacionado à enfermidade neurológica, denominada meningoencefalite herpética bovina, e ocorre mais em animais jovens, de seis a 60 meses de idade⁴⁴. A neurovirulência do BoHV-5 é variável, conforme o tipo da amostra viral⁴⁵ e fatores relacionados ao hospedeiro, como a idade e a condição imunológica⁴¹. Contudo, alguns estudos demonstram que o BoHV-1 e o BoHV-5 podem não estar relacionados exclusivamente as suas respectivas manifestações clínicas clássicas^{22,23}.

A infecção por BoHV-5 ocorre naturalmente em bovinos; contudo, a infecção aguda e latente já foi reproduzida experimentalmente em coelhos e ovinos. O vírus é excretado nas secreções nasais em até 15-18 dias pós-infecção, com disseminação rápida por contato direto ou indireto⁴⁶.

2.2. Epidemiologia do BoHV no Brasil

Na década de 90 ocorreu o ápice dos estudos sobre as doenças neurológicas em bovinos, em virtude de surtos de encefalopatia espongiforme bovina (EEB). A importância dessa doença não se restringia apenas ao campo da sanidade animal, pois em 1996 a EEB foi associada ao aparecimento de uma nova variante da enfermidade Creutzfeldt-Jacob (vCJD) em humanos no Reino Unido⁷. Diante disso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implantou um sistema de vigilância epidemiológica para EEB. Como parte desse sistema, foi elaborado o Manual de Procedimentos para o Diagnóstico das Enfermidades do Sistema Nervoso Central de Bovinos¹. Assim, tornaram-se cada vez mais frequentes estudos sobre essas enfermidades em diversos estados brasileiros, como na Paraíba⁸, Rio Grande do Sul^{9,10,11}, Mato Grosso do Sul e São Paulo¹², Minas Gerais¹³ e Goiás¹⁴.

Os herpesvírus bovinos tem sido identificados no Brasil há pelo menos 35 anos. O BoHV-1 foi isolado, primeiramente, em um caso de vulvo-vaginite bovina na Bahia⁴⁷, enquanto no Estado de São Paulo, Mueller et al.⁴⁸ isolaram esse vírus a partir do rim de um feto bovino, oriundo de um matadouro. Além disso, as amostras virais de BoHV foram encontradas em várias regiões, depois da década de 80, na região Sul^{49,50,23,51,52}, Sudeste^{44,53,54,55} e região Centro-Oeste⁵⁶.

Em Goiás, Faria et al.⁵⁷ realizaram estudo onde identificaram 64,9% de positividade para BoHV-1 em touros, comprovando a alta prevalência desse vírus em propriedades da região de Goiânia. Outro estudo feito por Vieira et al.⁵⁸ em 90 rebanhos bovinos registrou índice de positividade de 83%, com maior prevalência em rebanhos leiteiros.

A prevalência da infecção pelo BoHV-1 e 5 ainda é incerta, pois testes sorológicos não são capazes de diferenciar com precisão a infecção entre os dois tipos virais, bem como não é possível estabelecer um diagnóstico conclusivo fundamentado apenas nos sinais clínicos. Com isso, uma parcela dos bovinos supostamente positivos para o tipo 1 podem ser positivos pelo tipo 5, devido à extensa reatividade cruzada⁶⁴. Além disso, uma parcela dos bovinos soropositivos para o BoHV-5 pode ter diagnóstico clínico confundido com outras doenças neurológicas como raiva, botulismo, distúrbios no metabolismo de tiamina, intoxicação por sal, babesiose, listeriose⁴⁴.

Estudo feito por D'Offay et al.⁶⁵ apontaram que a imunidade natural cruzada ou induzida por anticorpos vacinais contra o tipo 1 seja a explicação para a rara ocorrência de casos de meningoencefalite herpética nas regiões endêmicas para BoHV-1 nos EUA e Europa. Porém, na América do Sul, mesmo apresentando uma alta porcentagem de animais positivos para o BoHV-1, no Brasil (24,8-84,1%) e na Argentina (19-85%), há muitos casos relatados de meningoencefalite associada ao BoHV-5⁶⁶.

Alguns autores consideram a meningoencefalite por BoHV-5 como uma das principais doenças do SNC de bovinos na região Centro-oeste do Brasil⁴⁴. O BoHV-5 tem sido identificado nos casos de doença neurológica fatal em bovinos, principalmente em animais jovens^{44,59,51}. Entretanto, o vírus já foi isolado em fetos abortados, baço, pulmão e no sêmen^{60,61,62,63}. Embora os surtos de encefalite supostamente causados por BoHV-5 terem aumentando nos últimos anos⁵⁹, a detecção do tipo 1 nos casos com sinais neurológicos vem sendo realizada^{27,67}. Achados estes demonstram a importância da identificação precisa dos tipos de herpesvírus para o melhor conhecimento da sua patogenia e epidemiologia.

2.3. Patogenia e Sinais Clínicos

A transmissão do BoHV-1 ocorre por contato direto e indireto entre os animais, pelas vias respiratória, genital e também via vertical. O vírus é eliminado por meio da tosse, espirro, saliva, secreções brônquicas, oculares, faringeanas, genitais e pelo sêmen⁶⁸. Nos casos de infecção aguda, o vírus é excretado em grande quantidade por 10-15 dias. Quando há reativação viral, após o período de latência, a excreção ocorre em menor concentração e por 2 a 10 dias³⁷.

Surtos de meningoencefalite por BoHV-5 foram relacionados com situações de estresse, como desmame, transporte, parto, mudança brusca na dieta. As infecções pelo BoHV-5 possuem morbidade por volta de 10%, porém a letalidade é de aproximadamente 100%⁴⁴. Nas infecções por BoHV-1 e 5, a severidade dos sinais clínicos é dependente da amostra viral, idade e *status* imunológico do hospedeiro⁴¹.

A patogenia desses vírus possui bastante semelhança, a começar da porta de entrada natural para ambos os agentes, que são as membranas mucosas dos tratos respiratório superior e genital. O vírus irá replicar-se nas células epiteliais no local da penetração. Nessa etapa, há expressão dos genes virais, produção de novas partículas virais e morte celular, acompanhada de necrose e apoptose durante o ciclo de replicação viral. Logo em seguida, há disseminação local e sistêmica do vírus, podendo essas partículas serem transmitidas verticalmente, com possibilidade de gerar abortos. A invasão do tecido neural é iniciada pela mucosa nasal, por meio dos nervos olfatório e trigêmeo, onde a condição de latência é estabelecida⁶⁹. Contudo, nos casos de infecção pelo BoHV-5, o vírus não se restringe aos gânglios sensoriais; também há invasão do encéfalo, atingindo neurônios da ponte e bulbo, logo após disseminação no cerebelo, ponte e córtex cerebral. A via olfatória é relatada como a principal via de acesso ao SNC em infecção experimental em ovinos e bovinos, respectivamente^{46,26}.

Quando atinge o SNC, o vírus poderá formar lesões encefálicas produzindo doença neurológica, caracterizada por meningoencefalite. Essa enfermidade pode ocorrer isoladamente ou na forma de surtos, com índice de morbidade próximo à 10%, porém com alta letalidade, principalmente em bovinos jovens. Os animais adultos são menos susceptíveis^{44,41,37}. A evolução dos sinais clínicos pode variar entre 3 a 10 dias. Esses sinais são perceptíveis após um período de incubação entre 7 e 10 dias após a infecção⁷⁰.

Os bovinos com a infecção ficam separados do rebanho, com olhar fixo e cabeça baixa. A maioria dos animais acometidos apresenta corrimento nasal e ocular seroso que, com a evolução da doença, torna-se mucopurulento. Frequentemente, esses animais desenvolvem cegueira, bruxismo, andar em círculos, febre, movimentos de pedalagem, incoordenação dos membros pélvicos, decúbito, nistagmo, tremores, anorexia e pressão da cabeça contra objetos. Podem ser observados também, mas com menor frequência, taquicardia, taquipnéia, disfagia, dor abdominal, melena e pelos arrepiados^{71,72}.

2.4. Métodos complementares de diagnóstico

Para o diagnóstico definitivo, nos casos suspeitos de infecção por BoHV devem ser adotados métodos laboratoriais para tal finalidade. A identificação desses vírus no organismo animal é feita, rotineiramente, por técnicas sorológicas, pesquisa de anticorpos ou por isolamento dos vírus em espécimes clínicos. A amostra utilizada para os métodos sorológicos, nos casos de infecção por BoHV-1, é o soro sanguíneo. Para as técnicas de pesquisa do vírus, antígeno viral ou DNA podem ser utilizadas secreções nasais, oculares ou genitais, sêmen, fragmentos de pulmão, traqueia, tecidos fetais (timo, pulmão, baço e cérebro) e a placenta. Já nos casos de BoHV-5, as amostras para detecção viral *ante-mortem* são as secreções nasais e *post-mortem* o encefalo³⁷.

O diagnóstico das encefalopatias bovinas, na rotina, é feito baseado nas alterações *post-mortem*. O diagnóstico *ante-mortem* é importante na tentativa de diferenciar a infecção por BoHV-5 de outras doenças neurológicas como raiva, polioencefalomalacia (PEM) e EEB. A utilização do líquido cefalorraquidiano (LCR) pode permitir a identificação do DNA viral, constituindo importante ferramenta no diagnóstico prévio nos casos suspeitos de meningoencefalite por BoHV-5^{73,28}.

2.4.1. Diagnóstico anatomopatológico

Os bovinos com meningoencefalite por BoHV-5 podem não apresentar lesões macroscópicas no encéfalo⁷¹. A ausência de alterações durante a necropsia também foi citada por Salvador et al.⁴⁴, que relataram que dos 21 casos observados, nove não apresentaram lesões macroscópicas e sete apresentaram alterações inespecíficas, como congestão.

De acordo com Colodel et al.⁵⁹, em 13 casos analisados, cinco não apresentaram alterações ao exame de necropsia. Em dois casos foram observados achatamento das circunvoluções cerebrais e áreas multifocais, bilaterais, assimétricas e irregulares, de coloração amarelada (Figura 1B), superfície deprimida e aspecto finamente granular, estas características são compatíveis com a descrição de malacia cortical cerebral. Essas lesões de malacia estão associadas a áreas de hemorragias (Figura 1A).

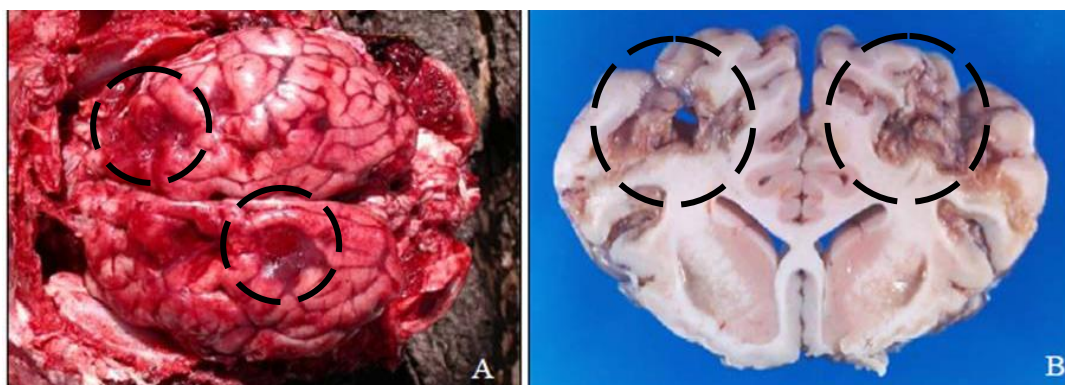


FIGURA 1 – Encéfalos de bovinos. Alterações macroscópicas na infecção por *herpesvírus* bovino-5. A) Vista dorsal do encéfalo, áreas multifocais, bilaterais e assimétricas de malacia associada a intensa hemorragia (área tracejada). B) Áreas de depressão do córtex telencefálico em conjunto com áreas amolecidas bilaterais e assimétricas (área tracejada).
Fonte: Rech, 2007.

Rissi et al.⁷² observaram, no total de 19 surtos, quatro casos sem lesões macroscópicas, quatro casos com lesões circulatórias discretas e dez com lesões inflamatórias e degenerativas acentuadas. As lesões discretas eram principalmente hiperemia dos vasos das leptomeninges e as lesões moderadas foram caracterizadas por tumefação e achatamento das circunvoluções do córtex frontal, associados a áreas de malacia. Nos casos mais graves, foram encontradas acentuadas depressões do córtex cerebral, principalmente no córtex frontal.

De modo semelhante, Elias et al.⁷⁴ realizaram necropsia de 12 bovinos com suspeita de infecção pelo BoHV-5. Desse total, somente cinco animais apresentaram lesões macroscópicas e a principal alteração foi malacia no córtex frontal, alteração observada, com menor frequência, nos córtices temporal e occipital. Além disso, encontraram áreas de hemorragia e congestão na substância branca.

A infecção por BoHV-5 foi induzida experimentalmente em três bovinos por Spilki et al.⁷⁵, os quais observaram extensas áreas de atrofia no córtex frontal (Figura 2 A e B) e no córtex parietal. Essas áreas apresentavam coloração amarelo-alaranjado, e alguns casos também foram observadas na base do cérebro.

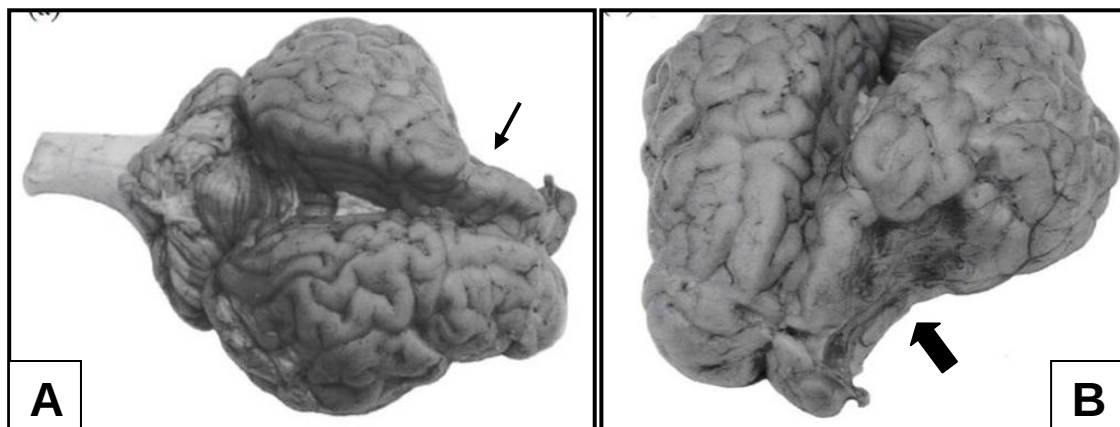


FIGURA 2 – Encéfalo de bovino. Infecção experimental por BoHV-5. A) Vista dorsal. Extensa área de atrofia no lobo frontal esquerdo (seta). B) Vista lateral e aproximada, evidenciando a intensa atrofia do córtex cerebral (seta larga). Fonte: Spilki, 2011.

As alterações histopatológicas possuem intensidade variável, a depender do local acometido. Salvador et al.⁴⁴ encontraram alterações microscópicas em 21 bovinos, com meningite não supurativa difusa severa, principalmente nos lobos frontais, parietal e occipital. Já os manguitos perivasculares linfoplasmocitários foram mais comuns no tálamo, cerebelo, ponte e córtex occipital, com predileção pela substância branca. Os corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos foram encontrados nos neurônios e astrócitos em 18 dos 21 casos. Os principais sítios de localização desses foram os lobos frontal e parietal. Foram observadas áreas de malacia com presença de macrófagos espumosos, denominados células Gitter, no córtex mais superficial, ou na região submeningeana. Em algumas áreas, o neurópilo era completamente substituído por células Gitter.

Em estudo de Rissi et al.⁷², todos os bovinos examinados apresentaram alterações histopatológicas de meningoencefalite não supurativa. Em alguns casos, foram encontrados malacia e alterações inflamatórias, como hiperemia, hemorragia e edema, tanto no neurópilo, quanto nas meninges. Em apenas quatro casos (21,05%) foram observados corpúsculos de inclusão basofílicos intranucleares em astrócitos e neurônios.

Esses autores observaram alterações degenerativas caracterizadas por necrose neuronal ou neurônio vermelho (Figura 3A), neuronofagia, áreas de malacia infiltradas por células Gitter (Figura 3B), e nos casos mais crônicos, foram observadas apenas células Gitter e alguns vasos (Figura 3C/D), características de lesão residual.

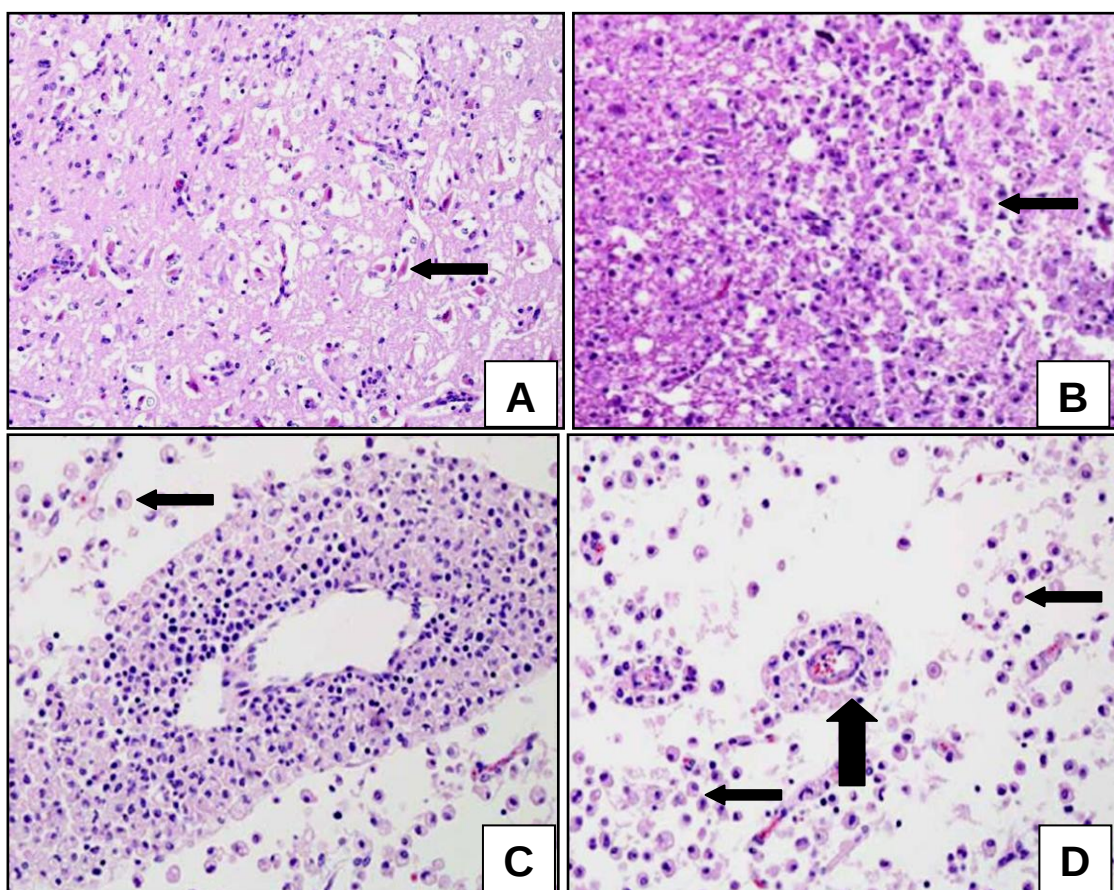


FIGURA 3 – Fotomicrografias de encéfalos bovinos com infecção por herpesvírus bovino-5. A) Acentuada quantidade de neurônios vermelhos citoplasma angular, retraído e hipereosinofílico (seta), associado a núcleos picnóticos.10x. B) Área de malacia com necrose neuronal, destruição do neurópilo e infiltração de células Gitter (seta). 20x. C) Acentuado número de células Gitter (seta) ao redor de um vaso. 20x. D) Todo o neurópilo foi removido, com moderada quantidade de células Gitter remanescentes (setas) e alguns vasos (seta larga).20x. HE.

Fonte: RECH, 2007.

Elias et al.⁷⁴ encontraram meningoencefalite não supurativa com malacia em todos os casos de bovinos naturalmente infectados. Os autores relataram que, nas áreas de malacia, o neurópilo foi substituído pelas células Gitter e, em algumas áreas focais, foram encontrados neurônios com citoplasma retraído e eosinofílico (necrose neuronal). Os autores observaram ainda que, os corpúsculos de inclusão intranucleares estavam presentes

em todos os casos e eram eosinofílicos. Já Spilki et al.⁷⁵ notaram apenas infiltração de células Gitter no córtex frontal e foco de malacia no gânglio trigêmeo, em bovinos experimentalmente infectados.

Rissi et al.⁵¹ observaram meningoencefalite em 18 casos do total de 22 bovinos e os corpúsculos de inclusão eosinofílicos foram encontrados nos núcleos de astrócitos e neurônios em seis animais, enquanto as áreas de malacia foram observadas em 10 casos, inclusive alguns animais com completa destruição do neurópilo. De acordo com Colodel et al.⁵⁹, há certa relação entre a reação inflamatória e a quantidade de corpúsculos de inclusão. Em quatro casos, onde a reação inflamatória foi discreta, foi encontrado apenas um corpúsculo de inclusão por campo. Já em cinco casos, onde o infiltrado foi moderado, foram observados dois corpúsculos de inclusão por campo. Em um caso, em que a reação foi acentuada, foram observadas mais de três inclusões virais.

Todavia, o diagnóstico diferencial por métodos complementares entre BoHV-5 e demais encefalites virais bovinas devem ser realizados, haja visto que no exame histopatológico podem ocorrer resultados inconclusivos ou sugestivos quanto ao agente etiológico. Além disso, os sinais clínicos dessas enfermidades por herpesvírus do SNC podem ser observados nas várias doenças inflamatórias do encéfalo de bovinos⁷⁶.

2.4.2. Métodos moleculares

O diagnóstico molecular é uma ferramenta importante, pois detecta o agente etiológico, de forma rápida e eficaz das principais doenças infecciosas dos animais com sintomatologia clínica⁷⁷. Diversas técnicas moleculares têm sido empregadas objetivando o estabelecimento dos agentes virais das encefalopatias nos bovinos, tais como reação em cadeia da polimerase - PCR^{26,78,79}, análise de restrição genômica^{80,81} e a hibridização *in situ*⁸². O objetivo da utilização da PCR é a amplificação de uma região específica do DNA do microorganismo, considerado um método altamente sensível, específico e de rápida execução. Diversas variações da PCR já foram desenvolvidas visando a detecção de BoHV-1 e 5, dentre elas, a PCR convencional^{26,27,28,29}; multiplex PCR^{30,31,32} e *nested* PCR³³.

O uso da gC como alvo para identificação do BoHV-1 e BoHV-5 baseia-se no fato dessa proteína ser altamente imunogênica, pois está relacionada à adsorção desses vírus às células-alvo⁸². Além disso, essa glicoproteína apresenta apenas 75% de similaridade entre as duas espécies virais³⁹. Dentre as regiões da gC, a carboxi-terminal é a uma das mais conservadas, permitindo a detecção concomitante do BoHV-1 e BoHV-5,

sendo possível fazer a diferenciação entre os dois tipos devido a uma série de deleções existentes nessa região da proteína.

Claus et al.⁷⁶ avaliaram 47 amostras de SNC provenientes de surtos de doenças neurológicas em bovinos. Desse total, em apenas 18 (38%), das amostras submetidas ao isolamento viral e à cultura celular em células MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*), foi encontrado resultado positivo para *herpesvírus* bovino. Posteriormente, os autores detectaram o DNA do BoHV-5 nessas 18 amostras, utilizando multiplex PCR. Diallo et al.³¹ empregaram a técnica de multiplex PCR em tempo real em amostras de 13 bovinos analisados para os vírus BoHV-5 e BoHV-1, e obtiveram resultados semelhantes entre a técnica de multiplex PCR convencional e multiplex PCR em tempo real.

Fonseca Jr et al.³² utilizaram o método de PCR multiplex para detecção de DNA do BoHV-5, BoHV-1, herpesvírus ovino-2 (OHV-2) e herpesvírus suídeo-1 (SHV-1) em amostras do SNC de bovinos, ovinos e suínos. Para a espécie bovina foram avaliadas 65 amostras, mas somente dez foram positivas para BoHV-5, uma para BoHV-1 e cinco para OHV-2.

Arruda et al.⁸⁴ analisaram 76 amostras de encéfalo bovino, fixadas em formol e emblocadas em parafina, dividindo-as em dois grupos distintos. Em um grupo foram alocadas 40 amostras com meningoencefalite necrosante, característica de infecção por BoHV-5, enquanto em outro grupo, foram avaliadas 36 amostras com meningoencefalite inespecífica. A partir da técnica de PCR, detectaram DNA de BoHV-5 em 16 (40%) amostras do grupo 1 e 12 (33,3%) do grupo 2. Os pesquisadores relataram, ainda, que, foram identificados corpúsculos de inclusão viral em nove amostras do grupo 1, tendo sido detectada presença do DNA viral em seis dessas (66,6%). De modo semelhante, Ferrari et al.³⁴ identificaram BoHV-5 em 15 amostras de encéfalo bovino, emblocadas em parafina, do total de 20 amostras analisadas.

O diagnóstico molecular por PCR pode ser feito a partir de amostras congeladas e a extração do DNA viral também pode ser realizada em amostras do SNC conservadas em formol e emblocadas em parafina. No entanto, o tempo de fixação do material pode promover uma interação química com ácidos nucleicos⁸³, diminuindo a sensibilidade da técnica. Além disso, deve ser considerado o estágio da doença, pois a quantidade de DNA viral na fase aguda é diferente da fase crônica, quando o vírus foi reativado⁸⁰.

2.4.3. Isolamento viral e diagnóstico sorológico

Uma grande variedade de vírus, quando infectam as células hospedeiras, possuem a capacidade de destruir às mesmas e infectar novas células. Com isso, ocorrem alterações que podem ser visualizadas e são denominadas de efeitos citopáticos⁸⁵. O método utilizado para visualização desses efeitos é o isolamento viral em cultivo celular. Esse método é considerado um dos mais sensíveis para detecção viral; além de sua execução ser relativamente simples, o agente pode ser usado em estudos posteriores^{86,87}. Entretanto, é uma análise de longa duração, podendo levar de uma a três semanas, e somente identifica vírus viáveis. Somado a isso, podem ocorrer contaminações bacterianas, fúngicas ou de outros vírus⁸⁷.

Os vírus BoHV-1 e BoHV-5 são isolados, rotineiramente, utilizando as linhagens celulares MDBK e CRIB (clone celular de MDBK resistente a infecção por BVDV). Nas inoculações de herpesvírus, os ECP observados são desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular, formação de focos infecciosos com aspecto de “cacho de uva” e lise⁸⁸.

Outras formas de diagnóstico sorológico são a fixação de complemento, hemaglutinação passiva, imunofluorescência, imunoperoxidase, soroneutralização e ensaios imunoenzimáticos^{89,90}. A grande maioria dos laboratórios utilizam a técnica de soroneutralização e ensaios imunoenzimáticos por meio do ELISA, para diagnóstico viral, os quais são os testes recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE)⁶⁴.

Diante da importância econômica das doenças causadas por herpesvírus no rebanho bovino e da necessidade do diagnóstico etiológico das encefalites nessa espécie, esse trabalho teve por objetivo a identificação molecular, pela técnica de PCR, de herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) em amostras de encéfalos de bovinos, diagnosticadas com encefalites, provenientes do arquivo do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ/UFG), do período compreendido entre 2007 e 2012.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras deste estudo foram provenientes da revisão de 80 exames da rotina anatomopatológica do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG) em Goiânia, Goiás, realizados entre janeiro de 2007 à dezembro de 2012. Foram selecionados 18 casos (18 animais), com um total de 44 blocos com amostras de encéfalos bovinos, os quais foram agrupados, de acordo com diagnóstico histopatológico, em:

- Grupo I (controle) – animais sem alterações histológicas, sem histórico clínico de doença neurológica (5 casos, 14 blocos).
- Grupo II – animais com encefalite inespecífica (9 casos, 17 blocos).
- Grupo III – animais com encefalite e positivos para vírus da Raiva (4 casos, 13 blocos).

4.2. Extração do DNA

As extrações de DNA das amostras de encéfalo foram realizadas utilizando o kit NucleoSpin® DNA FFPE XS (MACHEREY-NAGEL®) para a purificação do DNA genômico de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. A extração foi realizada no Laboratório de Imunopatologia da EVZ/UFG, segundo protocolo do fabricante como o descrito a seguir.

Após a retirada do excesso de parafina utilizando-se um bisturi, foram seccionados vinte cortes de 10 µm utilizando micrótomo rotativo (Leica-RM2255). Os cortes foram adicionados a 1 ml de xilol em um tubo do tipo eppendorf para a remoção da parafina. Para realizar o corte de cada região, limpou-se o micrótomo, um novo par de luvas descartáveis e nova navalha histológica foram utilizados com o objetivo de evitar contaminação entre as amostras. Em seguida, o tubo com o material foi centrifugado a 11.000 G por 2 minutos. Um “pellet” foi formado e, após a remoção completa do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de etanol a 100% para remover resíduos de xilol.

O material foi outra vez centrifugado a 11.000 G por 2 minutos, e novamente o sobrenadante foi dispensado. Os tubos foram abertos e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. O “pellet” formado foi suspenso em 100 µL de tampão FL (tampão de lise), novamente foi centrifugado a 11.000 G por 1 minuto, seguido da adição de 10 µL de proteinase K. Após mistura do conteúdo em vórtex, o material foi incubado *overnight*. No dia seguinte, foram adicionados 100µL de tampão D-Link (tampão *decrosslink*) para remover as ligações covalentes formadas pela formalina na molécula de DNA.

Logo em seguida, todo o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 11.000 G por 1 minuto, seguido de incubação a 90°C por 30 minutos em banho-maria. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de etanol a 100%, homogeneizado e centrifugado a 1.000 G/1 spin. Em sequência, o conteúdo aquoso foi pipetado e transferido para a coluna de agarose (NucleoSpin[®] DNA FFPE XS Column, *greenring*), procedeu-se a centrifugação a 2.000 G por 30 segundos. Depois o tubo coletor foi descartado e a coluna foi colocada em um novo tubo coletor.

Posteriormente, foi realizada a lavagem da membrana de sílica da coluna, adicionou-se 400 µL do tampão B5 e o material foi centrifugado a 11.000 G por 30 segundos, tendo sido descartado o conteúdo do tubo coletor, etapa que foi repetida duas vezes. Após a lavagem, procedeu-se a adição de 20µL do tampão BE (tampão de eluição) na coluna, seguido de centrifugação a 11.000 G por 30 segundos. Em seguida ao descarte da coluna, o DNA extraído, contido no tubo coletor, foi congelado a -20°C até a realização da PCR.

O rendimento e a qualidade do DNA extraído foram mensurados utilizando o NanoVue[™] Plus Spectrophotometer (GE Healthcare - 28-9301-69 AC). O rendimento foi estimado por meio da absorbância de UV a 260 nm e, para a mensuração da qualidade, foi utilizada a taxa entre A260/A280. Adicionado a isso, foram confeccionados géis de agarose a 1% para confirmação da existência de DNA.

4.3. PCR

As amostras extraídas foram submetidas à técnica da PCR de modo semelhante ao descrito por Claus et al.³⁰, no Laboratório de Biotecnologia de Fungos locado no Instituto de Ciências Biológicas 2 (ICB II) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Foi realizada uma revisão bibliográfica dos oligonucleotídeos iniciadores de BoHV-1 e BoHV-5, publicados em periódicos entre 1997 à 2012 (Anexos 1 e 2).

Posteriormente, todos os *primers* foram analisados quanto à especificidade para ambos os vírus por meio de um software on-line (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Adicionado a isso, foram feitas análises, quanto à possíveis defeitos nos primers, em outro software (IDT – Integrated DNA Technologies, <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Após feita essas análises foram escolhidos os primers com mais especificidade para ambos os vírus.

Os oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR foram obtidos com base nas sequências do gene que codifica a gC (glicoproteína C) de BoHV-1 e BoHV-5, as quais estão disponíveis no banco de dados do “*National Center for Biotechnology Information*”, números de acesso Z49223 e U35883 (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os oligonucleotídeos B1 (5'-CAACCGAGACGGAAAGCTCC-3' nt 185-204); B5 (5'-CGGACGAGACGCCCTTGG-3' nt 322-339) e Bcon [(5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3' nt 519-538 (BoHV-1) e nt 461-480 (BoHV-5)] anelam em regiões conservadas dos genomas de ambos os vírus, amplificando um produto de 159 pares de bases (pb) para BoHV-5 e 354 pb para o BoHV-1.

Como controle positivo para a reação, foram utilizadas amostras virais de BoHV-1 e BoHV-5 cedidas cordialmente pelo Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG. Como controle interno da reação, foi desenhado um par de *primers* direcionados ao gene da β -actina bovina, número de acesso AY141970.1, primer senso (5'-CAGGGGAGGTGATCGCTTTT-3') e primer antisenso (5'-GGTCCATGATGGCTGTCCATT-3').

As condições da PCR foram adaptadas de Claus et al.³⁰. Para cada reação, foi utilizada a concentração de 100 ng/ μ L de DNA extraído realizada PCR convencional, onde as reações foram processadas separadamente para BoHV-1 e BoHV-5. No PCR mix, foram adicionados 15,8 μ L de água ultrapura, 2,5 μ L de tampão de enzima (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 1,0 μ L de $MgCl_2$ ($MgCl_2$ -50 mM), 2,0 μ L de dNTP's (100 mM dNTP set, PCR grade - dATP, dCTP, dGTP, dTTP- Invitrogen by Life TechnologiesTM – Cat. Nos. 10297-018), 1,0 μ L de DMSO à 10%, 1,0 μ L de cada primer 0,4 mM, 0,2 μ L Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen®, Brasil), totalizando um volume final de 25 μ L.

As condições utilizadas para amplificar o DNA de ambos os vírus, totalizando 40 ciclos, foram: 94°C por 1 min, etapa de desnaturação inicial; 95°C por 1 min, desnaturação de DNA; a terceira etapa é o anelamento dos *primers*, 58°C por 1 min; 72°C por 1min, fase de extensão; 72°C por 7 min, etapa de extensão final.

O material foi amplificado em termociclador automático modelo T100TM (BioRad – cat #: 186-1096). Em todas as reações, eram incluídas as amostras virais padrão de BoHV-1 e BoHV-5 como controle positivo e água ultra pura esterilizada como controle negativo.

Posteriormente, foi realizada eletroforese utilizando gel de agarose a 1% (Ultra PureTM agarose - InvitrogenbylifeTechnologiesTM cat #16500-100) corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL). O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 1Kb (Plus DNA Ladder - Thermoscientific – Cat # SM1331). A visualização das bandas foi realizada por um sistema eletrônico Gel DocTM EZ System (Bio-RadCat # 170-8270) acoplado à um computador.

Considerou-se, para efeitos de registro de frequência, o número total de casos (18), independente da quantidade de blocos em cada caso.

4. RESULTADOS

Foram analisados 18 casos no período entre 2007 à 2012, totalizando 44 blocos. Na análise dos amplicons obtidos para o BoHV-5 (159 pb), nenhuma amostra foi positiva no grupo I, duas positivas (nº casos: 156-09 e 333-11) no grupo II, três positivas (nº casos: 72-08, 12-10 e 134-11) no grupo III (Quadro 1).

QUADRO 1 – Resultados da PCR convencional para detecção dos vírus BoHV-1 e BoHV-5 em amostras de encéfalo bovino incluídas em parafina.

Grupo	Nº Caso	BoHV-1	BoHV-5
I	08-11	-	-
	25-11	-	-
	312-11	-	-
	313-11	-	-
	196-12	-	-
II	107-07	-	-
	137-08	-	-
	39-09	-	-
	136-09	-	-
	156-09	-	+
	176-09	-	-
	01-10	-	-
	123-10	-	-
	333-11	-	+
III	72-08	-	+
	355-09	-	-
	12-10	-	+
	134-11	-	+

Os casos positivos podem ser visualizados na figura 4. Das amostras analisadas, 28% (5/18) foram positivas para BoHV-5, sendo 11% (2/18) amostras do grupo com encefalite inespecífica e 17% (3/18) do grupo com encefalite e positivos para o vírus da raiva.

No teste para verificação das bandas (354pb) para o BoHV-1 (Figura 4), todas as amostras, 100% (18/18) foram negativas.

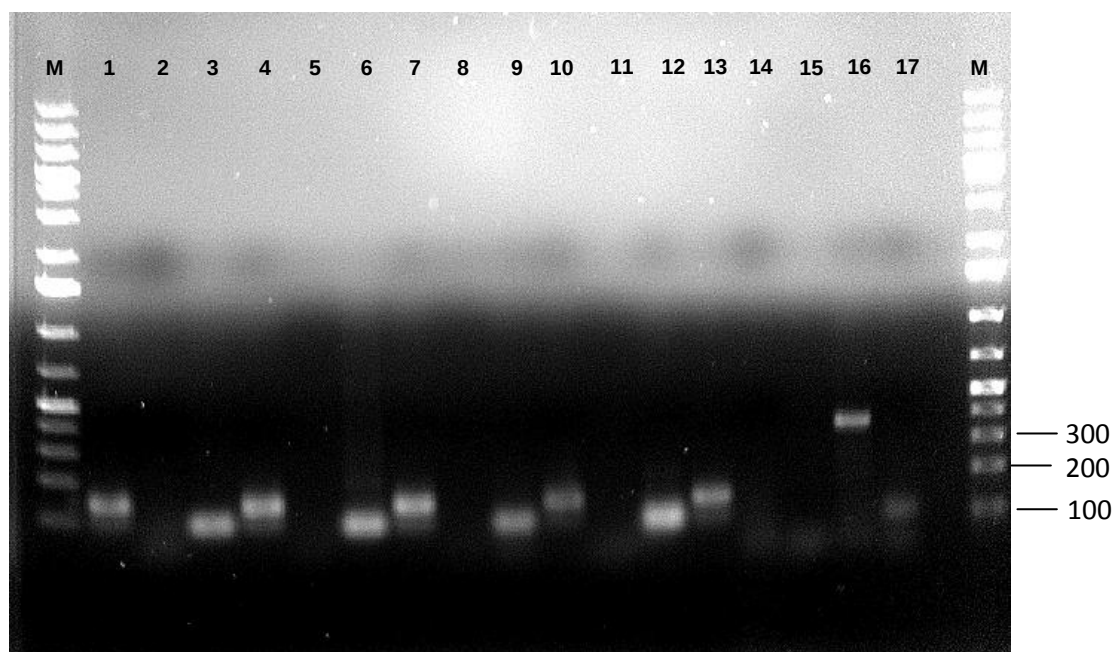


Figura 4 - Imagem de gel de agarose à 1% demonstrando o resultado da amplificação em amostras extraídas de material fixado em formalina e incluído em parafina do encéfalo de bovinos para o BoHV-1 (354 pb) e BoHV-5 (159 pb). M= marcador de 1Kb (Plus DNA Ladder - Thermoscientific – Cat # SM1331); 1, 4, 7, 10 e 13 = amostras positivas para BoHV-5; 2, 5, 8, 11 e 14 = amostras negativas para BoHV-1; 3, 6, 9, 12 e 15 = controle interno da reação β -actina bovina (120 pb); 16 = controle positivo para BoHV-1; 17 = controle positivo para BoHV-5.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrada a presença do DNA do herpesvírus bovino tipo 5 e ausência de DNA do tipo 1 em amostras de encéfalo fixadas em formalina e incluídas em parafina. Desde que o BoHV-5 foi reconhecido como uma entidade separada do BoHV-1, alguns estudos com amostras de cérebro demonstraram a presença do DNA desse vírus^{18,84}. Assim, os casos de infecção neurológica passaram a ser genericamente atribuídos ao BoHV-5, enquanto os herpesvírus isolados de doença respiratória e genital eram classificados como BoHV-1, mesmo sem confirmação antigênica e/ou molecular de sua identidade²³.

No presente estudo, todas as amostras testadas foram negativas para BoHV-1. Esse resultado também foi encontrado por Claus et al.⁷⁶, que utilizaram amostras encefálicas congeladas e não constatarem amplificação de DNA do BoHV-1 em nenhuma das amostras de SNC analisadas. Ainda corroborando o presente estudo, Arruda et al.⁸⁴ fizeram análise de 76 amostras de encéfalo bovino, também de blocos de parafina do arquivo da patologia em Mato Grosso, não identificaram DNA de BoHV-1 em nenhum dos casos.

A detecção de 28% (5/18) de amostras positivas para BoHV-5 vem ao encontro dos relatos que indicam a ampla circulação de BoHV-5 no Brasil^{91,63}. Esses mesmos autores enfatizam a importância de realizar testes que diferenciem na rotina laboratorial os tipos 1 e 5.

No presente estudo, foi utilizado material fixado em formalina e incluído em parafina, e por meio da PCR convencional detectou-se 28% das amostras positivas para BoHV-5. Ely et al.⁹² também utilizaram material FFPE e identificaram, em 32 casos, 21,8% positivos para BoHV-5. Ferrari et al.³⁴ utilizaram 21 casos de necropsia e detectaram 75% positividade para esse mesmo vírus. Já Arruda et al.⁸⁴ utilizando a técnica de multiplex PCR, identificaram, em 76 amostras, 32,89% positivas para BoHV-5.

É importante ressaltar que, na presente pesquisa, não foi discriminada a porção encefálica de onde as amostras foram colhidas, assim como nos estudos mencionados anteriormente. Por sua vez, Cunha⁹³ realizou extração do encéfalo congelado, em bovinos infectados experimentalmente com BoHV-5, e PCR de seis regiões pré-determinadas do SNC (bulbo olfatório, córtex frontal, córtex occipital, núcleos da base, tálamo e o gânglio do trigêmeo). Em um total de 36 áreas analisadas, o autor observou que 66,67% (24/36) foram positivas para BoHV-5 e identificou DNA viral no córtex frontal em 100% dos

casos positivos. Resultados semelhantes foram descritos em bovinos naturalmente^{44,59,74,72} ou experimentalmente⁸² infectados pelo BoHV-5.

Cagnini²⁵ também extraiu DNA de amostras FFPE, porém essas foram oriundas de infecção experimental de BoHV-5 em seis bezerros. O autor relata um total de 108 áreas do SNC analisadas, 35,19% foram positivas para BoHV-5. Nesta pesquisa, 28% das amostras foram positivas para o mesmo vírus; porém, caso houvesse sido realizada uma análise seriada do encéfalo, possivelmente um maior número de amostras positivas seria registrado.

O tipo e o tempo de conservação das amostras são aspectos que devem ser discutidos. O tempo de fixação em formalina causa degradação do DNA e compromete o resultado da análise⁹⁴. Arruda et al.⁸⁴ relatam que a positividade, para *herpesvírus* bovino, foi maior em amostras que permaneceram por menos de 40 dias em solução de formol. Dentre 18 amostras que foram incluídas com menos de 40 dias, encontraram 12 (66,6%) positivas para BoHV-5. Os autores relataram também que dentre sete amostras que permaneceram mais de um ano em formol, apenas 2 (28,5%) amplificaram DNA viral. Em nosso trabalho não foi possível estimar o tempo de fixação das amostras, dificuldade essa em virtude de serem amostras oriundas de arquivo do laboratório.

O fato de extrair DNA utilizando material fixado em formol e incluído em parafina, como no presente trabalho, pode ser amplamente vantajoso para rotina laboratorial, pois serve de exame complementar e direciona o diagnóstico definitivo. No entanto, ressalta-se que a qualidade do resultado da extração de DNA viral pode ser reduzida em tecidos conservados em formalina. Por exemplo, Ferrari et al.³⁴ analisaram 20 amostras de SNC na tentativa de identificar BoHV-5, cada amostra foi conservada uma parte em formol e outra parte foi congelada. Obtiveram 17 (85%) positividade nas amostras congeladas, já nas fixadas em formol foi de 15 (75%), além disso, 3 (15%) foram negativas nas amostras congeladas e 5 (25%) nas fixadas em formol.

No presente trabalho, a técnica utilizada para identificar BoHV-1 e BoHV-5 foi a de PCR convencional, a mesma utilizada por outros autores^{26,27,28,29}. Outro método bastante utilizado para identificação de diferentes herpesvírus em uma única reação, que é a multiplex PCR^{30,31,32}, a qual pode apresentar a vantagem de apresentar resultados em uma única etapa de amplificação, pois utiliza simultaneamente *primers* direcionados ao DNA viral de BoHV-1 e BoHV-5.

No presente estudo, foram utilizadas amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, mas a PCR convencional também tem sido estudada em amostras do SNC de bovinos provenientes de frigoríficos. Campos et al.²⁷ coletaram 400 amostras de gânglio trigêmeo, em frigoríficos no Estado do Rio Grande do Sul. As amostras foram submetidas à técnica de PCR, para BoHV-5. O DNA viral foi identificado em 299 amostras (74,8%), sendo que 82 amostras foram negativas (20,5%) e 19 foram inconclusivas (4,7%). A vantagem de se utilizar amostras já incluídas em parafina é que há possibilidade de realização de uma triagem prévia dos casos suspeitos pelo exame histológico, o que reduz os gastos com material e pessoal técnico especializado para a realização da PCR.

Na investigação em tela, a técnica de PCR para detecção de BoHV-1 e BoHV-5 foi adaptada de Claus et al.³⁰. Porém, ainda que tenham utilizado os mesmos *primers*, aqueles autores utilizaram a multiplex PCR, tendo colhido 14 amostras do encéfalo de bovinos, sendo sete de animais com sinais neurológicos e sete de animais provenientes de frigoríficos. As 14 amostras foram submetidas à IFD, cujo resultado foi negativo para raiva. Ao realizar a técnica de mutiplex PCR para BoHV-5 e BoHV-1, foram identificadas três amostras positivas para BoHV-5 nos animais que tinham sinais de encefalite. Como não foi amplificado DNA de BoHV-1 e BoHV-5 em nenhuma amostra proveniente dos frigoríficos, aqueles animais foram considerados sem nenhuma doença neurológica, o mesmo resultado encontrado no presente experimento no grupo controle, em cujas amostras não foi amplificado DNA de nenhum herpesvírus.

Apesar da ocorrência de BoHV-5 em 28% das amostras encontradas neste trabalho, não se pode afirmar que esse agente seja necessariamente o causador da enfermidade neurológica pela qual os animais vieram a óbito. Como não foi realizada a técnica de isolamento viral neste estudo, não se pode descartar a possibilidade do vírus estar presente no organismo do animal em sua forma latente⁹⁵.

Do total de amostras positivas para herpesvírus, três (3/18) foram positivas também para o vírus da raiva. A identificação de DNA de herpesvírus sem isolamento viral não certifica a ocorrência de uma infecção ativa, podendo o vírus apenas estar latente no interior dos resultados encontrados neste estudo estão em acordo com os achados de Spilki et al.⁹⁵, que relataram infecção mista do BoHV-5 e do vírus rábico em um único bezerro que morreu com sinais clínicos compatíveis com doença neurológica. Esses autores afirmam que, quando se identifica o vírus da raiva no encéfalo de animais que

vieram a óbito com sinais neurológicos e devido à natureza e fatalidade da doença, geralmente não há interesse em buscar outros possíveis agentes.

Ressalta-se, entretanto, que não há parâmetros suficientes para descartar a possibilidade de infecção concomitante ou um maior papel dos *herpesvírus* na produção da doença neurológica, tendo em vista que nenhuma das amostras foram submetidas ao isolamento viral.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

O DNA de BoHV-5 em amostras extraídas de blocos de parafina está presente em amostras com diagnóstico histológico de encefalite;

Amostras de encéfalos positivos para o vírus da raiva podem conter DNA de BoHV-5;

Nas amostras estudadas, o DNA BoHV-1 está ausente;

Nenhuma das amostras de encéfalo com aspecto histológico de normalidade apresenta DNA de herpesvírus bovinos BoHV-1 e BoHV-5.

REFERÊNCIAS

1. Barros CSL, Marques GHF. Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Defesa Animal; 2003.
2. Informações sobre exportações e importações da carne bovina. Banco de dados mantido por Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO [acesso 07 jan 2014]. Disponível em: <http://www.fao.org>.
3. Produção da Pecuária Municipal 2011. Banco de dados mantido por Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE [acesso 07 jan 2014]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.
4. Rubin LS, Ilha AS, Waquil PD. O comércio potencial brasileiro de carne bovina no contexto de integração regional. Rev. Econ. Sociol. Rural. 2008;46(4):1067-1093.
5. Aquino Neto HM, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira PM, Barbosa-Stancioli EF, Lobato ZIP, Alvarenga MR, Serrano AL, Martins RA, Afonso DAF. Meningoencefalite por herpesvírus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. Arqu. Bras. Med. Vet. Zootec. 2009;61(1):1-5.
6. Callan RJ, Van Metre DC. Viral diseases of ruminant nervous system. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2004;20:327-362.
7. Almond J, Pattison J. Human BSE. Nature. 1997;389:437-438.
8. Galiza GJN, Silva MLCR, Dantas AFM, Simoes SVD, Riet-Correa F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. Pesqui Vet Bras. 2010;30(3):267-276.
9. Sanches AWD, Langohr IM, Stigger AL, Barros CSL. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. Pesqui. Vet. Bras. 2000;20(3):113-118.
10. Rech RR. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. [Tese]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais; 2007.
11. Rissi DR, Pierezan F, Oliveira-Filho JC, Lucena RB, Carmo PMS, Barros CSL. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. Pesqui. Vet. Bras. 2010;30(11):958-967.
12. Lemos RAA. Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinária; 2005.
13. Oliveira TS, Bull V, Rezende CA, Furtini R, Costa EA, Paixão TA, Santos RL. Perfil das amostras do sistema nervoso central de bovinos com síndrome neurológica e diagnóstico da raiva bovina no serviço de defesa sanitária de Minas Gerais, 2003-2010. Pesqui. Vet. Bras. 2012;32(4):333-339.
14. Santos MFC, Resende RM, Sobrinho RN, Vieira S. Diagnóstico laboratorial da raiva no Estado de Goiás no período de 1976 a 2001. Cienc. Anim. Bras. 2006;7(1):77-83.
15. Brasil. Controle da raiva dos herbívoros. Brasília: MAPA/SDA/DAS; 2005. 104p.
16. Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. Semina Ci Agr. 2006;27(2):289-298.

17. Rufino FA, Seneda MM, Alfieri AA. Impacto do herpesvírus bovino 1 e do vírus da diarreia viral bovina na transferência de embriões. *Arch. Vet. Sci.* 2006;11(1):78-84.
18. Silva AM, Flores EF, Weiblen R, Botton AS, Irigoyen LF, Roehe PM, Brum MC, Canto NC. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). *Pesqui. Vet. Bras.* 1998;18(3-4):99-106.
19. Caron L, Flores EF, Weiblen R, Scherer CFC, Irigoyen LF, Roehe PM, Odeon A, Sur JH. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.* 2002;84: 285-295.
20. Miller JM, Whetstone CA, Van Der Maaten MJ. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by endonucleases analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 1991;52(3):458-461.
21. Whetstone CA, Miller JM, Bortner DM, Van Der Maaten MJ. Changes in the bovine herpesvirus 1 genome after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch. Virol.* 1989;106(3-4):261-179.
22. Spilki FR, Silva AD, Batista HBCR, Oliveira AP, Winkelmann E, Franco AC, Porciuncula JA, Roehe PM. Field evaluation of during gestation and horizontal spread of a recombinant differential bovine herpesvirus1 (BoHV-1) vaccine. *Pesqui. Vet. Bras.* 2005;25:54-58.
23. Silva MS, Brum MCS, Weiblen R, Flores EF. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesqui. Vet. Bras.* 2007;27(10):403-408.
24. Hubner SO, Pescador C, Corbellini LG, Driemeier D, Spilki FR, Roehe PM. Otimização da imunoistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. *Arqu. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2005;57(1):1-6.
25. Cagnini DQ. Avaliação histopatológica, imunoistoquímica e detecção molecular do DNA viral no sistema nervoso central de bovinos inoculados experimentalmente com o herpesvirus bovino 5. [Dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2011.
26. Vogel FSF, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Mayer SV, Bastos RG. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(10):4512-4520.
27. Campos FS, Franco AC, Hübner SO, Oliveira MT, Silva AD, Esteves PA, Roehe PM, Rijsewijk FAM. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet. Microbiol.* 2009;139:67-73.
28. Isernhagen AJ, Cosenza M, Costa MC, Medici KC, Balarin MRS, Bracarense APFRL, Alfieri AA, Lisboa JAN. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. *Can. Vet. J.* 2011;52(12):1312-1318.
29. [Cardoso TC](#), [Antello TF](#), [Vieira FV](#), [Machado ST](#), [Nogueira AH](#). Estimation of the diagnostic accuracy of the glyco-C and US9 gene-based polymerase chain reaction technique for the detection of bovine Herpesvirus type 5 DNA in decomposed

- brain suspension from a slaughter house using Bayesian analysis, Brazil. Trop. Anim. Health Prod. 2012;44(3):379-382.
30. Claus MP, Alfieri AF, Folgueras-Flatschart AV, Wosiacki SR, Medici KC, Alfieri AA. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. J. Virol. Methods. 2005;128:183-188.
 31. Diallo IS, Corney BG, Rodwell BJ. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 2011;175: 46-52.
 32. Fonseca Jr AA, Costa EA, Oliveira TS, Sales EB, Sales ML, Leite RC, Heneimann MB, Reis JKP. PCR Multiplex para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes. Arqu. Bras. Med. Vet. Zootec. 2011;63(6):1405-1413.
 33. [Diel DG](#), [Almeida SR](#), [Brum MC](#), [Dezengrini R](#), [Weiblen R](#), [Flores EF](#). Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. Vet. Microbiol. 2007;121:257-267.
 34. Ferrari HF, Luvizotto MCR, Rahal P, Cardoso TC. Detection of bovine *Herpesvirus* type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. J. Virol. Methods. 2007;146:335-340.
 35. Roizman B. The family Herpesviridae: an update. Arch. Virol. 1992;123:432-445.
 36. Schwyzer M, Ackermann M. Molecular Virology of ruminant herpesviruses. Vet. Microbiol. 1996;53:17-29.
 37. Franco AC, Roehe PM, Varela APM. Herpesvirinae. In: Flores EF. Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas. Santa Maria:UFSM; 2012. p. 503-570.
 38. Roizmann B, Knipe MD. Herpes simplex vírus and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanok RM, Monath TP, Melnick JL, Roizmann B, Straus SE, editors. Fields Virology. 2a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.2231-2295.
 39. Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL. Genome of bovine herpesvirus 5. J. Virol. 2003;77(19):10339-1347.
 40. Chowdhury SI. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. Virology. 1995;10(213):558-568.
 41. Del Médico Zajac MP, Ladelfa MF, Kotsias F, Muylkens B, Thiry J, Romera SA. Biology of bovine herpesvirus 5. Vet. J. 2010;184:138-145.
 42. Edwards S, Newman RH, White H. The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. Br. Vet. J. 1991;147:216-231.
 43. Rijsewijk FA, Kaashoek MJ, Langeveld JP, Melen R, Judek J, Bienkowska-Szewczyk K, Maris-Veldhuis MA, Van Oirschot JT. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. J. Gen. Virol. 1999;80:1477-1483.
 44. Salvador CS, Lemos RAA, Riet-Correa F, Roehe PM, Osório ALAR. Meningoencefalite em bovinos causada por bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. Pesqui. Vet. Bras. 1998;18(2):76-83.
 45. Chowdhury SI, Mahmood S, Simon J, Al-Mubarak A, Zhou Y. The Us9 gene of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) effectively complements a Us9-null strain of BHV-

- 5 for anterograde transport, neurovirulence, and neuroinvasiveness in a rabbit model. *Virology*. 2006;80(9):4396-4405.
46. Silva AM, Weiblen R, Flores EF, Roehe PM, Sur HJ, Osorio FA. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Vet. Microbiol.* 1999;66:89-99.
 47. Alice FJ. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. *Rev. Bras. Biol.* 1978;38(n.4):919-920.
 48. Mueller SBK, Ikuno AA, Campos MTGR, Ribeiro LOC. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IPV/IBR). *Arqu. Inst. Biol.* 1978;45(3):187-190.
 49. Lovato LT, Weiblen R, Tobias FL, Moraes MP. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural.* 1995;25(3):425-230.
 50. Vidor T, Halfen DC, Leite TE, Coswig LT. Herpes Bovino Tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Cienci. Rural.* 1995;25(3):421-424.
 51. Rissi DR, Pierezan F, Silva MS, Flores EF, Barros CSL. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008;20:346-349.
 52. Medici KC, Alfieri AA, Alfieri AF. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Cienc. Rural.* 2000;30(2):347-350.
 53. Richtzenhain LJ, Barbarini O, Umehara O, Gracia AS, Cortez A, Heinemann MB, Ferreira F. 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.* 1999;66(1):83-88.
 54. Rocha MA, Gouveia AMG, Lobato RC, Leite RC. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arqu. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2001;53(6):645-647.
 55. Melo CB, Lobato ZIP, Camargos MF, Souza GN, Martins NRS, Leite RC. Distribuição de anticorpos para herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos. *Arqu. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2002;54(6):575-580.
 56. Barbosa ACVC, Brito WMED, Alfaia BT. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Cienc. Rural.* 2005;35(6):1368-1373.
 57. Faria BO, Freneau GE, Brito WMED, Campos Jr ACP, Vieira S. Estudo de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em municípios de entorno de Goiânia, Go. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2003;27(3):543-545.
 58. Vieira S, Brito WMED, Souza WJ, Alfaia BT, Linhares DC. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. *Cienci. Anim. Bras.* 2003;4(2):131-137.
 59. Colodel EM, Nakasato L, Weiblen R, Mello RM, Silva RRP, Souza MA, Filho JAO, Caron L. Meningoencefalitenecrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. *Cienc. Rural.* 2002;32(2):293-298.
 60. Metzler AE, Schudel AA, Engels M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch. Virol.* 1986;87:205-217.

61. Suarez AH, Metzler AE, Weiblen R, Berrios P, Schudel AA. Molecular characterization of south American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. *J. Vet. Med.* 1993;40:125-130.
62. Diallo IS, Hewitson GR, Hoad J, Turner S, Corney BG, Rodwell BJ. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. *Aust. Vet. J.* 2010;88(3): 93-95.
63. Oliveira MT, Campos FS, Dias MM, Velho FA, Freneau GE, Brito WMED, Rijsewijk FA M, Franco AC, Roehe PM. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology.* 2011;75:1139-1145.
64. Roehe PM, Silva TG, Nardi NB, Oliveira LG, Rosa JCA. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BOHV-1) e herpesvírus da encefalite (BOHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesqui. Vet. Bras.* 1997;17(1)41-44.
65. D'Offay JM, Mock RE, Robert W, Fulton DVM. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.* 1993;54:534-539.
66. Odeón AC, Spath EJA, Paloma EJ, Leunda MR, Fernandez Sainz IJ, Perez SE, Kaiser GG, Draghi MG, Cetrá BM, Cano A. Seroprevalencia de La diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio em Argentina. *Ver Med Vet.* 2001;82:216-220.
67. Batista HBCR, Schmidt E, Spilki FR, Franco AC, Roehe PM. Herpesvírus 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. Zootec.* 2010; 62(5):1023-1028.
68. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary Virology*, 3a ed. San Diego: Academic Press; 1999. 629p.
69. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 2007;38:181-209.
70. Halfen DC, Vidor T. Infecções por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5 In: Riet-Correa F, Schild AL, Méndez MC, Lemos RAA. editors. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. São Paulo: Varela; 2001. 426 p.
71. Riet-Correa G, Duarte MD, Barbosa JD, Oliveira CMC, Cerqueira VD, Brito MF, Riet-Correa F. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesqui. Vet. Bras.* 2006;26(1)44-46.
72. Rissi DR, Oliveira FN, Rech RR, Pierezan F, Lemos RAA, Barros CSL. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesqui. Vet. Bras.* 2006;26(2):123-132.
73. Lunardi IM, Claus MP, Lisbôa JAN, Amude AM, Headley SA, Alfieri AF, Alfieri AA. Neurological and Epidemiological Aspects of a BoHV-5 Meningoencephalitis Outbreak. *Braz Arch Biol Technol.* 2009;52:77-85.
74. Elias F, Schild AL, Riet-Correa F. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesqui Vet Bras.* 2004;24(3):123-131.
75. Spilki FR, Esteves PA, Silva TC, Franco AC, Driemeier D, Roehe PM. Cortical necrosis and cerebral atrophy in calves experimentally infected with bovine herpesvirus type 5. *Acta Sci Vet.* 2011;39(1):953

76. Claus MP, Alfieri AF, Medici KC, Lunardi M, Alfieri AA. 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. Microbiol.* 2007;38:485-490.
77. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis.* 2004;4:337-48.
78. Luvizotto MCR, Ferrari HF, Cardoso TC. Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in young calves (*Bos indicus*): a case report. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2010;16(1):178-185.
79. Faizee N, Hailat NQ, Ababneh MMK, Hananeh WM, Muhadait A. Pathological, immunological and molecular diagnosis of rabies in clinically suspected animals of different species using four detection techniques in Jordan. *Transbound Emerg Dis.* 2012; 59:154-164.
80. 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. *Arch. Virol.* 2001;146:633-652.
81. D'Arce RCF, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki F, Roehe PM, Arns CW. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 2002;88:315-324.
82. Perez SE, Vagnozzi A, Sur JH, Odriozola E, Campero CM, Odeon AC. Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. *Revta Arg. Microbiol.* 2003;35:69-73.
83. Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem. Cell Biol.* 2004;122:211-218.
84. Arruda LP, Nakazato L, Dutra V, Lemos RAA, Nogueira APA, Cruz RAS, Pescador CA, Colodel EM. Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalo conservadas em formol e emblocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica. *Pesqui. Vet. Bras.* 2010;30(8):646-650.
85. Flores EF, Cargnelluti JF. Diagnóstico Laboratorial de infecções víricas. In: Flores EF. *Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas.* Santa Maria:UFSM; 2012. p. 326-365.
86. Ogilvie M. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Reviews Med. Virol.* 2001;11:351-354.
87. Kennedy M. Methodology in diagnostic virology. *Vet. Clin. Exotic Anim. Pract.* 2005;8:7-26.
88. Brum MCS, Weiblen R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: Flores EF. *Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas.* Santa Maria:UFSM; 2012. p.54-82.
89. Deregts D, Cho HJ, Kozub GC. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. *Canad. J. Vet. Res.* 1993;57(1):56-59.
90. Graham DA, Mawhinney KA, Mcshane J, Connor TJ, Adair BM, Merza M. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997;9(1):24-31.

91. Holz CL, Cibulski SP, Teixeira TF, Batista HBCR, Campos FS, Silva KR, Varela APM, Cenci A, Franco AC, Roehe PM. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesqui Vet Bras.* 2009;29(9):767-773.
92. Ely RW, D'Offay JM, Ruefer AH, Cash CY. Bovine herpesvirulencephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin embedded brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996;8:487-492.
93. Cunha PHJ. Polioencefalomalacia experimentalmente induzida pela ingestão de dieta com alto teor de enxofre ou pelo herpesvírus bovino 5 em bovinos. [Tese] Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2010.
94. Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab. Invest.* 1994;71(4):604-611.
95. Spilki FR, Franco AC, Teixeira MB, Esteves PA, Schaefer R, Schmidt E, Lemos RA, Roehe PM. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. *Pesqui. Vet. Bras.* 2003;23(1):1-4.

ANEXO 1. Técnicas moleculares, oligonucleotídeos iniciadores (primers), alvos, tamanho dos produtos e tecidos analisados para o diagnóstico do BoHV-1 descritos na literatura entre os anos de 1997 e 2012.Os anexos

Referência	Técnica	Oligonucleotídeos iniciadores	Alvo	Produto	Amostra
Alegre et al., 2001	M-PCR	F 5'-AGACCCCAGTTGTGATGAATGC-3' R 5'-ACACGTCCAGCACGAACACC-3'	TK	183pb	Swab nasal
Arruda et al., 2010	PCR conv	F 5'-CAACCGAGACGGAAAGCTCC-3' R5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3'	gC	354bp	SNC (FFPE)
Ashbaugh et al., 1997	Nested PCR	F 5'-GCGGGGGCTCGCCGAGGA-3' R 5'-GGGAGCGCACGGTCAGGGGC-3' F 5'- CTCGCCTCCGCCCTCCCCGTG-3' R 5'- AGGCCGCCCCCGCCGCTAG-3'	gC	653pb ^d 274pb	Swab nasal, gânglio trigêmeo
Clauset al., 2005	Multiplex-PCR	F 5'-CAACCGAGACGGAAAGCTCC-3 R5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3	-	354bp	SNC (TF)
Costa et al., 2005	PCR	F5'-AAGTGCACACCGTGTAT TTGCG-3' R5'-TTGCATTACTTTTGGGGTCAAATGTG-3'	gB	308pb	Cultivo celular
Diallo et al., 2011	Multiplex qPCR	F 5'-GGTACATGTCCAGGGAAAC-3' R 5'-GGTACAACATCGTCAACTTC-3'	-	-	Especimes clínicos (swabs)
Fonseca Jr et al., 2011	M-PCR	F 5'-TCTTTACGGTCGACGACTCC-3' R 5'-GAAGTACACGCGCAGCTC-3'	gC	191bp	SNC(TF)
Roset al., 1999	Nested PCR	F 5'-TCGAARGCCGAGTACCTGCG-3' R 5'-CCAGTCCCAGGCRACCGTCAC-3' F 5'-TGGTGGCCTTYGACCGCGAC-3' R 5'-GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG-3'	gB	294pb ^d 426pb	Sêmen e gânglio trigêmeo.
Vogelet al., 2003	PCR	F5'-GTGGTGGCCTTTGACCGCGAC-3' R5'-GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG-3'	gB	273pb	Encéfalo (TF)

ANEXO 2. Técnicas moleculares, oligonucleotídeos iniciadores (primers), alvos, tamanho dos produtos e tecidos analisados para o diagnóstico do BoHV-5 descritos na literatura entre os anos de 1997 e 2012.

Referência	Técnica	Oligonucleotídeos iniciadores	Alvo	Produto	Amostra
Ferrari et al., 2007	PCR	F5'-CGGACGAGACGCCCTTGG-3' R5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3'	gC	159pb	Encéfalo (FFEP)
Sá e Silva et al., 2007 ^a	PCR	F 5'-GCGGGGGCTCGCCGAGGA-3' R 5'-GGGAGCGCACGGTCAGGGGC-3'	gC	589pb	Cultivo celular
Sá e Silva et al., 2007 ^b	PCR	F 5'-GCGGGGGCTCGCCGAGGA-3' R 5'-GGAGCGCACGGTCAGGGC-3'	gC	589pb	Cultivo celular
Alegre et al., 2001	M-PCR	F 5'-GCCCCGAGTTTCCCCTACC-3' R 5'-CGCACCCGCTCTCAATCTT-3'	gD	564pb	Secreção nasal e sêmen
Clauset al., 2005	M-PCR	F 5'-CGGACGAGACGCCCTTGG-3' R 5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3'	gC	159pb	SNC, linfonodos, pulmão, rim (TF)
Clauset al., 2007	M-PCR	F 5'-CGGACGAGACGCCCTTGG-3' R 5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3'	gC	159pb	SNC (TC)
Lunardiet al., 2009	M-PCR	F 5'-CGGACGAGACGCCCTTGG-3' R 5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3'	gC	159bp	SNC(TF)/LCR
Lisboa et al., 2009	M-PCR	F 5'-CGGACGAGACGCCCTTGG-3' R 5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3'	gC	159bp	SNC (TF)/LCR
Arruda et al., 2010	M-PCR	F 5'-CGGACGAGACGCCCTTGG-3' R 5'-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3'	gC	159bp	SNC (FFPE)
Dialloet al., 2011	M-PCR	F 5'-GGTACTTCTTCTTGGTGATG-3' R 5'-TCGGTCTTCGTCAAGTTC-3'	-	-	SNC e sêmen(TF)
Fonseca Jr et al., 2011	M-PCR	F 5'-TCTTTACGGTCGACGACTCC-3' R 5'-GAAGTACACGCGCAGCTC-3'	gC	191bp	SNC(TF)
Ashbaughet al., 1997	Nested PCR	F 5'-GCGGGGGCTCGCCGAGGA-3' R 5'-GGGAGCGCACGGTCAGGGGC-3'	gC	589bp	SNC (TC e FFPE)
Gomes et al., 2002	Nested PCR	F 5'-GCTGTTTTGCGGCGCCCCGCG-3' R 5'-GTAGGGGAAACTGCGGGCAGA-3' F 5'-TACGGAAGTCCGGATTAACA-3' R 5'-GTCACCACTACCACCGCCGCCAACAT-3'	gG	1297bp ^d 222bp	SNC (TC e FFPE)

ANEXO 2. Continuação...

Referência	Técnica	Oligonucleotídeos iniciadores	Alvo	Produto	Amostra
Dielet al., 2007	Nested PCR	F 5'-CCAGTCCAGGCAACCGTCAC-3' R 5'-CTCGAAAGCCGAGTACCTGCG-3' F 5'-GTGGTGGCCTTTGACCGCGAC-3' R 5'-GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG-3'	gB	444bp ^d 295bp	SNC e TG (TF)
Campos et al., 2009	Nested PCR	F 5'-CGGCCACGACGCTGACGA-3' R 5'-CGCCGCCGAGTACTACCC-3' F 5'-GTGGAGCGCCGCTTCGC-3' R 5'-TATCGCGAGAGCAGGCG-3'	gC	572bp 236bp	Gânglios de Glasser (TC)
Pedraza et al., 2010	Nested PCR	F 5'-CCGGCGATTACGAGGACGAG-3' R 5'-TGCGGGCAGACGCGGGCGCG-3' F 5'-TACGGACTGCCGGATTAA-3' R 5'-GTCACCACTACCACCGCCGCAAC-3'	gG	592bp ^d 222bp	Encéfalo (FFPE)
Mayer et al., 2006	Nested PCR	F 5'-CCAGTCCAGGCAACCGTCAC-3' R 5'-CTCGAAAGCCGAGTACCTGCG-3' F 5'-GTGGTGGCCTTTGACCGCGAC-3' R 5'-GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG-3'	gB	444bp ^d 295bp	SNC e TG (TF)

