

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

**IDENTIFICAÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO EM AMOSTRAS DE
CÉREBRO**

Duanne Alves da Silva

Orientadora: Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito – UFG

GOIÂNIA

2011

IDENTIFICAÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO EM AMOSTRAS DE CÉREBRO

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

Área de Concentração:

Sanidade animal, higiene e tecnologia de alimentos

Orientadora:

Prof. Dr. Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista de Brito

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe

GOIÂNIA

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

S586i Silva, Duanne Alves.
Identificação de herpesvírus bovino em amostras de cérebro
[manuscrito] / Duanne Alves da Silva. - 2011.
50f. : il., figs, tabs.

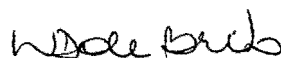
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.
Bibliografia.
Inclui listas de figuras e quadros
Anexo.

1. Herpesvírus – Bovino. I. Título.

CDU: 619:616.523

DUANNE ALVES DASILVA

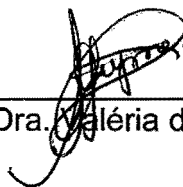
Dissertação defendida e aprovada em **24/02/2011**, pela
Banca
Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Wíliam Marta Elsner Diederichsen De
Brito
(ORIENTADO
R (A))



Prof. Dr. Clayton Bernardinelli Gitti - UFRRJ/RJ



Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

Dedico este árduo trabalho aos meus amados pais Luiz e Severina, que me apoiaram em todos os momentos desde a seleção para ingressar no curso de mestrado, sofrendo comigo a cada dificuldade encontrada e se alegrando a cada etapa vencida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus amado, por me dar saúde, coragem e disposição para chegar até aqui, permitindo que eu ingressasse no curso de mestrado, uma aprovação que era impossível aos olhos naturais. Obrigada meu Senhor!

Ao meu paizinho e minha mãezinha tão queridos por permitirem, mesmo discordando, que eu partisse para uma cidade estranha abrindo mão da minha presença debaixo das suas asas para buscar novos projetos. Pelo amor e cuidado incondicionais demonstrados no apoio e incentivo que sempre dedicaram a mim, embarcando nas minhas loucuras e acreditando num potencial que, por vezes, eu desconhecia ter. Vocês são meu norte e porto seguro, sem os quais não seria possível chegar até aqui. Amo muito vocês, obrigada por tudo!

Aos meus amados pastores Luciano e Ketilane que, mesmo de longe, sempre me direcionaram a luz da palavra de Deus com seus ensinamentos.

Ao Gustavo, por estar ao meu lado todos esses anos, participando de cada pequeno detalhe. Pelas noites que passou em claro estudando comigo, mesmo sem entender muita coisa, desde a seleção para o mestrado até as vésperas dos seminários. Por me aturar nas crises de choro quando as PCRs não funcionavam e por se alegrar comigo a cada desafio vencido. “Mais ou menos não serve, tem que ser o melhor!” Essa conquista também é sua!

A professora Valéria, sempre disposta a ajudar com seus preciosos conselhos e trabalhos em congressos, sem a qual eu não teria conhecido minha querida “Mamys”, a Wi. Obrigada pela dedicação e ajuda que foram cruciais para incrementar meu currículo.

A Wilia, minha querida “Mamys”, Chefa ou simplesmente Wi. Mais que uma orientadora, uma grande amiga, confidente e, principalmente, mãezona. Obrigada pela confiança ao permitir que eu aprendesse a rotina de um laboratório de virologia, antes mesmo de ser sua mestranda. Seu carinho e atenção ao longo desses quase três anos foram muito importantes na minha adaptação a essa nova realidade que resolvi encarar. Longe de minha família, você foi, por muitas vezes, a minha figura materna em Goiânia, me exortando e direcionando meus passos. Essa amizade eu levarei comigo além das paredes do laboratório, será para a vida inteira. Conte comigo sempre!

Ao LABVET/GO, nas pessoas de Marília, Marly e Rosely, que cederam as amostras de cérebro bovino utilizadas neste trabalho.

Ao querido professor Paulo Roehe e toda equipe do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e do Laboratório de Virologia da UFRGS, pelo carinho e atenção com que me receberam. Obrigada pelas amostras de referência cedidas, indispensáveis ao desenvolvimento deste estudo.

Ao professor Luiz Augusto por gostar da burocracia e me livrar dela e, mesmo que nos bastidores, sempre esteve disposto a ajudar com suas assinaturas em inúmeros ofícios e fichas de matrícula, além de fazer a ponte aérea Goiânia-Porto Alegre- Goiânia transportando materiais para o projeto.

A Denise, que arriscou seus experimentos permitindo que eu aprendesse com eles, obrigada pela confiança e disposição em ensinar.

A querida Keili, minha “orientadora” de bancada, sempre paciente para me explicar repetidas vezes as benditas técnicas moleculares, bem como o preparo de todas as soluções. Os beliscões surtiram efeito.

A Carol e Raquel, que foram minhas mãos e braços no processamento inicial das amostras.

As professoras Ana Maria, Fabíola, Menira e a colega Tâmera, pela experiência acrescentada durante o desenvolvimento deste trabalho com seus preciosos conselhos.

Ao professor André Kipnis e sua equipe, pelo tempo dedicado aos ensinamentos que muito contribuíram para o pleno andamento deste estudo.

A querida amiga Paulinha, que me acompanhou na primeira visita a UFG na busca por um orientador e não me deixou ir embora enquanto não encontramos alguém para conversar. Obrigada pela amizade e carinho.

Aos meus queridos amigos da UFRuralRJ, Anna, Bruna, Bruno, Fábio Ninja, Fabio Lind, Helô, Igor Bello e Lyana. Obrigada pelo carinho e pela torcida mesmo que de longe, vocês são preciosos para mim. Peço a Deus que me permita desfrutar dessas amizades até o fim da vida.

As minhas companheiras de luta diária, Paty (Patrícia), Dri (Adriana), Tatá (Talita), Mari (Mariana) e Taty (Tatyane), que sofreram comigo durante a padronização das técnicas, mas ao final, puderam se regozijar com os resultados. Somos uma equipe e tanto ou um jardim florido como diz a Paty. Espero tê-las

sempre comigo, pois vocês são verdadeiros anjos que Deus enviou para alegrar minha vida todos os dias.

A toda equipe do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, ao CNPQ pelo financiamento do projeto, a CAPES pela bolsa concedida e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste projeto.

“Tudo isso eu examinei mediante a sabedoria e disse: estou decidido a ser sábio; mas isso estava fora do meu alcance.

A realidade está bem distante e é muito profunda; quem pode descobri-la?

Por isso dediquei-me a aprender, a investigar, a buscar a sabedoria e a razão de ser das coisas, para compreender a insensatez da impiedade e a loucura da insensatez.”

Eclesiastes 7: 23-25

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1-Descrição do agente.....	4
2.2-Proteínas virais.....	5
2.3-Gliproteína C (gC)	7
2.4-Replicação viral	8
2.4.1-Adsorção	8
2.4.2-Fusão e penetração	9
2.4.3-Transporte.....	9
2.4.4-Transcrição, replicação e síntese	9
2.4.5-Montagem e preenchimento dos capsídeos	10
2.4.6-Liberação.....	10
2.5-Patogenia e sinais clínicos.....	11
2.6-Latência	13
2.7- Epidemiologia.....	15
2.7.1-Hospedeiros.....	15
2.7.2-Distribuição geográfica.....	15
2.8-Identificação e caracterização viral	18
2.8.1-Diagnóstico virológico.....	18
2.8.2-Diagnóstico sorológico.....	19
2.8.3-Diagnóstico molecular	19
3-OBJETIVOS	21
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1-Amostras	22
4.2-Extração do DNA.....	22
4.3-Identificação da presença de BoHV.....	23
4.4-Cultivo de amostras de vírus	25
5-RESULTADOS.....	26
6-DISCUSSÃO.....	29
7-CONCLUSÃO	33
8-CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Micrografia eletrônica de partícula de herpesvírus..	4
FIGURA 2: Representação esquemática do genoma do BoHV-5..	6
FIGURA 3: Mapas com as respectivas cidades onde foram coletadas as amostras utilizadas no estudo.....	26 e 27
FIGURA 4: PCR multiplex - amplificação da região da gC de herpesvírus bovino.....	28

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Reagentes utilizados na reação de PCR multiplex e suas respectivas concentrações finais..... 24

QUADRO 2: Condições utilizadas para amplificar os fragmentos específicos da gC de herpesvírus bovino..... 24

RESUMO

A meningoencefalite herpética é uma infecção do sistema nervoso central de curso geralmente fatal causada pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), todavia, também o BoHV-1 pode estar associado a essa patologia. A enfermidade tem gerado muitos prejuízos à pecuária brasileira por apresentar elevada letalidade, principalmente, entre animais jovens. Devido a reatividade cruzada e a falta de um teste sorológico eficaz que diferencie os tipos 1 e 5 de herpesvírus bovino, não se sabe a real prevalência das infecções por ambos os vírus. Estima-se que uma parcela dos animais supostamente infectados pelo tipo 1 possa ser soropositiva para o tipo 5. Para um melhor entendimento da epidemiologia molecular desses vírus em Goiás, 110 amostras de cérebro de bovinos jovens que vieram a óbito com sinais neurológicos, encaminhadas ao laboratório de referência do Estado para diagnóstico de raiva no ano de 2008, foram analisadas por PCR multiplex para amplificação da região da glicoproteína C (gC) do DNA do BoHV-1 e -5. Das 110 amostras, 53,6% foram positivas para herpesvírus bovino. Destas, 22,0% foram positivas para o BoHV-1, enquanto 52,5% foram positivas para o BoHV-5. Além disso, encontrou-se 13,6% de coinfeção para os tipos 1 e 5. Entre estas, uma amostra foi proveniente de um bubalino. Foi observada positividade simultânea para herpesvírus bovino e o vírus da raiva em 53,3% das amostras. Este estudo permitiu concluir que o BoHV-1 e o -5 circulam no Estado de Goiás e que o BoHV-1 apresenta potencial encefalitogênico. Apesar de não ter ocorrido multiplicação viral em nenhuma das 20 amostras de cérebro inoculadas em cultura de célula, não se pode descartar a possibilidade da doença neurológica estar associada aos vírus nas outras amostras analisadas. Este foi o primeiro estudo com amostras de Goiás a comprovar a presença dos dois vírus nos rebanhos do Estado.

Palavras-chave: gado, infecção viral, letalidade, neuropatia, PCR multiplex, reatividade cruzada.

ABSTRACT

Herpetic meningoencephalitis is an infection of the central nervous system caused by bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) despite BoHV-1 also being associated with this pathology. The course of the disease is usually fatal. Meningoencephalitis has caused significant economic burden to the Brazilian cattle industry due to its high mortality rate, especially in young animals. Because of cross-reactivity and the absence of an effective serological test that differentiates types 1 and 5 of herpesvirus, the actual prevalence of infection with both viruses is unknown. It is estimated that some animals, supposedly infected with type 1, may be seropositive for type 5. For a better understanding of the molecular epidemiology of this virus in Goiás, 110 brain samples of young cattle, that died with neurological signs, referred to the reference laboratory of the State of Goiás for rabies diagnosis in 2008, were analyzed by multiplex PCR to amplify the glycoprotein C (gC) region of the BoHV-1 and -5 DNA. Of the 110 samples, 53.6% were positive for bovine herpesvirus. Of these, 22.0% were positive for BoHV-1, whereas 52.5% were positive for BoHV-5. Furthermore, 13.6% of samples showed co-infection for types 1 and 5. Among these, one sample came from a buffalo. Positivity for both bovine herpesvirus and rabies virus was observed in 53.3% of samples. This study showed that BoHV-1 and -5 are circulating among cattle in the State of Goiás and that herpesvirus type 1 can also be encephalitogenic. Although there was no evidence of viral replication, after inoculation of all 20 brain samples in cell culture, the possibility of viruses being associated with neurological disease cannot be ruled out. This was the first study to demonstrate the presence of BoHV-1 and BoHV-5 in samples obtained from herds in Goiás.

Keywords: cattle, viral infection, lethality, neuropathy, multiplex PCR, cross-reactivity.

1-INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos grandes produtores do setor de carnes no mercado mundial, contudo, sua posição é constantemente ameaçada principalmente quando se trata de carne bovina. Isso ocorre devido às próprias limitações do setor, pois o rebanho bovino está exposto a agentes causadores de enfermidades que afetam diretamente a sua produtividade.

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, o Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos, ficando atrás apenas da Índia, apresentando um consumo *per capita* em torno de 35 quilos de carne por habitante/ano. O país ocupa a segunda posição no ranking dos produtores mundiais, ficando atrás dos Estados Unidos e, simultaneamente, ocupa o primeiro lugar dentre os exportadores mundiais deste produto (FAO, 2010).

Estimativas da FAO apontam que entre os anos de 2006 e 2015, o Brasil irá capturar a maior parte do crescimento da demanda mundial de carne, contribuindo com cerca de 36% do aumento do volume exportado nesse período (FAO, 2010).

O efetivo de bovinos registrado pela Pesquisa da Pecuária Municipal (IBGE, 2010) para o ano de 2009 foi de 205 milhões de cabeças, considerando nesta contagem os animais existentes em 31 de dezembro, tanto destinados à produção de carne quanto à de leite. Comparando este número com o obtido em 2008, observou-se crescimento do efetivo de 1,5% no ano de 2009. Dentre os efetivos de grandes animais, o de bovinos foi o único que apresentou crescimento enquanto os demais tiveram queda (IBGE, 2010).

Em termos regionais, o Centro-Oeste brasileiro é a principal região detentora de rebanho bovino com 34,4% do efetivo nacional. O Estado de Goiás possui o quarto maior rebanho do país com uma população bovina de, aproximadamente, 21 milhões de animais, cerca de 10% do total do país. Destes, 2,6 milhões estão na região Sudoeste do Estado e a cidade de Nova Crixás apresenta o maior efetivo com 737 mil animais (IBGE, 2010).

De acordo com a Pesquisa Trimestral do Leite, feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no acumulado do ano de 2009 foram

adquiridos 19,5 bilhões de litros de leite. Comparando-se tal volume ao obtido em 2008, verificou-se incremento de produção de 1,6% em 2009. Os números desta pesquisa indicam o consumo interno *per capita* de 102 litros de leite por habitante/ano e os principais Estados em aquisição do produto foram Minas Gerais, com participação de 26,8%, Rio Grande do Sul (14,1%) e Goiás (12,3%).

Quanto ao abate e produção de carne bovina para o ano de 2009, verificou-se, pela Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, também do IBGE, o abate de 28 milhões de cabeças e a produção de 6,6 milhões de toneladas do produto. Deste total de carne produzida, 13,9% foram exportados para outros países. Os principais destinos da carne bovina brasileira foram Rússia, Hong Kong e Irã. O maior consumidor mundial de carne bovina foram os Estados Unidos, seguido pela União Européia e Brasil.

Sem dúvida, estes índices demonstram o extraordinário potencial de produção e de exportação de carne bovina do Brasil. Todavia, deve-se dar especial atenção às questões relativas à sanidade dos animais e à intensificação na fiscalização da qualidade dos produtos (as certificações), visto que esses itens são os que mais condicionam a ampliação das exportações no que diz respeito às barreiras impeditivas, afetando negativamente a competitividade e o grau de eficiência junto a terceiros mercados (RUBIN et al, 2008).

Os distúrbios neurológicos em bovinos abrangem um grupo de enfermidades que merecem destaque, tanto pelo perigo em potencial que representam para a saúde humana, quanto pelas perdas econômicas expressivas que ocasionam nos rebanhos de corte e de leite. A variação de manifestação clínica das neuropatias, a semelhança sintomatológica entre alguns distúrbios e a dificuldade de diagnóstico, são aspectos importantes que limitam as ações de controle dessas enfermidades (AQUINO NETO et al., 2009).

Há cerca de 20 anos, quando a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) surgiu, as doenças do sistema nervoso de bovinos começaram a ganhar relevância. Aproximadamente 10 anos após o aparecimento da EEB, o consumo de carne e derivados foi associado ao surgimento, em humanos, de uma variante da enfermidade Creutzfeldt Jakob (vCJD), passando então a EEB a ser considerada uma zoonose. Assim, os países importadores de carne passaram a bloquear as importações de países que tiveram a doença ou que não tivessem

dados concretos sobre a prevalência das enfermidades do sistema nervoso central (SNC) em seu rebanho bovino (BARROS et al, 2006).

Entre os agentes infecciosos envolvidos em doenças neurológicas estão as bactérias, os protozoários e os vírus (CLAUS et al, 2002). Neste último grupo são encontrados os herpesvírus bovino, que geram perdas produtivas e reprodutivas significantes (KIRKBRIDE, 1992, JUNQUEIRA & ALFIERI, 2006, RUFINO et al., 2006), sendo causadores de grandes prejuízos econômicos para a pecuária mundial. Estima-se que as perdas geradas por enfermidades relacionadas aos herpesvírus bovinos alcancem um bilhão de dólares por ano em todo o mundo (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

Devido às perdas na indústria bovina como resultado da infecção distribuída mundialmente por esses vírus, as Comunidades Americana e Européia tem imposto estrito controle sanitário de sêmen e embriões, estabelecendo programas de erradicação que afetam diretamente o comércio bovino mundial. O Brasil, sendo o maior exportador de carne bovina, deve rever detalhadamente seus programas sanitários de controle e erradicação de encefalopatias (FERRARI, et al., 2007).

Diante do exposto, fica claro que a relação da produtividade com a sanidade dos rebanhos é um ponto crucial para se obter lucratividade e, principalmente, para alcançar o mercado externo.

Não existem informações referentes à identificação e caracterização de amostras de herpesvírus bovino em Goiás. Assim, é de grande interesse o conhecimento da casuística da infecção pelo vírus no Estado, como também a caracterização das amostras que ocorrem na região. Considerando a grande relevância da pecuária para a economia do país e as crescentes barreiras sanitárias às exportações dos produtos nacionais, estudos que visem um melhor entendimento da epidemiologia deste agente revestem-se de importância ainda maior.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Descrição dos agentes

A família *Herpesviridae*, em suas três subfamílias, *Alfa*, *Beta* e *Gamaherpesviridae*, engloba vírus que ocorrem em diversas espécies animais. Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 pertencem ao gênero *Varicellovirus* da subfamília *Alphaherpesvirinae* (ROIZMAN et al.,1992). Os herpesvírus agrupados nesta subfamília apresentam como características gerais, um genoma composto por DNA linear de fita dupla com, aproximadamente, 140 kpb; um nucleocapsídeo icosaédrico com 162 capsômeros, que é cercado por uma camada protéica amorfa, denominada tegumento; um envelope glicoprotéico, onde estão inseridas as glicoproteínas que apresentam diferentes propriedades antigênicas (WIRTH, 1993; SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Seu diâmetro varia de 130 a 200 nm e, devido a composição lipoprotéica do envelope, são sensíveis ao éter e outros solventes lipídicos, como também a extremos de pH (PORTERFIELD, 1989).

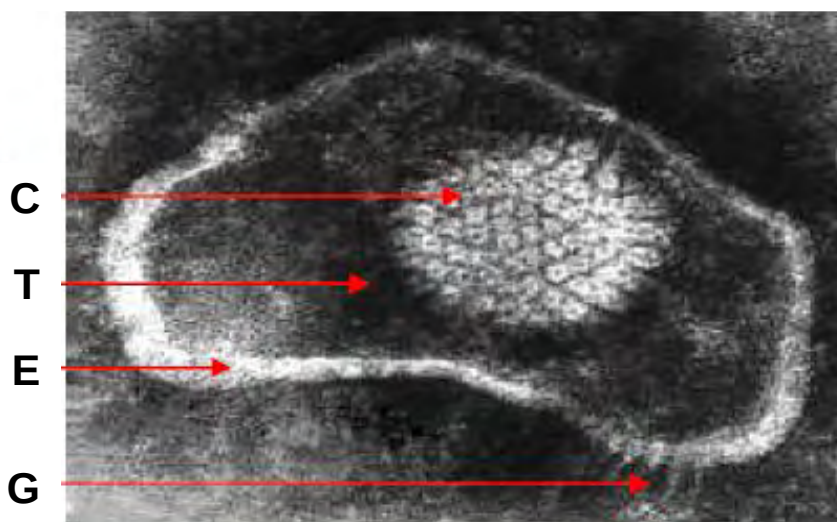


FIGURA 1: Micrografia eletrônica de partícula de herpesvírus.
C) capsídeo; T) tegumento; E) envelope; G) glicoproteínas.

Fonte: Linda Stannard, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town, adaptado por ESTEVES, 2007.

O BoHV-1 está associado a enfermidades respiratórias e do trato genital, podendo induzir a ocorrência de aborto em vacas gestantes e doença sistêmica em bezerros recém nascidos (MILLER et al., 1991). Análises sorológicas e moleculares de amostras de BoHV-1 permitiram caracterizá-las em tipos 1 e 2, sendo esse último subdividido em 2a e 2b (ROIZMAN et al., 1992).

O BoHV-5 é o causador da encefalite herpética bovina, uma enfermidade neurológica que atinge animais jovens, apresentando baixos índices de morbidade, mas elevados índices de letalidade (SALVADOR et al., 1998).

Inicialmente o BoHV-5 era considerado um terceiro subtipo do BoHV-1, designado 1.3, por eles apresentarem uma homologia de, aproximadamente, 85% no genoma (DELHON et al., 2003). Contudo, análises sorológicas e moleculares permitiram reclassificá-lo como um novo tipo dentro da família (ROIZMAN et al., 1992). Ensaios moleculares, utilizando enzimas de restrição, permitiram a caracterização de amostras de BoHV-5 em subtipos 5a, 5b e 5na/nb (não a, não b) (D'ARCE et al., 2002). As principais diferenças entre o BoHV-1 e o BoHV-5 referem-se às características clínico-epidemiológicas e ao potencial neurotrópico do BoHV-5 (FLORES et al., 1998).

O genoma do BoHV-1 apresenta 137 kpb enquanto o BoHV-5 possui 138.4 kpb (FRANCO & ROEHE, 2007). O genoma de ambos os vírus contém em torno de 70 genes, e apresentam uma composição G+C (guanina e citosina) de 75%, que acaba por conferir sua estabilidade (DELHON et al., 2003). A estrutura genômica desses agentes é comum aos integrantes do grupo D de herpesvírus, que consiste em um segmento único longo (UL) de 102 a 104 kpb, e um segmento único curto (US) de, aproximadamente, 11 kpb. O segmento US apresenta duas regiões repetidas em suas extremidades chamadas região repetida interna (IR) e região repetida terminal (TR) (ROIZMAN & PELLET, 2007).

2.2-Proteínas virais

Até o momento, sabe-se que das proteínas codificadas pelos herpesvírus bovino tipos 1 e 5, pelo menos 10 são glicoproteínas, denominadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL e gM. Elas apresentam diferentes propriedades

antigênicas, funções na replicação viral (gB, gD, gH, gK, e gL) e interações com a célula infectada (gB, gC e gD) (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Este último grupo está envolvido nos processos de penetração e fusão da partícula viral às células alvo, sendo importantes componentes imunogênicos. A gC está relacionada à adsorção, sendo considerada a mais imunogênica (BABIUK et al., 1996).

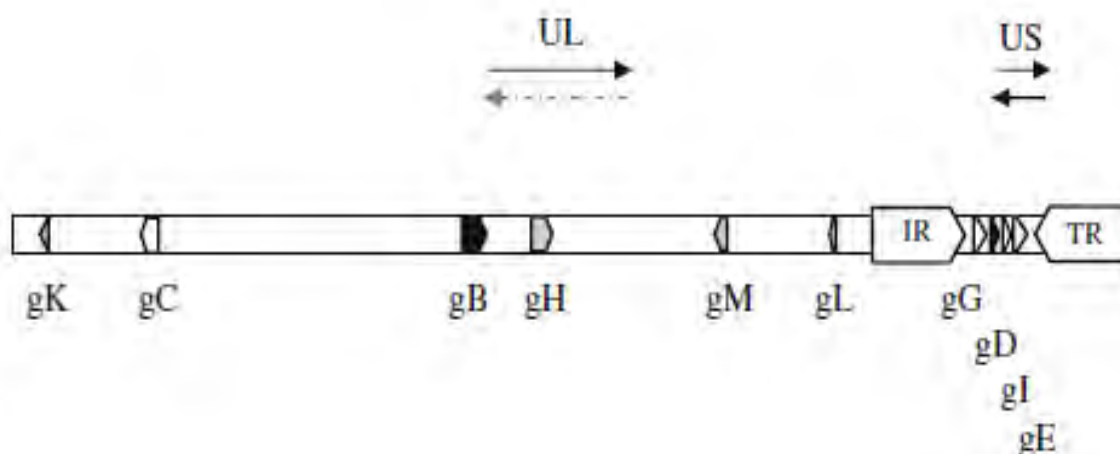


FIGURA 2: Representação esquemática do genoma do BoHV-5. As sequências do segmento único longo (UL) e do segmento único curto (US) e suas possíveis orientações estão indicadas pelas setas. A localização e orientação dos genes codificadores das glicoproteínas são indicadas pelas caixas orientadas. A cor preta indica que a conservação média (em nível de proteína) entre o gene do BoHV-5 e do BoHV-1 é maior que 90%; a cor cinza indica um nível de conservação maior que 80%; a cor branca indica um nível de conservação menor que 80%.

Fonte: DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2009.

As glicoproteínas agem em diversas etapas do ciclo de replicação viral. Algumas atuam no reconhecimento e ligação aos receptores celulares, fusão das membranas viral e celular, penetração do material genético do vírus no citoplasma e maturação e saída das partículas virais da célula. Outras já são importantes em estratégias de evasão da resposta imune do hospedeiro (HANON et al., 1999; WINKLER et al., 1999; LIMAN et al., 2000).

2.3-Gliproteína C (gC)

A glicoproteína C tem sido descrita como membro da superfamília das imunoglobulinas (FITZPATRICK & BIELEFELDT-OHMANN, 1991). Ela está presente no envoltório do vírion e na membrana da célula infectada, sendo considerada a mais importante glicoproteína envolvida na adsorção do vírus à célula, ligando-se aos receptores de heparan sulfato na superfície das células-alvo. ("heparan sulfate proteoglycan"- HSPG) (LIANG et al., 1992; OKAZAKI et al., 1994). As gCs do BoHV-1 e -5 compartilham cerca de 75% de similaridade. No BoHV-1 ela se apresenta como um dímero de 508 aminoácidos (1572 nucleotídeos) e no BoHV-5 com 486 aminoácidos (1464 nucleotídeos). As regiões mais conservadas entre as duas gCs são a central e a carboxi-terminal (C-terminal). Já a região amino-terminal (N-terminal) concentra a maior parte das diferenças entre as gCs desses vírus (SCWYZER & ACKERMANN, 1996).

A gC é uma proteína transmembrana estrutural não essencial, com cerca de 91 kDa (FITZPATRICK & BIELEFELDT-OHMANN, 1991; CHOWDHURY, 1997; METTENLEITER, 2003; THIRY et al., 2006). O gene que a codifica localiza-se na região UL44 para ambos os vírus, contudo a gC do BoHV-5 apresenta uma deleção do aminoácido 35 em relação ao BoHV-1. (DELHON et al., 2003). Ela é capaz de bloquear a primeira linha do sistema de defesa do hospedeiro através de sua ligação com o terceiro fator (C3) da cascata do complemento (HUEMER et al., 1993). Logo, a gC pode interferir, preferencialmente, com eventos relacionados à resposta imune via complemento do que via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (VAN DER MEULEN et al., 2006).

Muitos estudos tem buscado elucidar o papel das glicoproteínas do BoHV-5 no processo de neurovirulência. Experimentos com inoculação intranasal em coelhos com um vírus gC-deletado, mostraram que a replicação no cérebro foi menos eficiente quando comparada com os animais inoculados com o vírus selvagem. Esses dados sugerem que a gC pode regular o neurotropismo do BoHV-5 em algumas áreas da via olfatória de coelhos (CHOWDHURY et al., 2000).

As características supracitadas fizeram da gC um alvo de estudos para o desenvolvimento de testes diagnósticos. Ela já foi explorada em técnicas moleculares como a PCR e suas variações (nested PCR e multiplex PCR) para a detecção de BoHV-1 ou diferenciação deste do tipo 5 (VAN ENGELBURG et al., 1993; VILCEK, 1993; LYAKU et al., 1996; ASHBAUGH et al., 1997; ALEGRE et al., 2001; ESTEVES et al., 2003; CLAUS et al., 2005; CLAUS et al., 2007). Além da utilização em provas moleculares, o uso desta proteína como antígeno, permitiu o desenvolvimento de anticorpos monoclonais diferenciais entre BoHV-1.1 e BoHV-1.2, bem como ensaios imunoenzimáticos diferenciais entre BoHV-1.1 e 1.2 e entre BoHV-1 e BoHV-5 (CHOWDHURY, 1997; RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2005).

2.4-Replicação viral

A replicação viral ocorre no núcleo celular. A maturação envolve a encapsidação do DNA no interior do nucleocapsídeo, seguida pela aquisição do envelope durante o processo de brotamento. A produção da progênie viral infecciosa é acompanhada pela lise da célula infectada (ROIZMAN et al., 1992).

Esse processo de replicação viral dos alfa herpesvírus tem como modelo o ciclo replicativo do HSV-1 (*Herpes simplex 1*) e acredita-se que ocorra de forma semelhante para o BoHV-1 e 5. Ocorrem as seguintes fases: 1) adsorção; 2) fusão; 3) transporte do nucleocapsídeo e proteínas virais contidas no tegumento ao núcleo das células infectadas; 4) transcrição, replicação e síntese do DNA e proteínas virais, respectivamente; 5) montagem e preenchimento dos capsídeos e 6) liberação da progênie infecciosa (ROIZMAN & KNIPE, 2001)

2.4.1-Adsorção

É o processo de ligação do vírus a receptores da membrana das células-alvo. As glicoproteínas do envelope viral reconhecem e ligam-se a receptores específicos da membrana celular (BABIUK et al., 1996; MEYER et al., 1998). A interação das várias glicoproteínas do envelope viral é que permite esse

processo. gC e gB são as principais glicoproteínas envolvidas na adsorção do vírus em células epiteliais. Elas reconhecem e ligam-se aos receptores celulares de HSPG e, em seguida, gB e gD ligam-se a outros receptores de membrana. Esta estratégia de uma proteína reconhecer mais de um receptor celular (denominada redundância) permite que o vírus infecte diferentes tipos celulares (BABIUK, et al., 1996; MEYER et al., 1998; METTENLEITER, 2003).

2.4.2-Fusão e penetração

Nestes processos estão envolvidas as glicoproteínas: gB, gD, gH, gL e gK (BABIUK et al., 1996; ROIZMAN & KNIPE, 2001). WILD et al. (1998), observando o processo de penetração do BoHV-1 e 5, encontraram alguns vírions parcialmente fusionados à camada mais externa da membrana plasmática, cerca de 40 segundos após o início da infecção. A fusão completa foi observada 45 segundos após, o que resultou numa inserção parcial do envelope do vírus à membrana plasmática, com formação de “dobras” na membrana, observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura.

2.4.3-Transporte

ROIZMAN & KNIPE (2001) afirmam que o transporte do nucleocapsídeo pode ocorrer pela ação da glicoproteína VP22 que é a responsável pela reorganização do sistema de microtúbulos celulares até o centrômero, perto do núcleo celular.

2.4.4-Transcrição, replicação e síntese

A transcrição e a replicação do DNA viral ocorrem no núcleo da célula, enquanto a síntese das proteínas se dá no citoplasma celular. A transcrição dos genes virais com consequente bloqueio da síntese celular, é regulada temporariamente, havendo três classes de RNA mensageiros (mRNA), denominadas: imediatamente precoce (α) (*immediate early*), precoce (β) (*early*), e tardia (γ) (*late*), que são transcritos pela RNA polimerase II (RNAPol II) celular

(TIKOO et al., 1995). Os genes α são os primeiros a serem transcritos. Participam deste processo proteínas do tegumento (α TIF e VP8), em interação com fatores de transcrição celular sendo, então, cinco α -proteínas denominadas *bovine infected cell protein* (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27 e BICP47) expressas no início da síntese protéica viral. A síntese das α -proteínas alcança o nível máximo entre 2 a 4 horas após o início da infecção (ROIZMAN & KNIPE, 2001)

A partir da produção de um volume suficiente de α -proteínas, dá-se início a transcrição dos genes β , e de 5 a 7 horas após o início da infecção é alcançado o nível máximo de expressão (ROIZMAN & KNIPE, 2001).

As β -proteínas estão envolvidas na regulação da transcrição protéica, suprimindo as α -proteínas, promovendo as γ -proteínas e, juntamente com as α , atuam no processo de replicação do genoma viral. Cerca de três horas após o início da infecção pode-se detectar a replicação do DNA viral. Nesta fase o DNA viral pode ser encontrado na forma circular ou linear, indicando que os herpesvírus possam replicar seu material genético pelo mecanismo denominado “círculo rolante” (ROIZMAN & KNIPE, 2001).

Os genes γ são divididos em dois grupos: γ_1 (também chamados $\beta\gamma$; eles codificam algumas proteínas tais como: gB, gD e BICP5) e γ_2 (que codificam gC e US11) sendo expressos mais tardiamente. A maioria dos genes γ codifica proteínas estruturais enquanto os α e β codificam proteínas ou enzimas que se complexam ao DNA viral (ROIZMAN & KNIPE, 2001).

2.4.5-Montagem e preenchimento dos capsídeos

A montagem dos capsídeos ocorre no núcleo das células infectadas através da interação de determinadas proteínas virais (UL18; UL19; UL35; e UL38). Os capsídeos são preenchidos com as moléculas do DNA viral replicado com o auxílio de várias proteínas virais (UL33; UL32; UL28; UL25; UL15; UL26.5) (ROIZMAN & KNIPE, 2001).

2.4.6-Liberação

A maturação do capsídeo envolve a sua associação com o DNA viral, formando o nucleocapsídeo, e a ligação deste com a camada interna da membrana nuclear adquirindo, assim, o envelope viral. Os vírions se acumulam dentro de vesículas no citoplasma utilizando o complexo de Golgi para serem secretados para o meio extracelular ou ocorre a disseminação das partículas virais célula-à-célula (METTENLEITER, 2002).

2.5-Patogenia e sinais clínicos

Apesar de o BoHV-1 ser mais frequentemente associado a enfermidades respiratória, genital e problemas reprodutivos, dados da literatura demonstram que ele também pode causar desordens neurológicas (D'OFFAY et al., 1993; HORIUCHI et al., 1995, BATISTA et al., 2010). O BoHV-5 tem sido isolado, principalmente, de casos de doença neurológica fatal em bovinos, sobretudo em animais jovens (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002). Desde a identificação do BoHV-5 alguns estudos sobre sua patogenia e sinais clínicos bem como uma possível diferenciação do tipo 1 vem sendo realizados. A maioria das informações sobre enfermidade neurológica, entretanto, são disponíveis apenas para o tipo 5.

O vírus inicialmente infecta as células epiteliais na porta de entrada e a replicação primária ocorre nas mucosas (nasal ou vaginal, dependendo da via de infecção). A replicação viral no trato respiratório superior leva a uma elevada produção de progênie viral que será liberada nas secreções nasais, constituindo-se uma forma de disseminação bastante eficiente durante a infecção aguda (BAGUST, 1972; BAGUST & CLARK, 1972).

Após a replicação primária no epitélio nasal, células nervosas locais (células olfatórias e/ou terminações nervosas maxilares) são infectadas e o agente alcança o sistema nervoso central (SNC) disseminando-se neurônio a neurônio por duas rotas diferentes: olfatória e trigeminal. A presença de vírus no gânglio trigeminal ocorre entre cinco a sete dias após a infecção (BAGUST, 1972; BAGUST & CLARK, 1972; PEREZ et al., 2002). No entanto, o desenvolvimento simultâneo de lesões no córtex cerebral anterior, medula, ponte e gânglio

trigêmeo, sugere que os vírus também alcancem o cérebro por transporte axonal de neurônios bipolares dos nervos olfatórios para o bulbo olfatório (PEREZ et al., 2002).

Uma vez alcançado o SNC, um quadro de meningoencefalite fatal é induzido nos bovinos entre oito e 10 dias após a infecção (BELKNAP et al., 1994; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002). As meningoencefalites fatais podem atingir bovinos entre seis e 60 meses de idade (BULACH & STUDDERT, 1990; SALVADOR et al., 1998). Os animais acometidos podem apresentar febre, depressão, tremores, bruxismo, nistagmo, andar em círculos, opistótono, incoordenação, perda do equilíbrio, convulsões, movimentos de pedalagem e *head pressing* (pressão do topo da cabeça contra algum obstáculo) (BAGUST & CLARK, 1972; SCHUDEL et al., 1986). A letalidade alcança 100% dos casos (CARRILO et al., 1983b).

Apesar de o BoHV-5 ter sido primeiramente associado a doença neurológica, sua identificação em sítios extraneurais sugere a participação deste agente em outros quadros mórbidos de enfermidades respiratórias e reprodutivas, à semelhança do que ocorre com o BoHV-1. O vírus já foi detectado em casos de doença respiratória natural (CARRILLO et al., 1983a) de infecção subclínica (ASHBAUGH et al., 1997; CASCIO et al., 1999; VOGEL et al., 2003), de doença moderada (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2006), no sêmen de touros saudáveis (GOMES et al., 2003), em tecidos de fetos abortados (CARRILLO et al., 1983a; METZLER et al., 1986) e no baço e pulmão, em casos de infecções sistêmicas (SUAREZ et al., 1993).

A neuropatogenicidade do BoHV-5 tem sido estudada utilizando-se diversos modelos experimentais. Bovinos inoculados por via intravaginal, epidural e intracerebral desenvolveram doença neurológica e vieram a óbito (FRENCH, 1962; BAGUST, 1972; BAGUST & CLARK, 1972). Animais inoculados por via intraconjuntival apresentaram hipertermia com replicação do vírus na mucosa nasal, mas não houve presença de sinais nervosos (BAGUST, 1972).

Outros modelos experimentais utilizando coelhos (CHOWDHURY et al., 2000; MEYER et al., 1996; SILVA et al., 1999) e ovinos (SILVA et al., 1998) já foram desenvolvidos com vistas ao entendimento da neuropatogenicidade do BoHV-5. Esses animais reproduziram a doença clínica dos bovinos,

desenvolvendo meningoencefalite após a inoculação do vírus por via intranasal. Eles também eliminaram o BoHV-5 nas secreções nasais, sendo fonte de contaminação para animais sentinela (SILVA et al., 1998).

Caso os bovinos acometidos sobrevivam à infecção pelos herpesvírus, estabelece-se um quadro de latência nos gânglios sensoriais por toda a vida do animal (CASCIO et al., 1999; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002) e, sob certas condições, reativação e reinfecção dos tecidos periféricos podem ocorrer.

2.6-Latência

Todos os alfa herpesvírus são capazes de estabelecer latência em células ganglionares do animal infectado, que é uma das características epidemiológicas mais importantes da família *Herpesviridae* (CLAUS et al., 2002).

Em 1997, AUSHBAUG et al., detectaram DNA de BoHV-1 e BoHV-5 por meio da técnica de nested PCR, no gânglio trigêmeo de bovinos infectados experimentalmente. SILVA et al. (1998), demonstraram a capacidade do BoHV-5 em estabelecer latência por meio da inoculação em ovinos e posterior detecção do vírus em secreções nasais, após tratamento com dexametazona.

Os herpesvírus podem sofrer reativação e serem re-excretados sem nenhum sinal clínico (BELKNAP et al., 1994; CASCIO et al., 1999) ou os animais acometidos podem desenvolver manifestações clínicas de encefalite, similares às observadas durante a infecção aguda (PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). O primeiro caso é de especial interesse, haja vista que os animais infectados de forma latente atuam como reservatórios naturais, representando uma fonte silenciosa do vírus em condições de re-excreção. Essa reativação pode ocorrer por diferentes estímulos imunodepressivos como estresse, transporte, parto ou tratamento com glicocorticóides. A disseminação do vírus no sistema nervoso, a partir de uma infecção primária, ocorre através da penetração via neurônios sensoriais periféricos e transporte dos vírions, que podem ou não estar acompanhados por proteínas do tegumento, por fluxo axonal retrógrado, usualmente aos gânglios trigêmeo ou sacral (JONES, 2003; METTENLEITER, 2003).

Estudos com o objetivo de determinar as bases moleculares da latência demonstraram que, em contraste aos cerca de 70-80 genes expressos durante o processo de lise, no estágio de latência apenas uma pequena região do genoma (conhecida por genes relacionados à latência - LRG), sobrepostos aos genes α , é transcrita. Três transcritos foram detectados durante o período de latência: um de 8,7 kpb (em pouquíssima quantidade) e outros dois, de 2 ou 1,5 kpb (em maior quantidade), no núcleo das células latentemente infectadas (COFFIN et al., 1995; HOSSAIN et al., 1995). DEVIREDDY & JONES (1998) sugeriram que a infecção latente poderia ser dividida em três etapas:

1) Estabelecimento da latência: os transcritos dos LRG (LRGT) sofrem processamento alternativo, sendo traduzidos os fragmentos de 2 ou 1,5 kpb processados a partir do fragmento maior de 8,7 kpb.

2) Manutenção da latência: o produto de LRGT (LTRP) reprimiria a expressão viral dos genes α , complexando-se com fatores de transcrição celulares (ciclina A, ciclina E, cdk2, cdc2). Nos neurônios infectados, os LTRP neutralizam os efeitos deletérios da ciclina A, substância necessária para a progressão do ciclo celular e em estágios iniciais de apoptose, bem como de outros fatores virais ou celulares, para assegurar a sobrevivência do neurônio e o estabelecimento da latência.

3) Reativação do vírus: nesta fase, o fato de ter sido detectada a expressão de RNA de ciclina A durante a reativação, pode indicar que os LTRP não conseguem evitar que as células avancem no ciclo celular ou entrem em apoptose, ou ainda, a reativação pode ser um ato de prevenção a uma eminente apoptose celular. Ao final do processo de reativação, o vírion é transportado através dos axônios ao local onde ocorreu a infecção original (JONES, 2003).

Esse mecanismo de latência e reativação se torna, em grande parte, responsável pela transmissão e manutenção do vírus na população bovina (TIKOO et al., 1995).

2.7- Epidemiologia

2.7.1-Hospedeiros

Os bovinos são os hospedeiros naturais do BoHV-1 e -5. Em animais jovens (acima de seis meses de idade), o curso da enfermidade pelo BoHV-5 é rápido e letal, já os adultos são considerados menos susceptíveis à infecção, dependendo das cepas virais e de características do hospedeiro. Bovinos com infecção latente são reservatórios naturais dos vírus e após a reativação viral, se tornam um risco potencial de contaminação para os animais susceptíveis (CARRILLO et al., 1983a; SCHUDEL et al., 1986). WHETSTONE & EVERMANN (1998) identificaram o BoHV-1 como causador de infecção e doença em ovinos e caprinos.

Anticorpos contra o BoHV-5 já foram detectados em ovinos (LINDNER et al., 1993) e em animais silvestres (METZLER et al., 1990; BHAT et al., 1997). Infecção experimental em ovinos e caprinos demonstrou que ambos são susceptíveis aos herpesvírus bovino, desenvolvendo infecção aguda e latente (BELAK et al., 1999, SILVA et al., 1999; DIEHL et al., 2007). Além disso, as duas espécies re-excretaram o vírus após tratamento com dexametazona e foi detectada transmissão viral entre os ovinos durante a infecção aguda (SILVA et al., 1999). Estes resultados sugerem que ovinos e caprinos podem ser potencialmente infectados em condições naturais atuando como reservatórios do agente. Embora estes estudos não demonstrem a habilidade dessas espécies em transmitir o vírus para os bovinos, a capacidade de estabelecer e reativar a infecção latente pode gerar sérias implicações na epidemiologia destes agentes virais nas áreas em que esses animais mantenham estreito contato.

2.7.2-Distribuição geográfica

Os herpesvírus bovino são detectados no Brasil há pelo menos 30 anos (WIZIGMANN et al., 1972; ALICE, 1978; MUELLER et al., 1978). Em Goiás, o primeiro dado relativo à detecção de anticorpos para esses vírus foi no século XX, no final da década de 80 (ANUNCIAÇÃO et al., 1989). Entretanto, o estudo

analisou um pequeno número de amostras e em apenas um município. Dados posteriores confirmaram a presença do vírus em animais do Estado, demonstrando a elevada frequência mesmo quando foram analisados diferentes segmentos da população bovina (rebanhos de leite, corte e misto) (FARIA et al., 2003; VIEIRA, 2003; BARBOSA et al., 2005). Em 2009 foi feito o primeiro isolamento de BoHV-5 do estado de Goiás, no município de Iaciara (SILVA et al., 2009).

O BoHV-1 foi isolado no Brasil pela primeira vez no ano de 1978, nos Estados da Bahia (ALICE et al., 1978) e São Paulo (MUELLER et al., 1978). Em seguida, ocorreu isolamento em Minas Gerais (GALVÃO et al., 1986), Rio de Janeiro (NOGUEIRA, 1986), Rio Grande do Sul (WEIBLEN et al., 1996) e Mato Grosso do Sul (SALVADOR et al., 1998).

Surtos de meningoencefalite pelo BoHV-5 foram relatados, inicialmente, no Rio Grande do Sul, em 1989 (RIET-CORREA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989). Desde então a enfermidade foi detectada no Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Embora não existam relatos da infecção em outros Estados, sugere-se que o BoHV-5 seja enzoótico em todo país (RIET-CORREA et al., 1989; ROEHE et al., 1997; SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; SOUZA et al., 2002; GOMES et al., 2003).

A prevalência de infecções pelo BoHV-1 e -5 no Brasil ainda é desconhecida, uma vez que não existem testes sorológicos que diferenciem com precisão a infecção entre os dois tipos virais, e não é possível estabelecer um diagnóstico conclusivo baseado apenas na sintomatologia clínica. Logo, estima-se que uma considerável parcela dos bovinos supostamente infectados pelo tipo 1, possa ser soropositiva para o tipo 5 devido à extensa reatividade cruzada existente entre eles (ROEHE et al., 1998). Somado a isso, é provável que uma parcela ainda desconhecida dos bovinos soropositivos para o BoHV-5 tenham seu diagnóstico clínico confundido com outras enfermidades de acometimento neurológico como raiva, botulismo, polioencefalomalácia, intoxicação por NaCl, babesiose ou listeriose (SALVADOR et al., 1998).

D'OFFAY et al. (1993) sugerem que a proteção cruzada natural ou a induzida por anticorpos vacinais contra o tipo 1, seja uma possível explicação

para a rara ocorrência de casos de enfermidade associada ao tipo 5 nas regiões endêmicas para o BoHV-1 nos EUA e Europa. No entanto, a situação epidemiológica na América do Sul não oferece suporte a essa hipótese. Mesmo apresentando uma elevada porcentagem de bovinos soropositivos para o BoHV-1, Argentina e Brasil (24,8-84,1% e 19,0-85,0%, respectivamente) relataram muitos casos de meningoencefalite associada ao BoHV-5 (ODEÓN et al., 2001; GULARTE QUINCOZES, 2005). A razão para essa discrepância da prevalência na América do Sul em relação aos outros continentes ainda é desconhecida. Outro ponto importante é que neste continente não existem programas específicos para detecção e identificação de animais infectados pelo BoHV-5 como pelo BoHV-1 (DEL MÉDICO ZAJAC, 2009).

Apesar de os surtos de encefalite supostamente causados pelo BoHV-5 terem aumentado consideravelmente nos últimos anos (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002) a identificação do tipo 1 em casos de transtornos neurológicos continua sendo realizada (CAMPOS et al., 2009; BATISTA et al., 2010). Estes achados demonstram a necessidade da identificação correta dos isolados de herpesvírus para melhor conhecimento de sua patogenia e epidemiologia.

Surtos de BoHV-5 são esporádicos e parecem estar restritos em suas distribuições geográficas, sendo mais detectados no Hemisfério Sul. A razão desta distribuição particular ainda não foi determinada. Existem poucos dados sobre a transmissão do BoHV-5 bem como sua identificação contudo, casos de encefalite herpética já foram relatados na Austrália, Hungria, Canadá (FRENCH, 1962; JOHNSTON et al., 1962, BARTHA et al., 1969; GOUGH & JAMES, 1975), América do Norte (REED et al., 1973; D'OFFAY et al., 1993) e Europa (MORETTI et al., 1964). Surtos são mais frequentemente relatados no Brasil (RIET-CORREA et al., 1989; RIET-CORREA et al., 2006; SALVADOR et al., 1998, SOUZA et al., 2002; SILVA et al., 2009) e Argentina (CARRILLO et al., 1983b; SCHUDEL et al., 1986; PEREZ et al., 2002).

2.8-Identificação e caracterização viral

A identificação da presença desses vírus no organismo animal é feita, via de regra, com base no diagnóstico sorológico, pela pesquisa de anticorpos ou ainda pelo isolamento dos vírus em espécimes clínicos. Entretanto, tais técnicas não permitem a caracterização das amostras virais. Para esse fim são utilizadas técnicas sorológicas com anticorpos monoclonais (mAb) (ROEHE et al., 1997; ESTEVES et al., 1998; D'ARCE et al., 2002; SOUZA et al., 2002) ou análises de parte do genoma por meio de técnicas moleculares que incluem a análise de restrição por endonucleases (REA) ou polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (D'ARCE et al., 2002), a reação em cadeia da polimerase (PCR) (GOMES et al., 2003; MEYER et al., 2003; CLAUS et al., 2005, 2007) ou o sequenciamento genômico de porções divergentes do DNA viral (DELHON et al., 2003; ESTEVES, 2007).

2.8.1-Diagnóstico virológico

O diagnóstico virológico é realizado por meio da identificação de antígenos virais em secreções ou tecidos de animais infectados (imunofluorescência direta e imunohistoquímica), do isolamento do vírus em cultivos celulares ou com o uso de técnicas moleculares (ROEHE et al., 1997).

Apesar de o isolamento viral ser a técnica padrão ouro para o diagnóstico dos herpesvírus, ela apresenta desvantagens em relação a outras técnicas, sejam sorológicas ou moleculares. Para o isolamento é necessária a presença de partículas virais viáveis na amostra a ser analisada. Além disso, a confirmação do diagnóstico pode levar vários dias. Entre as técnicas laboratoriais, especialmente a PCR, têm se estabelecido por apresentar índices de sensibilidade e especificidade adequados às necessidades diagnósticas, além de serem rápidas e poderem detectar o genoma diretamente nas amostras clínicas (TAKIUCHI et al., 2001).

Para a execução do isolamento viral, suspensões de tecidos ou secreções são inoculadas em cultivos celulares, os quais podem ter origem em

cultivos primários ou linhagens celulares contínuas. Após certo período de incubação, que pode variar de três a cinco dias, a presença do vírus é detectada pela observação de efeito citopático (ECP) característico, ou seja, pela destruição do tapete celular causada pela lise das células infectadas pelo agente (WEIBLEN et al., 1989; ROEHE et al., 1997).

2.8.2-Diagnóstico sorológico

Esta modalidade de diagnóstico pode ser realizada utilizando-se diversas técnicas como: fixação de complemento, hemaglutinação passiva, imunofluorescência, imunoperoxidase (IPX), soroneutralização (SN) e ensaios imunoenzimáticos (KIRBY et al., 1974; OSORIO et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1989; SHEN et al., 1991; DEREGT et al., 1993; GIBBS & RWEYEMAMU, 1997; GRAHAM et al., 1997). Os diagnósticos mais utilizados na maioria dos laboratórios baseiam-se em testes de SN e ensaios tipo ELISA (ROEHE et al., 1997) que são os recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

2.8.3-Diagnóstico molecular

Poucos trabalhos foram conduzidos para caracterizar os diversos isolados de BoHV e além disso não foi feita uma diferenciação efetiva em termos antigênicos e moleculares (ROEHE et al., 1997; SOUZA et al., 2002). D'ARCE et al. (2002) desenvolveram um estudo contemplando a caracterização completa de 12 amostras isoladas no Brasil utilizando análise com endonucleases de restrição e anticorpos monoclonais. De acordo com esse trabalho, foram identificadas três amostras de BoHV-1, sendo uma subtipo 1, uma subtipo 2a e uma 2b; as outras nove amostras foram caracterizadas como BoHV-5, sendo sete do subtipo "a" e duas do subtipo não a / não b.

2.8.3.1-Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O objetivo deste teste diagnóstico é a amplificação de uma região específica do DNA do microrganismo. É uma técnica altamente sensível e específica, sendo de rápida execução (ESTEVES, 2007). Diversas variações da PCR já foram desenvolvidas visando a detecção de BoHV-1 e 5, utilizando diversas sequências do genoma destes vírus como região-alvo (VAN ENGELBURG et al., 1993; WAGTER et al., 1996; FUCHS et al., 1999; ROS et al., 1999; SCHYNTS et al., 1999; ALEGRE et al., 2001; ESTEVES et al., 2003; CLAUS et al., 2005).

3-OBJETIVOS

Com o presente estudo objetivou-se:

- Pesquisar a presença de herpesvírus bovino em amostras de cérebro.
- Determinar a casuística da infecção pelo herpesvírus bovino no Estado de Goiás analisando amostras de cérebro de bovinos que apresentaram sinais de enfermidade neurológica.
- Isolar o herpesvírus bovino em cultura de células.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Amostras

A pesquisa de vírus foi conduzida em 110 amostras de cérebro, obtidas de animais com idade entre um e 120 meses que foram encaminhadas ao Laboratório de Análise e Diagnóstico Veterinário (LABVET- Agência Goiana de Defesa Agropecuária) para teste de raiva no ano de 2008. Todas as amostras foram previamente testadas para raiva e transportadas em gelo até o Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG, onde foram processadas.

4.2-Extração do DNA

De cada amostra de cérebro foram separadas porções do córtex anterior, córtex posterior, medula, ponte e cerebelo. Este material foi acondicionado em microtubos de 2,0 mL, devidamente identificados e mantidos a – 80°C até o seu processamento. O protocolo escolhido foi o descrito em DEZEN (2007).

Para a extração do DNA desses tecidos, 100 µg do material foram pesadas e adicionaram-se 800 µL de tampão TEN 2X (Tris, 0,2 M; EDTA, 0,02 M; NaCl, 2 M), 80 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL). Esse material foi homogeneizado no agitador e incubado por uma hora em banho-maria a 65°C. Em seguida, foram acrescentados 3 µL de RNase e as amostras foram submetidas a uma nova incubação de 37°C por 15 minutos. Após esse processo, o material foi centrifugado por 30 segundos a 19800 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo. Nessa etapa, foram adicionados 300 µL de fenol tamponado e 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e o conteúdo dos tubos foi homogeneizado no agitador por cinco minutos. Uma nova centrifugação foi realizada por cinco minutos a 6500 g. Um volume de 550 µL do sobrenadante foi transferido para outros tubos e adicionaram-se 550 µL

de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Novamente o material foi homogeneizado no agitador e centrifugado por cinco minutos a 6500 g. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram coletados e transferidos para outro tubo, onde foram adicionados 2,5X o volume do sobrenadante de etanol absoluto. A solução foi incubada por 30 minutos a -20°C e, após esse período, centrifugada por 20 minutos a 19800 g numa temperatura de 0°C. O sobrenadante foi desprezado e 1000 µL de etanol 70% foram acrescentados. Os tubos foram homogeneizados cinco vezes por inversão e centrifugados por um minuto a 19800 g. Por fim, o sobrenadante foi removido sendo aguardada a completa evaporação do álcool, então, o *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de Tris-EDTA (TE-Tris, 10 mM; EDTA, 1 mM) e armazenado a - 20°C até o momento do uso.

Em cada processo de extração, 20 amostras foram extraídas. Ao final de cada procedimento foi feita uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE - 0,045M Tris-Borato, 1mM EDTA) em uma cuba horizontal sob uma corrente de 100V. Para verificar a presença do material extraído antes da análise por PCR, o gel foi corado em brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5 µg/mL (SAMBROOK et al., 1989) e o DNA foi visualizado por meio de transiluminação do gel em luz ultravioleta. A concentração de DNA das amostras extraídas variou de 50 a 100 ng, sendo determinada por meio de comparação com concentrações conhecidas do marcador de peso molecular Lambda[®].

4.3-Identificação da presença de herpesvírus bovino

A presença do DNA do BoHV-1 e -5 nos espécimes clínicos foi analisada por meio de PCR multiplex, como descrito por CLAUS et al. (2005).

Os oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR foram desenhados com base nas sequências do gene que codifica a glicoproteína C (gC) do BoHV-5 e do BoHV-1, tendo sido possível detectar numa única reação a presença dos dois tipos de herpesvírus (CLAUS et al., 2005).

As seqüências do gene estão disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os oligonucleotídeos B1 (5'CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC3' nt 185-204); B5 (5'CGG ACG AGA CGC CCT TGG 3'- nt 322-339) e Bcon (5'AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG 3' nt 519-538 (BoHV-1) e nt 461-480 (BoHV-5) anelam em regiões conservadas de ambos os vírus (BoHV-1 e BoHV-5), amplificando um produto de 159 pb para o BoHV-5 e 354 pb para o BoHV-1 (CLAUS et al., 2005).

Para otimizar o ensaio de PCR, um primeiro ensaio foi realizado com diferentes quantidades de DNA extraído, a saber: 1 µL, 2 µL, 4 µL, 5 µL e 7 µL. A quantidade ótima de material extraído para o desenvolvimento do experimento foi de 1 µL. A reação foi conduzida utilizando-se 1 uL de DNA extraído num volume final de 30 uL, seguindo as concentrações finais de reagentes indicados no Quadro 1. O material foi amplificado em um termociclador automático modelo MX-BCL-7 (ESCO®). O número de ciclos, tempo e as temperaturas utilizadas para cada reação estão registrados no Quadro 2.

QUADRO 1: Reagentes utilizados na reação de PCR multiplex e suas respectivas concentrações finais

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
Tampão da enzima*	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP (mix)	0,25 mM
DMSO	10%
Primer B1	20 pmoles
Primer B5	20 pmoles
Primer Bcon	20 pmoles
Enzima**	1,0 U

*5X Colorless Go Taq REaction Buffer - 7,5 mM MgCl₂ (Promega®, Brasil); **Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen®, Brasil)

QUADRO 2: Condições utilizadas para amplificar fragmentos da gC de herpesvírus bovino

40 ciclos					
Fases	Desnaturação inicial	Desnaturação de DNA	Anelamento primers	Extensão	Extensão final
T/t (min)	94°C/ 1 min	94°C/ 1 min	58°C/ 1min	72°C/ 1min	72°C/ 7 min

Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese como descrito no protocolo da extração.

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada por meio de transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo. O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pares de base (LUDWIG[®]). Os géis foram fotografados utilizando aparelho fotodocumentador modelo DP-CF-011-C (VILBER LOURMAT[®]).

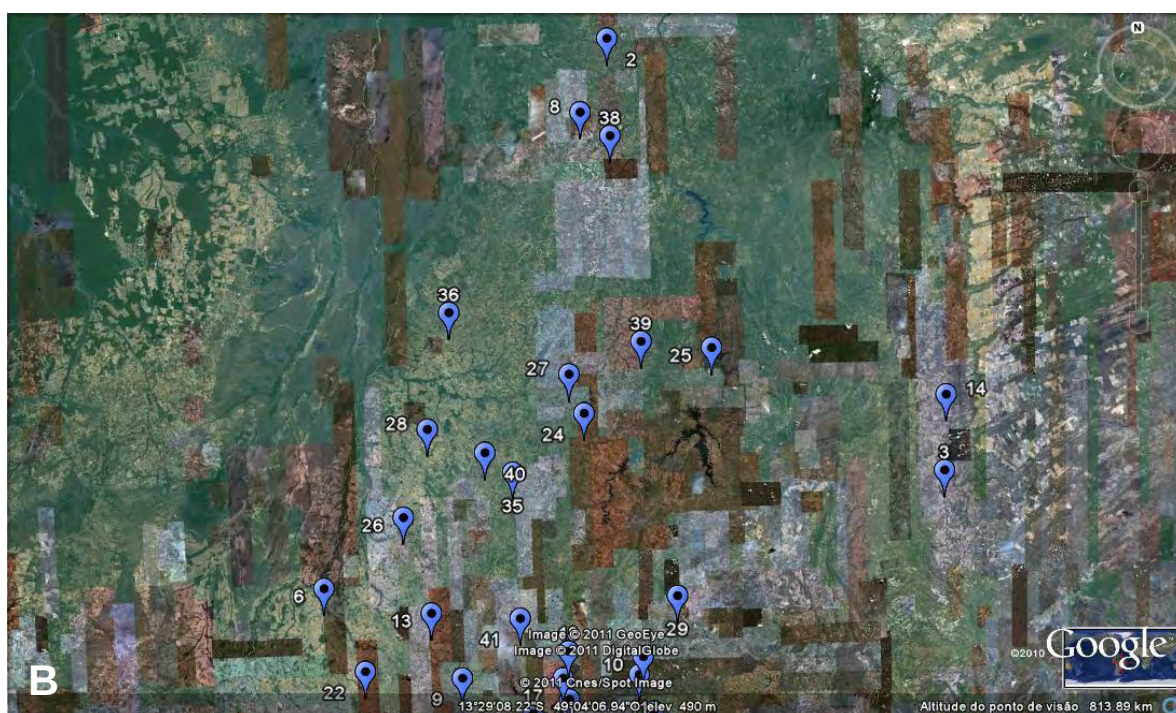
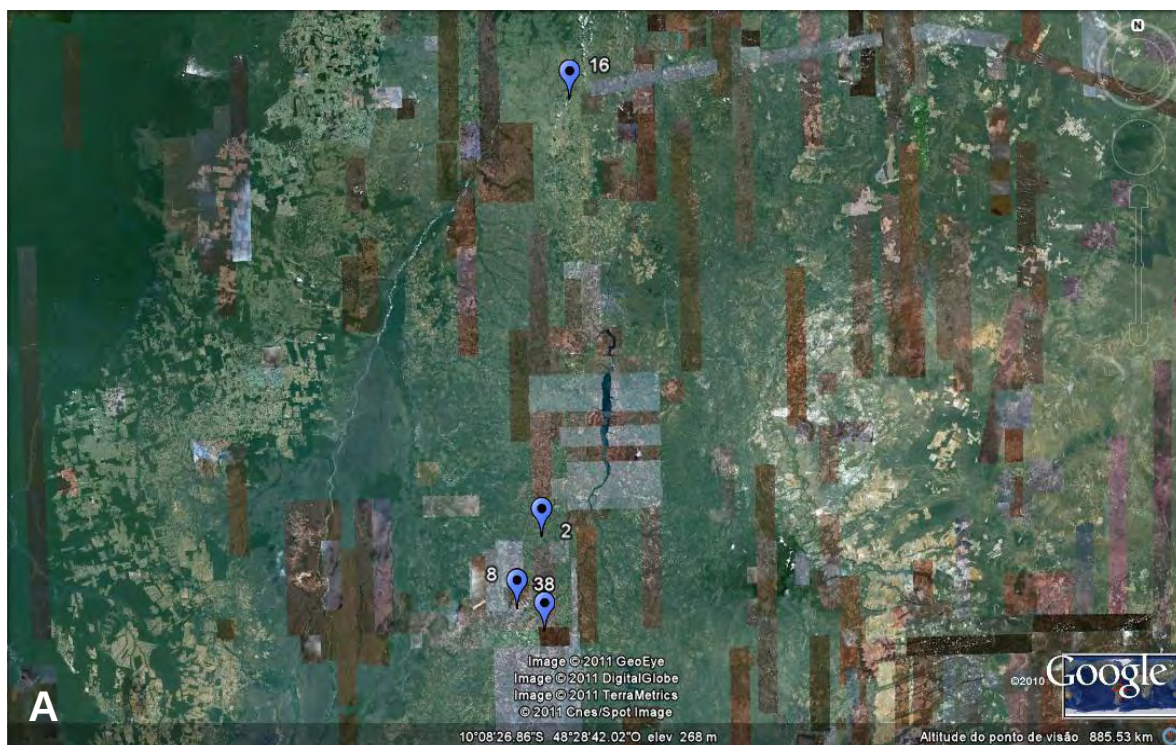
Amostras de referência e/ou representativas dos vírus, gentilmente cedidas pelo professor Dr. Paulo Michael Roehe do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram incluídas no estudo como controle positivo e água ultrapura esterilizada foi utilizada como controle negativo.

4.4-Cultivo de amostras de vírus

As amostras padrão e 20 amostras clínicas, selecionadas aleatoriamente, foram inoculadas em células MDBK (“Madin-Darby bovine kidney”) cultivadas em meio para cultura de células (meio mínimo essencial de Eagle - MEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) e antibióticos usuais (ROEHE et al., 1997). Os espécimes clínicos foram inoculados até um mínimo de três passagens sucessivas antes de serem considerados negativos para isolamento de BoHV. A presença de BoHV nos cultivos celulares foi analisada por meio da observação de efeito citopático (ECP) característico (ROEHE et al., 1997). A confirmação do isolamento viral foi feita por meio de PCR multiplex como descrito anteriormente.

5-RESULTADOS

Das 110 amostras analisadas, 98 foram provenientes do Estado de Goiás, 10 de Tocantins e duas de Mato Grosso. Do total, 109 eram de bovinos e uma de bubalino. Quinze amostras (13,7%) foram positivas para raiva.



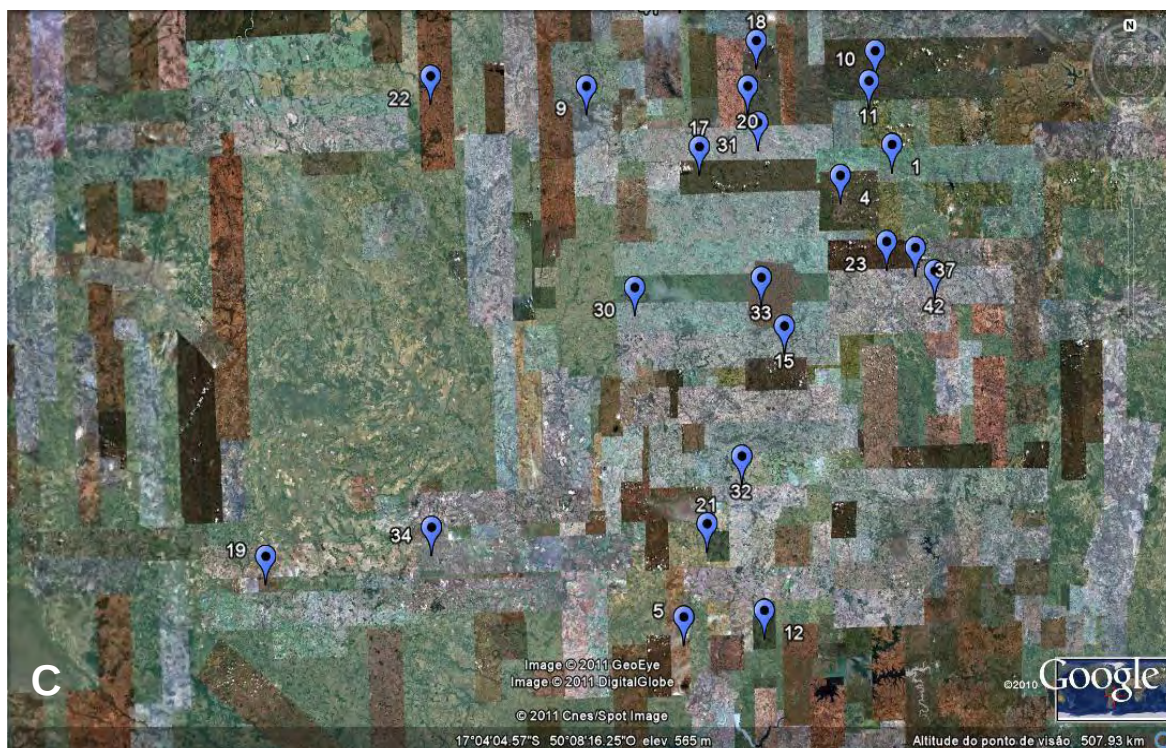


FIGURA 3: Mapas com as respectivas cidades onde foram colhidas as amostras utilizadas no estudo. Disseminação dos vírus pelo Estado de Goiás e Tocantins. **A-** 2: Aliança (TO); 8: Cariri (TO); 16: Itaporã (TO); 38: Sucupira; **B-** 3: Alvorada do Norte (TO); 6: Britânia; 9: Cidade de Goiás; 13: Faina; 14: Guarani; 22: Jussara; 24: Mara Rosa; 25: Minaçú; 26: Mozarlândia; 27: Mutunópolis; 28: Nova Crixás; 29: Padre Bernardo; 35: Santa Terezinha; 36: São Miguel do Araguaia; 39: Trombas; 40: Uirapurú; 41: Uruana; **C-** 1: Abadiânia; 4: Anápolis; 5: Bom Jesus; 10: Cocalzinho; 11: Corumbá de Goiás; 12: Divinópolis; 15: Hidrolândia; 17: Itauçu; 18: Jaraguá; 19: Jataí; 20: Jesúpolis; 21: Joviânia; 23: Leopoldo de Bulhões; 30: Palmeiras de Goiás; 31: Petrolina; 32: Pontalina; 33: Porangaba; 34: Rio Verde; 37: Silvânia; 42: Vianópolis.

Na análise por meio de PCR multiplex, 59 amostras (53,6%) amplificaram fragmentos específicos da região da gC de herpesvírus bovino. Destas, 22,0% (13/59) amplificaram um produto de 354 pb correspondente ao BoHV-1 enquanto que 52,5% (31/59) foram positivas para o BoHV-5, amplificando um produto de 159 pb. Quinze amostras (25,4%) apresentaram positividade para ambos os vírus (Figura 4).

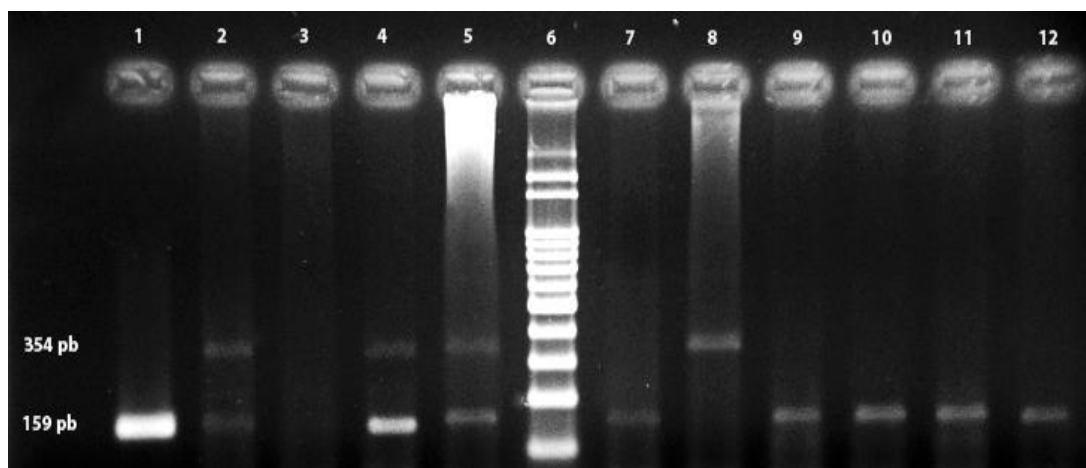


FIGURA 4: PCR multiplex - amplificação da região da gC de herpesvírus bovino. 1- amostra de referência de BoHV-5 (A663); 2, 4 e 5- amostras positivas para BoHV-1 e -5; 3- controle negativo (água); 6- marcador de peso molecular; 7, 9, 10, 11 e 12- amostras positivas para BoHV-5; 8- amostra positiva para BoHV-1.

Das amostras positivas para herpesvírus bovino, oito (13,7%) eram positivas para raiva. A reatividade simultânea de raiva e BoHV-1 ocorreu em quatro amostras; de raiva e BoHV-5, em duas amostras; duas amostras eram positivas simultaneamente para raiva, BoHV-1 e BoHV-5.

Apesar de 10, das 20 amostras submetidas ao isolamento terem amplificado DNA de BoHV-1 e/ou -5, em nenhuma foi evidenciado ocorrência de ECP característico do vírus após três passagens cegas com cinco dias de incubação.

6-DISCUSSÃO

O correto diagnóstico etiológico de quadros mórbidos é sempre de grande interesse para um melhor esclarecimento da epidemiologia desses agravos com vistas ao desenvolvimento de estratégias eficazes de controle, prevenção e erradicação das infecções virais. Devido à diversidade de agentes que causam enfermidades neurológicas é muito importante fazer o diagnóstico diferencial. No ano de 2008, de 149 amostras encaminhadas para diagnóstico de raiva no laboratório de referência do Estado de Goiás, apenas 36 (24,2%) tiveram a presença do agente confirmada (RESENDE, comunicação pessoal). Com o presente estudo objetivou-se identificar herpesvírus bovino em amostras de cérebro que foram submetidas ao diagnóstico de raiva.

Desde que o BoHV-5 foi reconhecido como uma entidade separada do BoHV-1, a maioria dos estudos com amostras de cérebro demonstraram a presença do DNA desse vírus (SPILKI, et al., 2003; SILVA et al., 2009; ARRUDA et al., 2010; SILVA et al., 2010;). Assim, os casos de infecção neurológica passaram a ser genericamente atribuídos ao BoHV-5 enquanto que os herpesvírus isolados de doença respiratória e genital eram classificados como BoHV-1, mesmo sem confirmação antigênica e/ou molecular de sua identidade (SILVA et al., 2007). Entretanto, o BoHV-1 também apresenta potencial encefalitogênico (D'OFFAY et al., 1993; HORIUCHI et al., 1995) e tem sido identificado em espécimes clínicos oriundos de sistema nervoso (BATISTA et al., 2010).

Os resultados deste estudo demonstram que tanto o BoHV-5 como o BoHV-1 estão presentes no SNC de bovinos. Achados semelhantes foram obtidos por SILVA et al. (2007), que encontraram o genoma do BoHV-1 em 19,3% das amostras de SNC de bovinos com doença neurológica. BATISTA et al (2010) isolaram BoHV-1.1 e -1.2 de duas amostras de encéfalo provenientes de animais que apresentaram sinais neurológicos, confirmando que o vírus pode estar associado a esse tipo de enfermidade. Por outro lado, apesar da presença de amostras positivas para BoHV-5, CLAUS et al. (2007) não obtiveram amplificação de fragmento da gC do BoHV-1 em nenhuma das amostras de SNC analisadas.

Vários protocolos de PCR tem sido desenvolvidos e utilizados para identificação de BoHV-1 e -5 em amostras clínicas (MOORE et al., 2000; ALEGRE et al., 2001; ESTEVES, 2007; CAMPOS et al., 2009). O protocolo de PCR multiplex desenvolvido por CLAUS et al. (2005) é específico, rápido, conclusivo e permite a detecção e a identificação simultânea do BoHV-1 e -5, sendo assim escolhido para a utilização nesse estudo.

O uso da gC como alvo para identificação do BoHV-1 e -5 baseia-se no fato dessa proteína ser altamente imunogênica, pois está relacionada à adsorção desses vírus às células-alvo (BABIUK et al., 1996). Além disso, essa glicoproteína apresenta apenas 75% de similaridade entre as duas espécies virais (DELHON et al., 2003). Dentre as regiões da gC, a carboxi-terminal é a uma das mais conservadas, permitindo a detecção concomitante do BoHV-1 e -5, sendo possível fazer a diferenciação entre os dois tipos devido a uma série de deleções existentes nessa região da proteína.

No presente estudo, além da identificação isoladamente de BoHV-5 e BoHV-1 em, respectivamente, 52,5% e 22,0% das amostras analisadas, também foram encontrados casos de coinfeção com os dois vírus em 25,4% das amostras. Esse achado é pouco descrito na literatura, entretanto CAMPOS et al. (2009) observaram que 75,9% das amostras de gânglios trigêmeos de bovinos oriundos de matadouro amplificaram, concomitantemente, os fragmentos de ambos os vírus. Em um estudo realizado com amostras de sêmen de touros também se observou um elevado percentual (44,7%) de detecção concomitante dos tipos 1 e 5 do BoHV (OLIVEIRA et al., 2011).

Apesar da elevada ocorrência de BoHV-5 encontrada neste trabalho, não se pode afirmar que esse agente seja o causador da enfermidade neurológica pela qual os animais vieram a óbito. O isolamento viral não foi bem sucedido nas 20 amostras inoculadas em cultura celular mesmo após três passagens cegas. Dessas 20 amostras, 50% amplificaram DNA viral de BoHV tipos 1 e/ou 5. Esse fato sugere que, apesar de o vírus estar presente no organismo do animal, ele deve encontrar-se em sua forma latente (SPILKI et al., 2003). Entretanto, como as outras 90 amostras não foram submetidas ao isolamento, também não se pode descartar a possibilidade de que alguns destes animais tenham desenvolvido infecção ativa pelo herpesvírus, como comprovado pelo estudo de BATISTA et al.

(2010) e o achado de SILVA et al. (2009) que obtiveram, respectivamente, isolamento de BoHV-1 e -5, sendo este último, oriundo de um animal de Goiás.

Do total de amostras positivas para herpesvírus, oito eram positivas também para o vírus da raiva. Como já comentado anteriormente, a identificação de DNA de herpesvírus sem isolamento viral não certifica a ocorrência de uma infecção ativa, podendo o vírus apenas estar latente dentro das células. Os resultados encontrados neste estudo corroboram com as afirmações de SPILKI et al. (2003), que relataram infecção mista do BoHV-5 e do vírus rábico em um único bezerro que morreu com sinais clínicos compatíveis com enfermidade neurológica. Contudo, não foi possível garantir o papel ativo do BoHV-5 no desfecho da enfermidade, uma vez que o vírus estaria apenas na forma latente nos tecidos neurais. Esses autores afirmam que, quando se identifica o vírus rábico 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. No caso das amostras positivas para raiva e BoHV no presente estudo, a causa real da morte deve ter sido o vírus rábico, já que não houve isolamento do herpesvírus. 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 nem todas as amostras foram submetidas ao isolamento.

Entre as amostras analisadas, uma foi obtida de um búfalo, proveniente do Estado de Goiás, que demonstrou a presença concomitante do DNA de BoHV-1 e -5. A identificação de herpesvírus em búfalo foi feita no início da década de 70, na Austrália, e análises moleculares demonstraram que ela apresenta uma sequência genética distinta dos herpesvírus identificados em bovinos (ST GEORGE & PHILPOTT, 1972; ROS & BELÁK, 2002). JONES et al. (2008) afirmam que os búfalos são capazes de transmitir BoHV-1 para os bovinos e vice e versa, e que a infecção na espécie bubalina pode gerar grandes impactos na indústria da carne desses animais. No Brasil, estudos sorológicos demonstraram a circulação de herpesvírus em búfalos (LAGE et al., 1996) entretanto, ao que se sabe, nenhum estudo identificou ou isolou herpesvírus de origem bovina em bubalinos. Essa amostra representa, portanto, um achado inédito não só pelo fato de ter identificado vírus de origem bovina, mas também em relação à coinfecção

pelas duas espécies virais. Análises moleculares e de isolamento devem ser posteriormente conduzidas a fim de melhor caracterizar a amostra.

Apesar das amostras analisadas serem, em sua maioria, de animais provenientes de Goiás, 12 pertenciam a animais de localidades próximas a divisa com o Estado. Dessas, 10 eram oriundas de Tocantins, das quais sete foram positivas para BoHV-1 e/ou -5, enquanto que as duas amostras do Estado do Mato Grosso foram negativas para ambos os vírus. Esse fato ratifica a importância das medidas de vigilância epidemiológica nas fronteiras interestaduais, principalmente, quando se trata de regiões consideradas grandes produtoras na bovinocultura, como é o caso desses três Estados.

Este é o primeiro estudo que identificou a presença do DNA de herpesvírus bovino em amostras clínicas de Goiás. O elevado índice de positividade para os BoHV no material analisado confirma a circulação desses vírus nos rebanhos do Estado, já evidenciada em estudos sorológicos anteriores como os de ANUNCIAÇÃO, et al. (1989), FARIA et al (2003), VIEIRA et al. (2003) e BARBOSA et al (2005). Esse fato é motivo de grande preocupação devido às perdas produtivas e reprodutivas geradas por esses vírus, sendo um risco potencial para regiões produtoras de bovinos como é o caso de Goiás. Além disso, este estudo pôde acrescentar informações sobre a distribuição do BoHV-1 e -5 no Brasil.

7-CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- O BoHV-1 e -5 circulam entre bovinos e bubalinos de Goiás e Tocantins.
- A identificação do BoHV-1 em amostras de cérebro corrobora com achados anteriores de que essa espécie viral também pode estar relacionada a enfermidades neurológicas.
- A identificação concomitante do genoma de ambos os vírus, sugere que um mesmo animal pode infectar-se com o BoHV-1 mesmo estando infectado pelo BoHV -5 e vice-versa.
- O insucesso no isolamento viral das amostras analisadas não exclui a possibilidade do vírus ter causado a enfermidade neurológica nos animais avaliados.

8-CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas utilizadas neste estudo permitiram detectar o DNA viral do BoHV-1 e do BoHV-5, nas amostras de cérebro. Todavia, como não foi obtido isolamento viral em nenhuma das amostras submetidas a esse processo, não se pode confirmar a participação desses agentes como causadores da infecção e nem responsabilizá-los pelos óbitos dos animais. Entretanto, o BoHV-5 deve sempre ser considerado no diagnóstico diferencial dos agravos que afetam o sistema nervoso de bovinos, já que não há sinais clínicos característicos dessa infecção que possa distingui-la de outras infecções virais como a raiva, por exemplo. Além disso, não se pode descartar o BoHV-1 nos diagnósticos diferenciais, uma vez que estudos recentes têm detectado, frequentemente, esse agente em casos de encefalite, contradizendo a literatura clássica.

No entanto, mais pesquisas precisam ser desenvolvidas com vistas ao conhecimento da epidemiologia molecular desses vírus, buscando entender se a manifestação clínica atribuída ao BoHV-1 e -5 é realmente a desenvolvida por essas espécies virais. Também é importante saber se os casos de coinfeção exacerbam os sinais da doença ou se não existem diferenças.

A amostra proveniente de um búfalo que foi positiva para herpesvírus bovino necessita de mais análises, pois apesar de dados sorológicos já terem detectados anticorpos contra BoHV nessa espécie no Brasil, ainda não se tem comprovação da manifestação de enfermidade por herpesvírus de origem bovina em bubalinos. Essa espécie pode ser um possível transmissor do vírus e, portanto, se torna alvo de medidas de controle e prevenção.

Este estudo dá continuidade aos já iniciados há mais de uma década que visam conhecer particularidades dos herpesvírus bovino que circulam em Goiás. Estudos utilizando outros espécimes clínicos devem ser incluídos, com vistas ao isolamento viral e a caracterização molecular. O isolamento de uma amostra de BoHV-5 de um animal de Goiás com quadro clínico de encefalite, realizado em nosso laboratório, permitirá a abertura de um campo para estudos de patogenicidade e resposta imunológica, contribuindo com o esclarecimento da biologia dos herpesvírus circulantes no Estado.

É sabido que a infecção pelos herpesvírus de bovinos gera perdas produtivas e reprodutivas significativas nos animais afetados. Portanto, acredita-se que as enfermidades causadas por esses agentes e os países que não apresentam uma política clara quanto ao seu controle e prevenção, possam ser alvo de futuros embargos, haja vista que países europeus já conseguiram erradicar a infecção por esses vírus de seus rebanhos.

9. REFERÊNCIAS

1. ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.38, n.4, p.919-920, 1978.
2. 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 Series B**, Berlin, v. 48, n.8, p.613-621, 2001.
3. ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; LEITE, R. C.; MOREIRA, E. C. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, através da prova de hemaglutinação passiva. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.41, n.5, p.433-441, 1989.
4. AQUINO 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.; AFONSO, D. A. F. Meningoencefalite por herpesvírus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.1, p.1-5, 2009.
5. ARRUDA, L. P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; LEMOS, R. A. A.; NOGUEIRA, A. P. A.; CRUZ, R. A. S.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M. 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.30, n.8, p.646-650, 2010.
6. 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**, Davis, v.9, p.387-394, 1997.
7. BABIUK, L. A.; DRUNEN, H. L.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvírus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.53, n.1-2, p.31-42, 1996.
8. BAGUST, T. J. Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvírus. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.82, p.365-367, 1972.
9. BAGUST, T. J.; CLARK, L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.89, p.375-383, 1972.
10. BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. D. E.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no

Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1368-1373, 2005.

11. BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS, A. A. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Agnes, 2006. p.166-171.

12. 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**, Budapest, v.19, p.145–151, 1969.

13. BATISTA, H.B.C.R.; SCHMIDT, E.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.5, p.1023-1028, 2010.

14. BELKNAP, E. B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; SCHULTHEISS, P. C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v.31, p.358–365, 1994.

15. BELAK, K.; KUCSERA, L.; ROS, C.; KULCSAR, G.; MAKRANSZKI, L.; SOOS, T.; BELAK, S. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v.22, p.207–220, 1999.

16. BHAT, M. N.; MANICKAM, R.; KUMANAN, K. Serological evidence of bovine herpesviruses 1 and 2 in Asian elephants. **Journal of Wildlife Diseases**, Stanford, v.33, p.919-920, 1997.

17. BULACH, D. M.; STUDDERT, M. J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1 and buffalo herpesvirus. **Archives of Virology**, Atlanta, v.113, p.17-34, 1990.

18. CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; HÜBNER, 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**, Amsterdam, v.139, p.67-73, 2009.

19. CARRILLO, B. J.; POSPISCHILI, A.; DAHME, E.; Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v.30, p.161–168, 1983a.

20. CARRILLO, B. J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A. A.; VASQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine**, Londres, v.30, p.327-332, 1983b.

21. CASCIO, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; AMES, 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**, Davis, v.11, p.134–139, 1999.

22. CHOWDHURY, S. I. Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein C neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.58, n.2-4, p.309-314, 1997.

23. CHOWDHURY, S. I.; LEE, B. J.; OZKUL, A.; WEISS, M. L. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, Washington, v.74, n.5, p.2094-2106, 2000.

24. CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvirus bovino tipo 5 e meningoencefalite herpética bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.1, p.131-141, 2002.

25. CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V.; WOSIACKI, S. R.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **Journal of Virological Methods**, Londres, v.128, n.1-2, p. 183-188, 2005.

26. CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. A.; 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**, São Paulo, v.38, p.485-490, 2007.

27. COFFIN, R. S.; HOWARD, M. K.; LATCHMAN, D. S. Altered dinucleotide content within the latency transcribed regions of the DNA structure. **Virology**, Illinois, v.209, n.2, p.358-365, 1995.

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

29. 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 herpesvirus type 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.88, p.315-324, 2002.

30. 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**, Washington, v.77, n.19, p.10339-10347, 2003.

31. DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.; SADIR, A. M.; ROMERA, S. A. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, Edimburgo, v.81, p.327–334, 2006.

32. DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, Geneva.184, p.138-145, 2010.
33. DEREGT, D.; CHO, H. J.; KOZUB, G. C. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.57, n.1, p.56-59, 1993.
34. DEVIREDDY, L. R; JONES, C. Alternative splicing of latency related transcript of bovine herpesvirus-1 yields RNAs containing unique open reading frames. **Journal of Virology**, Washington v.72, p.7294-7301, 1998.
35. DEZEN, D. **Amplificação do genoma de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) por círculo rolante e produção de um clone viral**. 2007a. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de veterinária, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
36. DIEL, D. G.; ALMEIDA, S. R.; BRUM, M. C.; DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.121, p.257–267, 2007.
37. D'OFFAY, J. M.; MOCK, R. E.; ROBERT, W.; FULTON, D. V. M. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.54, p.534–539, 1993.
38. ESTEVES, P. A.; TEIXEIRA, M. F. B; OLIVEIRA, L. G.; SILVA, T. C.; ROEHE, P. M. Development and standardization of a monoclonal antibodies blocking ELISA for the serological diagnosis of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) infection. **Virus Review and Research**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p.51, 1998.
39. ESTEVES, P. A.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; SILVA, T. C. OLIVEIRA, E. A.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A. M.; ROEHE, P. M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a Bull not exhibiting clinical signs. **Veterinary Records**, Londres, v.152, n.21, p.658-659, 2003.
40. ESTEVES, P. A. **Análise da região carboxi-terminal da Glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5)**. 2007. 88 f.Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
41. FARIA, B. O., FRENEAU, G. E., BRITO, W. M. E. D., CAMPOS JR., A. C. P., VIEIRA, S. Estudo de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em municípios de entorno de Goiânia, Go. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, São Paulo, v.27, n.3, p.543-545, 2003.

42. FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; RAMAL, P.; CARDOSO, T. C. 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. **Journal of Virological Methods**, Londres, v.146, n.1-2, p.335-340, 2007.
43. FITZPATRICK, D. R.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Mechanisms of herpesvirus immune-evasion. **Microbial Pathogenesis**, v.10, n.4, p.253-259, 1991.
44. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS–FAO, Agriculture Data. **Informações sobre exportações e importações de carne bovina**, 2010 [on line]. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 15 dez. 2010.
45. FLORES, E. F., SILVA, A. M., WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (VBDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Pallotti, 1998. p.127-137.
46. FRANCO, A.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1.ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. cap. 17, p. 435-485.
47. FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, Monthly, v.38, p.216-221, 1962.
48. FUCHS, M.; HUBERT, P.; DETTERER, J.; RZIHA, H. J. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type and virus lacking glycoprotein E. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.2498–2507, 1999.
49. GALVÃO, C. L. Diagnóstico da infecção genital do herpesvírus 1 (BHV-1) pelos métodos de isolamento e imunofluorescência direta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.38, n.1, p.92-94, 1986.
50. GIBBS, E. P. J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesvirus. Part I. bovine herpesvirus 1. **The Veterinary Bulletin**, Weybridge, v.47, p. 317-343, 1977.
51. GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; SOUZA, J. G.; COSTA, E. A.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in Bull sêmen: amplication and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.27, n.6, p.495-504, 2003.
52. GOUGH, A. JAMES, A. Isolation of IBR vírus from a heifer with meningoencephalitis. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.16, p.313-314, 1975.

53. GRAHAM, D. A.; MAWHINNEY, K. A.; MCSHANE, J.; CONNOR, T. J.; ADAIR, B. M.; 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 diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v. 9, n.1, p.24-31, 1997.
54. GULARTE QUINCOZES, C. **Prevalência e fatores de risco associados as infecções pelos herpesvirus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chui**. 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em Virologia)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.
55. HANON, E.; KEIL, G.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GRIEBEL, P.; VANDERPLASSCHEN, A.; RIJSEWIJK, F. A.; BABIUK, L.; PASTORET, P. P. Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. **Virology**, Illinois, v.257, n.1, p.191-197, 1999.
56. HORIUCH, M.; YAMAZAKI, N.; FURUOKA, H.; MATSUI, T.; NAKAGAWA, M.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M. Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.57, n.3, p.577-58, 1995.
57. HOSSAIN, A.; SCHANG, L. M.; JONES, C. Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, Washington, v.69, n.9, p. 5345-5352, 1995.
58. HUEMER, H. P.; WANG, Y.; GARRED, P.; KOISTINEN, V.; OPPERMAN, S. Herpes simplex virus glycoprotein C: molecular mimicry of complement regulatory proteins by a viral protein. **Immunology**, Oxford, v.79, n.4, p.639-647, 1993.
59. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, Produção da Pecuária Municipal 2009 [online], 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 08 jan. 2011.
60. JOHNSTON, L. A. Y.; SIMMONS, G. C.; MCGAVIN, M. D. A viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, Monthly, v.38, p.207–215, 1962.
61. JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Review**, v.16, n.1, p.79-95, 2003.
62. JONES, C.; CHOWDHURY, S. 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. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v.8, n.2, p.187-205, 2008.

63. JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.2, p.289-298, 2006.
64. KIRBY, F. D.; MARTIN, H. T.; OSTLER, D. C. An indirect haemagglutination test for the detection and assay of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus. **Veterinary Records**, Londres, v.94, n.16, p. 361-362, 1974.
65. KIRKBRIDE, C. A. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.4, p.175-180, 1992.
66. LAGE, A.P.; CASTRO, R. S.; MELO, M. I.; AGUIAR, P. H.; BARRETO FILHO, J. B.; LEITE, R. C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue d'élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v.49, n.3, p.195-197, 1996.
67. LIANG, X.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing b-galactosidase: evolution of the role of gIII virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. **Virology**, Illinois, v.189, p.629-639, 1992.
68. LIMAN, A.; ENGELS, M.; MEYER, G.; ACKERMANN, M. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. **Archives of Virology**, Atlanta, v.145, n.10, p.2047-2059, 2000.
69. LINDNER, A.; AMBROSIUS, H.; LIEBERMANN, H.; 1993. Comparative studies for the detection of antibodies against BHV-5 with the immunosorbent assay, neutralization test, cell assay and immunofluorescence. **German Veterinary Weekly**, v.100, p.440-442, 1993.
70. LYAKU, J. R.; VILCEK, S.; NETTLETON, P. F.; MARSDEN, H. S. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.48, n.1-2, p.135-142, 1996.
71. METTENLEITER, T. C.; Herpesvirus Assembly and Egress. **Journal of Virology**, Washington, v.76, n.4, p.1537-1547, 2002.
72. METTENLEITER, T. C.; Pathogenesis of neurotropic herpesvirus: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, Londres, v.92, p.197-206, 2003.
73. 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**, Danvers, v.87, p.205-217, 1986.

74. METZLER, A. E.; OSSENT, P.; GUSCETTI, F.; RUBEL, A.; LANG, E. M. Serological evidence of herpesvirus infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Stanford, v.26, p.41-49, 1990.
75. MEYER, G.; LEMAIRE, M.; LYKARU, J. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.51, p.27-40, 1996
76. MEYER, G.; HANON, E.; GEORLETTE, D.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. **Journal of General Virology**, Speencerswood, v.79, n.8, p.1983-1987, 1998.
77. MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROSS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, K.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, p.633-652, 2001
78. MEYER, A. D.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; PITUCO, M. E.; OKUDA, L.; LEOMIL, H.; CASTRO, A. M. M. G.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparação das técnicas de isolamento viral e nested PCR na detecção do BHV-1 em sêmen bovino experimentalmente e naturalmente contaminado **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.123-126, 2003.
79. MILLER, J. M.; WHESTSTONE, C. A.; VAN der MAATEN, M. J. Abortifacient property of bovine herpesvírus type 1 isolates that represent three subtypes determined by endonuclease analisys of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.52, n.3, p. 458-461, 1991.
80. MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.75, p.145-153, 2000.
81. MORETTI, B.; ORFEI, Z.; MONDINO, G.; PERSECHINO, A. Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. **Veterinaria Italiana**, v.15, p.676–702, 1964.
82. MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; CAMPOS, M. T. G. R., et al. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IPV/IBR). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.45, n.3, p.187-190, 1978.
83. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. **Blast**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 15 abr. 2009.
84. NOGUEIRA, F. R. C.; CAMARGO, A. J. R.; RESENDE, D. A. Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. **Pesagro. Rio de Janeiro**, v.86, n.167, p. 1-5, 1986 [Comunicado Técnico].

85. ODEÓN, A. C.; SPATH, E. J. A.; PALOMA, E. J.; LEUNDA, M. R.; FERNANDEZ SAINZ, I. J.; PEREZ, S. E.; KAISER, G. G.; DRAGHI, M. G.; CETRÁ, B. M.; CANO, A. Seroprevalencia de La diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio em Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria (Argentina)** v.82, p.216–220, 2001.
86. OKAZAKI, K.; HONDA, E.; KONO, Y. Heparin-binding domain of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIII. **Archives of Virology**, Atlanta, v.134, n.3-4, p.413-419, 1994.
87. OLIVEIRA, M. T.; CAMPOS, F. S.; DIASA, M. M.; VELHO, F. A.; FRENEAU, G. E.; BRITO, W. M. E. D.; RIJSEWIJK, F. A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Detection of herpesvirus 1 and 5 in semen from brazilian bulls. **Theriogenology**, 2011 (no prelo). Disponível em: <http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X%2810%2900604-7/abstract>. Acesso em 10 fev. 2011.
88. OSORIO, F.; SRIKUMARAN, S.; RHODES, M.; CHRISTENSEN, D.; SRIKUMARAN, P. Detection of bovine herpesvirus-1-specific monoclonal antibodies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.1, n.2, p.139-145, 1989.
89. PEREZ, S. E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M. R.; OSORIO, E. A.; FLORES, E. F.; ODEON, A. C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v.39, p.437- 444, 2002.
90. PORTERFIELD, J. S., **Andr we's viruses of vertebrates**, 5.ed. London: Baill re Tindall, 1989. 457p.
91. REED, D. E.; BICKNELL, E. J.; BURY, R. J. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Washington, v.163, p.753–755, 1973.
92. RIET-CORREA, F.; VIDOR T.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D. C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.9, p.13-16, 1989.
93. RIET-CORREA, G.; DUTRA DUARTE, M.; BARBOSA, J. D.; CHAVES OLIVEIRA, C. M.; DUARTE CERQUEIRA, V.; DE FARIAS BRITO, M.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e poli ncefalomal cia causada por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.26, p.44–46, 2006.
94. RIJSEWIJK, F. A.; KAASHOEK, M. J.; LANGEVELD, J. P.; MELOEN, R.; JUDEK, J.; BIENKOWSKA-SZEWCYK, K.; MARIS-VELDHUIS, M. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that

allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. **Journal of General Virology**, Speencerswood, v.80, n.6, p.1477-1483, 1999.

95. RODRIGUEZ, M.; SUAREZ HEINLEIN, A.; RUIZ, M.; METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A. Detection of bovine herpesvirus type 1 via na immunoperoxidase method, using monoclonal antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.50, n.5, p.619-621, 1989.

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

97. ROEHE, P. M., TEIXEIRA, M. B., ESTEVES, P. A., et al. 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), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Pallotti, 1998. p.89-96.

98. ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, Birmingham, v.123, p.432-445, 1992.

99. ROIZMAN, B.; KNIPE, M. D.. Herpes simplex virus and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOK, R. M.; MONATH, T. P.; MELNICK, J. L.; ROIZMAN, B; STRAUS, S. E., **Fields Virology**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p.2231-2295.

100. ROIZMAN, B.; PELLET, P.E. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOK, R. M.; MONATH, T. P.; MELNICK, J. L.; ROIZMAN, B; STRAUS, S. E., **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 2480-2499.

101. ROS, C.; RIQUELME, M. E.; FORSLUND, K. O.; BELÁK, S. Improved detection of five related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v.83, p.55-65, 1999.

102. ROS, C; BELÁK, S. Characterization of the glicoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. **Virus Gene**, v.24, n.2, p.99-105, 2002.

103. RUBIN, L. S.; ILHA, A. S; WAQUIL, P. D. O comércio potencial brasileiro de carne bovina no contexto de integração regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v.46, n.4, p. 1067-1093, 2008.

104. RUFINO, F. A. L.; SENEDA, M. M., ALFIERI, A. A. Impacto do herpesvírus bovino1 e do vírus da diarreia viral bovina na transferência de embriões. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.11, n.1, p.78-84, 2006.

105. SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSORIO, A. L. A. R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus

bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.18, n.2, p.75-82, 1998.

106. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.2100.

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

108. SILVA, A. M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; CANTO, N. C.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; SOUSA, R. S. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type 5 (BVH-5). **Revista de Microbiologia**, v.30, n.1, p.22-31, 1999.

109. 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**, Seropédica, v.27, n.10, p.403-408, 2007.

110. SILVA, D. A.; SILVA, A. M.; SOUZA, K. M.; SOARES, P.; CAMPO, F. S.; ROEHE, P. M.; BRITO, W. M. E. D. Bovine herpesvirus in brain samples from cattle in Goiás, Brazil - Preliminary results. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 20, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**. Rio de Janeiro: Imprinta Express LTDA, v. 14. p. 135-136, 2009. [resumos].

111. SILVA, A. M.; ELIAS, F.; SILVA, D. A.; SOUZA, K. M.; SOARES, P.; BRITO, W. M. E. D.; ROEHE, P. M. First isolation of bovine herpesvirus type 5 from cattle with neurological signs in Goiás, Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 20, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**. Rio de Janeiro: Imprinta Express LTDA, v. 14. p. 171, 2009. [resumos].

112. SCHUDEL, A. A.; CARRILO, B. J.; WYLER, R. METZLER, A. E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v.33,p.303-310, 1986.

113. SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular Virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.53, p.17-29, 1996.

114. SCHYNTS, F.; BARANOWSKI, E.; LEMAIRE, M.; THIRY, E. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.66, n.3, p.187-195, 1999.

115. SHEN, D. T.; BURGER, D.; LI, Z. Q.; GORHAM, J. R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type 1, Los Angeles strain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.1, p.25-37, 1991.

116. SOUZA, V. F.; MELO, S. V.; ESTEVES, P. A.; V. F.; 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.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; LEMOS R. A.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, M.; ROEHE, P. M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipo 1 (B0HV-1) e 5 (BoHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.22, n.1, p.13-18, 2002.
117. SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; TEIXEIRA, M. B.; ESTEVES, P. A.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R. A.; ROEHE, P. M. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.23, n.1, p.1-4, 2003.
118. SPILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; DA SILVA, A. D.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A.; ROEHE, P. M. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v.129, n.2, p.191-193, 2005.
119. ST GEORGE, T. D.; PHILPOTT, M. Isolation of IBR virus from the prepuce of water Buffalo bulls in Australia. **Australian Veterinary Journal**, Monthly, v.48, p.126, 1972.
120. SUAREZ, A. H.; METZLER, A. E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A. A. Molecular characterization of south american bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **Journal of Veterinary Medicine**, Londres, v.40, p.125-130, 1993.
121. TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico Bovine herpesvirus type 1: infection and diagnosis methods. **Semina: Ciências. Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.203-209, 2001.
122. THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, Londres, v.37, n.2, p.169-190, 2006.
123. TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, New York, v.45, p.191-223, 1995.
124. VAN DER MEULEN, K. M.; FAVOREEL, H. W.; PENSAERT, M. B.; NAUWYNCK, H. J. Immune escape of equine herpesvirus 1 and other herpesviruses of veterinary importance. **Veterinary Immunology and Immunopath**, Amsterdam, In press, 2006.
125. VAN ENGELBURG, F. A.; MAES, R. K.; VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, n.12, p.3129-3135, 1993.

126. VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.4, n.2, p.131-137, 2003.
127. VILCEK, S. Detection of the bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) genome by PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.41, n.2, p.245-247, 1993.
128. VOGEL, F. S.; 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**, Washington, v.41, p.4512-4520, 2003.
129. WAGTER, L. H.; GLAS, R. D.; BLEUMINK-PLUYM, N.; VAN ENGELENBURG, F. A.; RIJSEWIJK, F. A.; HOUWERS, D. J. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) in selectively digested whole bovine semen. **Veterinary Research. Communications**, Dordrecht, v.20, p.401-408, 1996.
130. WEIBLEN, R.; BARROS, C. S.; CANABARRO, T. F.; FLORES, E. F. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, Londres, v.124, p.666-667, 1989.
131. WEIBLEN, R.; MORAES, M. P.; REBELATTO, M. C.; LOVATO, L. T.; CANABARRO, T. F. Bovine herpesvirus isolates. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.208-211, 1996.
132. WHETSTONE, C. A.; EVERMANN, J. F. Characterization of bovine herpesviruses isolated from six sheep and four goats by restriction endonuclease analysis and radioimmunoprecipitation. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.49, p.781-785, 1998.
133. WILD, P.; SCHRANER, E. M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, Washington, v.72, n.12, p.9561-9566, 1998.
134. WINKLER, M. T.; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. **Journal of Virology**, Washington, v.73, n.10, p.8657-8668, 1999.
135. WIRTH, U. V. Comparasion of immediate-early transcripte among bovine herpesvírus type 1 and 5 strains differing in neurovirulent potential. **Virus Research**, Londres, v.27, p.1-12, 1993.
136. WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z. M. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus/enfermidade das mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Eldorado do Sul, v.1, p.52-58, 1972.

ANEXO

Tabela 1: dados referentes às amostras positivas para BoHV-1, BoHV-5 e raiva recebidas no ano de 2008

Amostra	Município de Origem	Sexo	Idade (meses)	BoHV-1	BoHV-5	Raiva
C01	Santa Terezinha	M	24	X	X	
C02	Mozarlândia	F	72		X	
C03	São Miguel do Araguaia	M	18		X	
C05	Hidrolândia	F	25	X	X	
C06	Joviânia	M	30		X	
C07	Joviânia	M	72		X	
C09	Uirapurú	F	60		X	
C10	Jataí	F	60		X	
C12	Nova Crixás	F	12		X	
C13	Mutunópolis	F	48		X	
C14	Nova Crixás	M	16		X	X
C15	Minaçú	M	24		X	X
C16	Padre Bernardo	F	12		X	
C17	Alvorada do Norte (TO)	M	4		X	
C18	Cidade de Goiás	F	36		X	
C19	Cariri (TO)	F	120		X	
C20	Palmeiras de Goiás	F	17		X	
C21	Faina	NI	96		X	
C22	Itaporã (TO)	M	7	X	X	
C23	Itaporã (TO)	M	7		X	
C28	Faina	M	45	X		
C29	Divinópolis	NI	NI	X		X
C30	Petrolina	NI	60		X	
C42	Silvânia	M	12		X	
C46	Goianésia	M	10	X		
C47	Corumbá de Goiás	M	18	X		
C48	Bom Jesus	M	24		X	
C53	Alvorada do Norte (TO)	NI	NI	X	X	
C55	Sucupira (TO)	M	5		X	
C56	Uruana	F	60	X	X	X
C57	Uruana	F	60	X		X
C62	Leopoldo de Bulhões (bubalino)	M	10	X	X	

continua

C64	Vianópolis	F	15	X	X
C65	Guarani	F	12	X	X
C66	Silvânia	M	48		X
C67	Nova Crixás	M	30	X	
C68	Jussara	F	24		X
C70	Jussara	F	4		X
C71	Canarana (TO)	F	18		X
C72	Cocalzinho	F	48		X
C74	Trombas	M	30	X	
C76	Jussara	M	8	X	
C79	Abadiânia	F	42	X	
C82	Pontalina	M	30	X	
C87	Uruana	F	60		X
C96	Jaraguá	F	30	X	
C97	Britânia	F	48	X	X
C98	Cocalzinho	NI	NI	X	X
C100	Jesúpolis	M	60	X	X
C101	Rio Verde	NI	NI	X	X
C102	Aliança (TO)	F	48	X	X X
C103	Palmeiras de Goiás	F	60	X	X
C104	Itauçu	M	30	X	X
C106	Porangaba	NI	NI	X	X
C107	Cocalzinho	F	96	X	X
C109	Minaçu	F	60		X
C110	Mara Rosa	F	18		X
C114	Anápolis	F	10		X

Legenda: **M**- macho; **F**:- fêmea; **NI**- não informado.